



**FİLAMANTÖZ FUNGUSLARDAN
ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNE SAHİP
EKSTRASELLÜLER POLİPEPTİTLERİN
İZOLASYONU**

Ayşenur YAZICI

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ
Eş Danışman: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN**

2018

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

FİLAMANTÖZ FUNGUSLARDAN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNE SAHİP
EKSTRASELLÜLER POLİPEPTİTLERİN İZOLASYONU

Ayşenur YAZICI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Eş Danışmanı: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2018

Her hakkı saklıdır

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

**FİLAMANTÖZ FUNGUSLARDAN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNE SAHİP
EKSTRASELLÜLER POLİPEPTİTLERİN İZOLASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ danışmanlığında, Ayşenur YAZICI tarafından hazırlanan bu çalışma 31/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak Oy birliği / Oy çokluğu ile (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. M. Hamidullah UYANIK	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırmalar Projesi Koordinatörlüğü tarafından BAP 2017-15 nolu proje ile desteklenmiştir.

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.

31/07/2018

Ayşenur YAZICI

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FİLAMENTÖZ FUNGUSLARDAN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNE SAHİP EKSTRASELLÜLER POLİPEPTİTLERİN İZOLASYONU

Ayşenur YAZICI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Eş Danışman: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

Mikroorganizmalarda görülmeye başlanan antibiyotiklere direnç, yeni antibiyotik arama çalışmalarını gerekli kılmıştır. Prokaryotik ve ökaryotik canlıların immün sistemlerinin bir parçası olarak sentezlenen antimikrobiyal proteinler (AMP) yeni nesil antibiyotikler olarak karşımıza çıkmaktadır. AMP molekülleri kısa zincirli, genellikle katyonik ve geniş spektrumlu aminoasit dizileridir. Antibiyofilm proteinler (ABP) ise AMP moleküllerinin bir alt grubu olup, biyofilm oluşumunu engelleyen polipeptit dizileridir. Bu tez çalışmasında, literatürde fungal tabanlı ABP molekülü bulunmadığından, topraktan filamentöz fungus izole edilerek, kültür filtratlarında ABP taraması yapılmıştır. İzole edilen toplam 120 izolat içerisinde agar difüzyon, çapraz ekim, radyal inhibisyon ve tripsin/proteinaz K parçalama yöntemleri ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve metisilin dirençli *S. aureus*'a (MRSA) etkili 2 adet AMP molekülü üreten fungus belirlenmiş ve bu funguslardan 1 tanesinin ABP ürettiği bulunmuştur. İndükleme sistemi ile belirlenen, trikloroasetik asit (TCA) yöntemi ile izole edilen ve ultrafiltrasyon yöntemi ile saflaştırılan antibiyofilm aktiviteye sahip polipeptit, SDS-PAGE ve trisin-PAGE ile doğrulanmıştır. ABP molekülü üreten filamentöz fungusun korunmuş (Internal Transcribed Spacer) ITS ve kalmodülün gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış ve *Aspergillus tubingensis* olduğu belirlenmiştir. *S. aureus*'a karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri 32 mg/L, minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyon (MBIC) değeri ise 2 mg/L olarak belirlenen ABP molekülü, MALDI-TOF/MS ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonrasında bu proteinin UniProt veritabanında kayıtlı, karakterize edilmemiş, A0A1L9MXD7_ASPTU kodlu yeni bir protein olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, filamentöz funguslarda ABP'nin varlığı ilk kez gösterilmiştir. Bu ABP molekülünün, *S. aureus*'un biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarında kullanılabilir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

2018, 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: Filamentöz Fungus, Antibiyofilm Polipeptit, Ekstrasellüler Protein, Moleküler Karakterizasyon, *Aspergillus tubingensis*

ABSTRACT

Ph.D

ISOLATION OF EXTRACELLULAR ANTIBIOFILM POLYPEPTIDES FROM FILAMENTOUS FUNGI

Ayşenur YAZICI

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Antibiotic resistance among microorganisms poses a great threat to human health. Since, discovery of new antibiotics is necessarily needed. Antimicrobial polypeptides (AMP), which are synthesized as part of the immune systems of prokaryotic and eukaryotic organisms, are emerging as new generation antibiotics. AMPs are amino acid sequences that are short chain and usually cationic. Antibiofilm peptides (ABP) are a subset of AMPs and are polypeptide sequences that inhibit biofilm formation. In this thesis study, the filamentous fungus was isolated from the soil, and the presence of ABP was detected in culture filtrates of these filamentous fungi. Two AMP-producing fungi were identified against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) by well diffusing, cross streak, radial inhibition and trypsin / proteinase K digestion methods. One of these fungi was ABP producer. Molecular characterization of ABP producer filamentous fungus was made and it was determined that this species is *Aspergillus tubingensis*. The proteins isolated by trichloroacetic acid (TCA) method and are shown by SDS-PAGE and tricine-PAGE. This ABP molecule was determined by MALDI-TOF/MS. The minimum inhibitory concentration (MIC) value for *S. aureus* was 32 mg / L, and the minimum biofilm inhibitory concentration (MIC) value was 2 mg / L. This protein is uncharacterized protein (A0A1L9MXD7_ASPTU) from UniProt database. In conclusion, the presence of ABP in filamentous fungi has been demonstrated for the first time and the potential ABP that can be used in biofilm related infections of *S. aureus* has been suggested.

2018, 90 pages

Keywords: Filamentous Fungi, Antibiofilm Polypeptides, Extracellular Protein, Molecular Characterization, *Aspergillus tubingensis*.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezinde (YÜTAM) bulunan Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Tez çalışması süresince desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ ve eş danışmanım Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Patojen bakteri suşlarının temininde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi İskender KARALTI'ya teşekkürlerimi sunarım.

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

Tez çalışması sürecinde her türlü manevi desteğini eksik etmeyen annem Reyhan ÖZDEMİR, babam Hasan ÖZDEMİR ve eşim Mustafa YAZICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşenur YAZICI

31 / 07 / 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm	1
1.2. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Mekanizmaları	2
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'da Biyofilm Yapısı	5
1.4. Biyofilm Kontrol Stratejileri	7
1.5. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Peptitler	8
1.5.1. AMP ve ABP Moleküllerinin Genetik Sentez Mekanizmaları	13
1.6. AMP ve ABP'lerin Etki Mekanizmaları	14
1.7. Antibiyofilm Aktivite ve Protein Yapısının İlişkisi	17
1.8. Filamentöz Funguslar ve Biyoteknolojik Önemi	20
1.9. Filamentöz Fungusların Proteomiği	21
1.10. Filamentöz Fungus Kaynaklı Antimikrobiyal Peptitler	22
1.10.1. Defensin Benzeri Proteinler	23
1.10.2. Peptaiboller.....	24
1.11. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	32
3.1. Materyaller	32
3.1.1. Cihazlar	32
3.1.2. Sarf Malzemeler	33
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları.....	33
3.1.3.1. Patates Dekstroza Agar	33
3.1.3.2. Kloramfenikol ve Rose Bengal Agar	33

3.1.3.3. Yeast Pepton Glikoz Besiyeri	33
3.1.3.4. Luria-Bertani Agar	34
3.1.3.5. Luria-Bertani Broth	34
3.1.3.6. Mueller-Hinton Agar	34
3.1.3.7. Mueller-Hilton Broth	35
3.1.3.8. Soft Besiyerleri.....	35
3.1.3.9. Mineral Tuz Solüsyonu	35
3.1.4. Biyofilm Testi Solüsyonları	36
3.1.4.1. %1'lik Kristal Viyole Boyası	36
3.1.4.2. % 30'luk Asetik Asit.....	36
3.1.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Malzemeleri	36
3.1.6. Trisin Poli Akrilamid Jel Elektroforezi (Trisin-PAGE) Malzemeleri.....	37
3.1.7. Hücre Fiksasyon Malzemeleri.....	37
3.1.8. DNA İzolasyon Malzemeleri	37
3.1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Malzemeleri	38
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Filamentöz Fungusların İzolasyonu	39
3.2.2. Filamentöz Fungus Kültürleri	39
3.2.3. Patojen Bakteri Kültürleri	40
3.2.4. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve AMP Üreticisi Filamentöz Fungusların Seleksiyonu	40
3.2.4.1. Agar Difüzyon Testi.....	40
3.2.4.2. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi.....	41
3.2.4.3. Çapraz Ekim Yöntemi.....	41
3.2.4.4. Radyal İnhibisyon Testi	42
3.2.4.5.CV Testi	42
3.2.5. Ultrafiltrasyon	43
3.2.6. Protein İzolasyonu.....	43
3.2.7. Diyaliz	43
3.2.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
3.2.9. SDS-PAGE.....	44
3.2.10. Trisin-PAGE.....	45
3.2.11. AMP Molekülünün Belirlenmesi ve Saflaştırılması.....	45

3.2.12. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi	45
3.2.13. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve).....	46
3.2.14. Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonun (MBIC) Belirlenmesi	46
3.2.15. Antibiyofilm Peptitin Sinerjik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	47
3.2.16. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	47
3.2.17. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi.....	47
3.2.18. Filamentöz Fungusun Klasik ve Moleküler Tanısı	48
3.2.18.1. Klasik Tanı.....	48
3.2.18.2.DNA İzolasyonu.....	48
3.2.18.3.ITS, Kalmodulin ve β -tubulin Bölgelerinin PZR ile Çoğaltımı.....	48
3.2.19. Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
3.2.20. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Sekans Analizi	50
3.2.21. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Maldi-TOF / MS).....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	51
4.1. Örnekleme Bölgesi.....	51
4.2. Filamentöz Fungusların İzolasyonu	51
4.3. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve AMP Üreticisi Filamentöz Fungusların Seleksiyonu	52
4.3.1. Agar Difüzyon Testi.....	53
4.3.2. Tripsin / Proteinaz K Parçalama Yöntemi.....	55
4.3.3. Çapraz Ekim Yöntemi.....	57
4.3.4. Radyal İnhibisyon Testi	58
4.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE.....	58
4.5. AMP Moleküllerinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması.....	60
4.6. MIC Değerinin Belirlenmesi.....	63
4.7. Öldürme Kinetiği Eğrisinin Değerlendirmesi	63
4.8. MBIC Değerinin Belirlenmesi	65
4.9. Sinerjik Etkileşimin Değerlendirilmesi.....	67
4.10. SEM Analizi	68
4.11. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi	71
4.12. A01 Kodlu İzolatın Klasik ve Moleküler Tanısı	72
4.12.1. Klasik Tanı	72
4.12.2. Moleküler Tanı	72

4.13. MALDİ-TOF / MS ile Proteinin Karakterizasyonu	73
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
EKLER	86
EK-1 ITS Sekans Analizi	86
EK-2 β -tubulin Sekans Analizi	87
EK-3 Kalmodulin Sekans Analizi	88
ÖZGEÇMİŞ	89



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat Derece
cfu	Koloni Oluşturan Birim
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
%	Yüzde

Kısaltmalar

A°	Angstrom
aa	Aminoasit
ABP	Antibiyofilm Polipeptitler
AMP	Antimikrobiyal Polipeptitler
BSA	Sığır Serum Albümin
c-di-GMP	Siklik Dimerik Guanozin Monofosfat
e-DNA	Ekstrasellüler DNA
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
icaADBC	İntersellüler Adezyon Lokusu
PIA	Polisakkarit İntersellüler Antijen
QS	Quorum Sensing
MBIC	Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
TCA	Trikloroasetik asit
VRSA	Vankomisin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyofilm Oluşumunun Başlangıç Aşaması..	3
Şekil 1.2. Biyofilm Oluşumu ..	4
Şekil 1.3. <i>S. aureus</i> 'da Biyofilm Oluşumu ..	6
Şekil 1.4. AMP Moleküllerinin Keşif Zamanı Çizelgesi.	9
Şekil 1.5. AMP Moleküllerinin Yapısal Olarak Sınıflandırılması..	12
Şekil 1.6. AMP'lerin Hücre Membranına Etki Şekillerinin Özeti..	15
Şekil 1.7. ABP Moleküllerinin Etki Şekilleri.....	16
Şekil 1.8. L-Alanin ve D-Alanin aa'lerinin Moleküler Görüntüsü.....	19
Şekil 1.9. Proteinlerin L, İnverso, Retro ve Retroinverso Formlarının Gösterimi..	19
Şekil 3.1. Topraktan Fungus İzolasyonu	39
Şekil 3.2. Agar Difüzyon Testinin Şematik Gösterimi.	41
Şekil 3.3. Çapraz Ekim Yönteminin Şematik Gösterimi.	41
Şekil 3.4. Radyal İnhibisyon Testinin Şematik Gösterimi.	42
Şekil 3.5. CV Testinin Şematik Gösterimi	43
Şekil 3.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Ultrafiltrasyon Kolonları.....	44
Şekil 3.7. Proteomik Çalışmalarının Akışı ...	50
Şekil 4.1. İzolasyon Petrilerinin Görüntüleri.....	52
Şekil 4.2. Ekstrasellüler Kültür Filtratı Elde Etme Deneylerinin Görüntüsü	53
Şekil 4.3. C6, LC3 Ve A01 Kodlu İzolatların Agar Difüzyon Testi Görüntüsü	55
Şekil 4.4. LC3 ve A01 İzolatlarının Kültür Filtratlarının Antibiyofilm Aktiviteleri	56
Şekil 4.5. Çapraz Ekim Yöntemi Petri Görüntüleri.....	57
Şekil 4.6. Radyal İnhibisyon Testi	58
Şekil 4.7. BSA ile Hazırlanan Standart Grafiği	59
Şekil 4.8. A01 İzolatının Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE Profili	60
Şekil 4.9. İndükleme Deneyine ait Kültür Filtratlarının SDS-PAGE Görüntüsü	61
Şekil 4.10. İndükleme Sistemine ait Kültür Filtratlarının Zon Değerlendirmesi.....	61
Şekil 4.11. Saflaştırılan AMP'nin Görüntüsü	63
Şekil 4.12. <i>S. aureus</i> 'a Karşı Öldürme Kinetiği Eğrisi.....	64
Şekil 4.13. MRSA'ya Karşı Öldürme Kinetiği Eğrisi	64
Şekil 4.14. Saflaştırılmış Polipeptitin Konsantrasyona Bağlı Antibiyofilm Aktivitesi.	66
Şekil 4.15. Saflaştırılmış Polipeptitin Konsantrasyona Bağlı Antibiyofilm Aktivitesi	67

Şekil 4.16. Sinerjik Etkileşime ait Petri Görüntüleri	68
Şekil 4.17. Peptit Uygulanmayan <i>S. aureus</i> Hücrelerinin SEM Görüntüleri.....	69
Şekil 4.18. ¼ MIC Konsantrasyonunda Polipeptit Uygulanmış <i>S. aureus</i> Hücreleri.....	69
Şekil 4.19. MIC Konsantrasyonunda Polipeptit Uygulanmış <i>S. aureus</i> Hücreleri.....	70
Şekil 4.20. MRSA Hücrelerinin SEM Görüntüleri	70
Şekil 4.21. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	71
Şekil 4.22. A01 Kodlu İzolatın Görüntüleri.....	72
Şekil 4.23. A01 İzolatını ITS, β-tubulin ve Kalmodulin PZR'larının Görüntüsü.....	73
Şekil 4.24. Skor Histogramı ..	74
Şekil 4.25. % Yoğunluk ve Kütle / Zaman Grafiği	75
Şekil 4.26. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteinin aa Dizisi.....	76
Şekil 4.27. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteininin Korunmuş Bölgesinin Gösterimi.....	76
Şekil 4.28. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteininin 3 Boyutlu Yapısı.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. AMP Moleküllerine ait Veritabanları.....	10
Çizelge 1.2. Funguslardan İzole Edilen Doğal AMP'ler	26
Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri.....	32
Çizelge 3.2. YPG Besiyeri	34
Çizelge 3.3. MTS İçeriği.....	35
Çizelge 3.4. Ayırma ve Yükleme Jeli İçerikleri	36
Çizelge 3.5. Yürütme, Boyama ve Yıkama Tamponlarının İçerikleri.....	37
Çizelge 3.6. Trisin-PAGE Tampon Çözeltileri.....	37
Çizelge 3.7. PZR Reaksiyonu	49
Çizelge 3.8. PZR Döngüsü	49
Çizelge 4.1. Agar Difüzyon Testi Sonuçları.....	54
Çizelge 4.2. MIC ve MBIC Değerleri.....	65
Çizelge 4.3. Sinerjik Etkileşim Zonlarının Belirlenmesi	67

1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, normal şartlarda organizmada bulunmayan mikroorganizmaların çoğalması ile oluşan ve ciddi tehditlerine neden olan hastalıklardır. Grip, ishal, zatürre vb. gibi çeşitli enfeksiyonlar geniş hastalık grubunu oluşturmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi yapılabiliyor olsa da, özellikle biyofilm kaynaklı hastalıklar günümüzde ciddi problemlere ve büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi ile birlikte, enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede mikroorganizma kaynaklı sekonder metabolitler kullanılmaya başlamıştır. Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasının üzerinden geçen yaklaşık 100 yılda, antibiyotiklerin yanlış kullanımı, yatay gen transferleri ve mutasyonlar gibi nedenlerle mikroorganizmalar tarafından antibiyotiklere direnç mekanizmaları geliştirilmiştir. Yine, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyo-filmelerin tedavisinde, antibiyotiğin biyofilme nüfuz edememesi neticesinde yetersiz kalınmaktadır. Bu durum bilim insanlarını yeni antibiyotik arayışına sevk etmiştir.

Biyofilm kaynaklı enfeksiyon hastalıklarında, son on yılda peptid yapılı moleküllerle tedavi denemeleri başlamıştır. Prokaryot ve ökaryot kaynaklı kısa zincirli aminoasit (aa) dizilerinin biyofilmin yok edilmesinde etkili olabildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu peptid dizilerine antibiyofilm polipeptitler (ABP) denilmektedir.

Filamentöz funguslar potansiyel olarak antibiyotik kaynağı olan mikroorganizma grubudur. Literatürde filamentöz fungus kaynaklı bir ABP bulunmamasından dolayı, mevcut tez çalışmasında, filamentöz fungusların ABP kaynağı olup olmayacağı değerlendirilmiştir.

1.1. Biyofilm

Biyofilm, mikroorganizmaların polisakkarit, ekstrasellüler DNA (e-DNA), protein ve lipitlerden oluşan matriks içerisinde gömülü olarak bulunduğu yapıdır. Biyotik veya abiyotik yüzeylerde gelişebilen biyo-filmeler, mikroorganizmaların temel yaşam formlarından birini oluşturur (Gün and Ekinci 2009). İlk kez 1978 yılında Bill Costerton

1. GİRİŞ

tarafından medikal önemi gösterilen biyofilmlerin en iyi bilinen karakteristik özelliği antimikrobiyal moleküllere karşı dirençli olmasıdır (Ehrlich and Renata Arciola 2012).

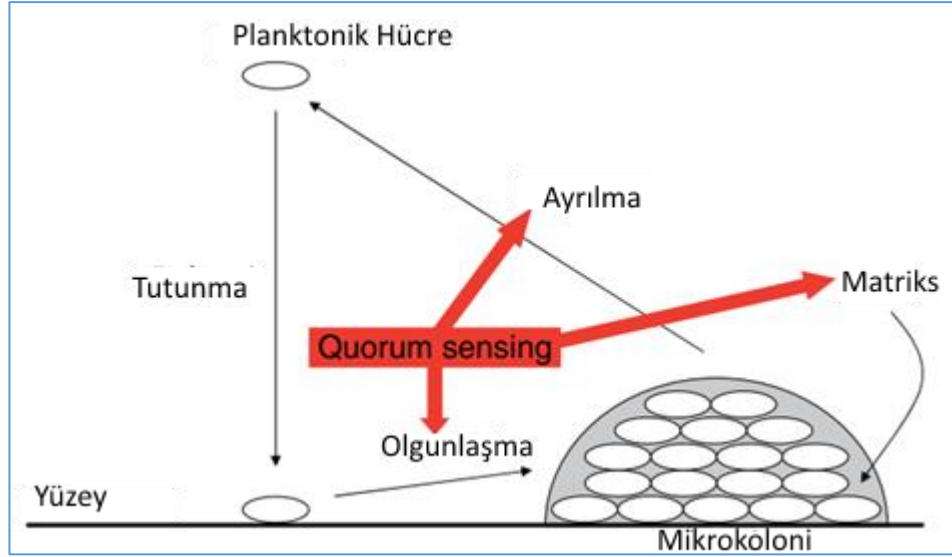
Biyofilm oluşturma kapasitesi hemen hemen tüm bakterilerde ve funguslarda ortak olan bir özelliktir. Biyofilm içerisinde birden fazla tür bulunabilir. Böyle bir biyofilm tabakası yatay gen transferi olayına açık bir ortam oluşturur. Bu bakımdan biyofilm, evrimsel olarak da önemli bir süreci kapsamaktadır (Schillaci et al. 2014).

Biyofilmler, enfeksiyon hastalıklarında büyük problemlere yol açar. Bakteriyel ve fungal biyofilmlerin, özellikle medikal implantların yüzeylerinde oluşması çok ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır (Dawgul et al. 2014). İnsanlarda biyofilm yapısının en etkili olduğu bölgelerden biri de ağızdır. Oral biyofilmler genellikle farklı türdeki mikroorganizmaları birlikte içerir. Ayrıca bu bölgede oluşan biyofilmler kalp, endodontik ve peridontik hastalıklara yol açar (Wang 2017).

1.2. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Mekanizmaları

Bakteri hücreleri yaşamlarını 3 farklı formda oluşturabilirler. Bunlar planktonik hücreler, persister hücreler ve biyofilm tabakası içindeki hücrelerdir. Planktonik hücreler serbest halde bulunan bakteri hücreleriyken, persister hücreler genetik değişikliğe uğramamış ancak antibiyotiklere direnç gösteren planktonik hücrelerdir. Bu iki hücre yapısı da biyotik veya abiyotik yüzeylere tutunarak uygun şartlarda üçüncü form olan biyofilm tabakasını oluşturur.

Biyofilm oluşumu, çevresel etkenler ve hücre-hücre etkileşimleri (quorum sensing, QS) yoluyla meydana gelir. QS, otoindüser adlı sinyal molekülleri yardımıyla hücrelerin popülasyondaki sayısının kontrolünü ve biyofilm ilişkili genlerin aktivasyonunu sağlayan mekanizmadır (Irie and Parsek 2008). Şekil 1.1'de biyofilmin başlangıç aşaması ve QS ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Biyofilm Oluşumunun Başlangıç Aşaması (Irie and Parsek 2008).

Biyofilm oluşumu türden türe değişiklik göstermektedir. Ancak genel olarak beş aşamadan oluşur. Bunlar yüzeye temas, gen ekspresyonunun değişimi ile yüzeye bağlanma, mikrokoloni oluşumu, olgun biyofilm ve dağılma aşamalarıdır. Dağılan hücreler yeni bir yüzeye temas ederek biyofilm yapısını yeniden başlatırlar (Lappin-Scott et al. 2014). Şekil 1.2’de biyofilm oluşumu ve aşamaları verilmiştir.

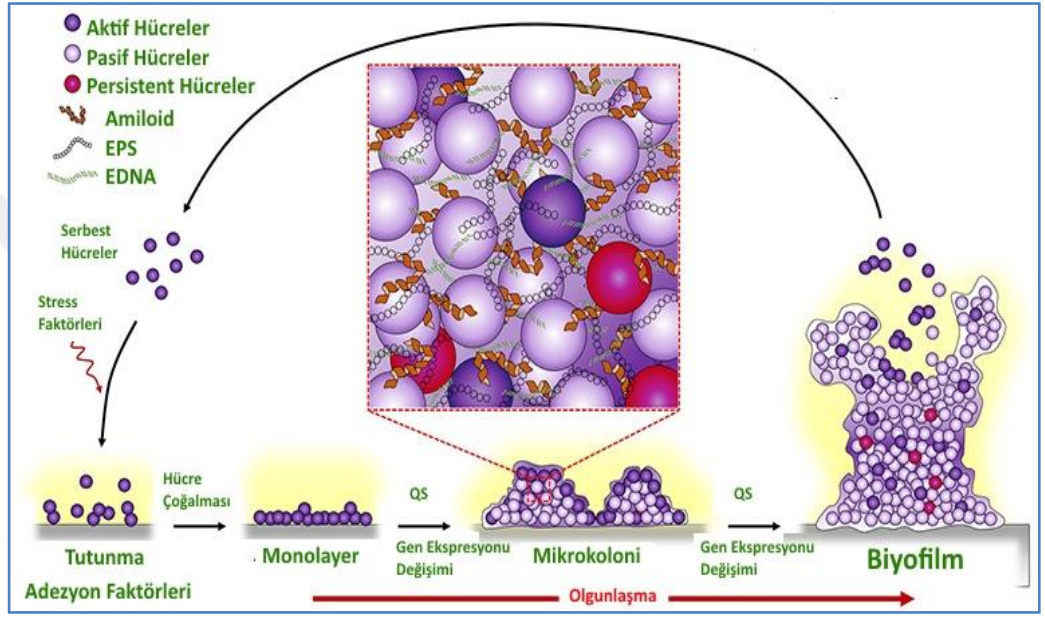
Planktonik hücrelerin biyotik veya abiyotik yüzeye tutunması zayıf etkili Van der Waals etkileşimleri ile başlatılır ve hücre yüzey yapıları yardımıyla sürdürülür. Mikrokoloni oluşumu ile planktonik hücreler bölünmeye ve çoğalmaya başlar. Bu süreç içerisinde ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) moleküllerinin üretimi gerçekleşir. EPS protein, glikoprotein, glikolipit, e-DNA ve yoğun miktarda polisakaritten oluşur. Olgunlaşan biyofilm tabakası içerisinde hücrelerin beslenmelerini sağlayan mikrokanallar ve su kanalları mevcuttur. Biyofilm tabakası taşıyamayacağı kadar hücreyi içerdiği zaman dağılma sürecine girer. Bu aşamada biyofilmden kopan hücreler yeniden planktonik hale dönüşür veya yeni bir biyofilm tabakası oluşturabilir (Schillaci et al. 2014).

EPS içerisinde bulunan hücreler planktonik olan hücrelere göre çevresel etkenlere daha dirençlidir. Biyofilm yapısı içerisindeki hücreler, planktonik hücrelerin çok çabuk etkilendiği sıcaklığa, soğuk şoklarına, pH değişikliğine ve kimyasal maddelere karşı direnç gösterirler ve antibiyotiklere karşı 10 ile 1000 kat daha fazla dirençlidirler (Donlan

1. GİRİŞ

2001). Bu özelliklerinden dolayı tedavisi oldukça zor olup, insanda oluşan bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık %80'nini oluştururlar (Dawgul et al. 2014).

Biyofilm tabakası içerisinde bulunan mikroorganizmalar birbirleri ile sürekli iletişim halindedir. Bu tabaka içinde bulunan hücreler, çevreden gelen zararlı etkenlere karşı kendilerini koruyarak, yeni genetik özellikleri de konjugasyon veya yatay gen transformasyonları yoluyla genomlarına kazandırır.



Şekil 1.2. Biyofilm Oluşumu (Reffuveille et al. 2017)

Moleküler düzeyde biyofilm oluşumu incelendiğinde, bakterilerde bulunan siklik dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP) sinyal moleküllerinin biyofilm oluşumunda önemli rol oynadığı görülür. Bu molekül bakterilerin yaşam döngüsünde ve hücrel iletişiminde önemlidir. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda bakterilerde c-di-GMP seviyesi yükselir. Bu sinyal hücrelerinin hareketliliğini azaltır ve EPS bileşenlerinin sentezini artırır. Düşük hücre içi c-di-GMP miktarı biyofilmin dağılmasına yol açar (Pletzer et al. 2016).

1.3. *Staphylococcus aureus*'da Biyofilm Yapısı

Stafilokoklar biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda en sık rastlanılan patojen cinsidir. Özellikle deri yüzeyi ve mukoza tabakasında oluşan biyofilmlerde görülür. Stafilocok kaynaklı biyofilmler ve toksinler konak organizmanın bağışıklık sistemini çökerterek kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Archer et al. 2011).

En iyi çalışılmış stafilocok türlerinden biri olan *S. aureus*, gram pozitif ve patojen bir bakteri türüdür (Muhammad et al. 2015). Heterojen protein içeriği ile glikokaliks tabakası içerisine gömülü ve çok tabakalı biyofilm yapısı oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri genelinde yılda yaklaşık 11.000 kişi antibiyotiklere dirençli *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonları sonucu hayatını kaybetmektedir (Archer et al. 2011). Ülkemizde de, son yıllarda *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların sayısında artış gözlenmektedir (Bozdoğan et al. 2013).

S. aureus'da biyofilm oluşumu kompleks genetik faktörlerin etkileşimi ile meydana gelir. *S. aureus* biyofilmi, polisakkarit intrasellüler antijen'e (PIA) bağımlı ve bağımsız olmak üzere 2 farklı şekilde oluşabilir (Otto 2008).

S. aureus kaynaklı biyofilm enfeksiyonlarında tutunma aşamasında, insan matriks proteinlerine (fibrinojen ve fibronektin) bağlanma özelliğine sahip mikrobiyal yüzey bileşen proteinleri veya mikrobiyal yapıştırıcı matriks molekülleri olarak da adlandırılan (MSCRAMM) proteinler önemli rol üstlenir (Yüksekdağ and Baltacı 2013). Bu proteinler, çeşitli korunmuş bölgeler içerir ve bakteri yüzeylerine kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler ile tutunur. Bu etkileşimlere sortaz enzimleri yardım eder. Ayrıca serin aspartat ailesine ait Sdr proteinleri ile tutunmada görevli Aap ve Otolizin At1 proteinleri kovalent olmayan etkileşimlerde rol alırlar (Archer et al. 2011).

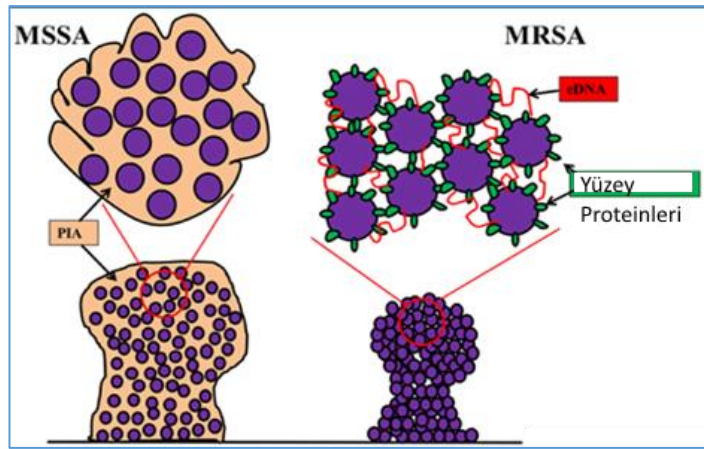
Olgunlaşma aşamasında, adezyon proteinleri, polisakkaritler ve ekzopolimer yapılar birikim gösterir. PIA, deasetillenmiş b-1,6-N-asetilglukozamin kalıntılarında oluşur. PIA, teikoik asit ve proteinlerle birlikte "slime" adı da verilen EPS tabakasının oluşumuna katkıda bulunur. PIA'nın deasetillenmesi pozitif yüklü bir karaktere

1. GİRİŞ

dönüşmesini sağlar ve bu şekilde elektrostatik etkileşimlerle negatif yüklü bakteri hücrelerini bir araya getirir (Otto 2008).

İntrasellüler adezyon (*icaADBC*) lokusu tarafından üretilen PIA, elektrostatik etkileşimlerden dolayı biyofilm oluşumu ve patojenite kazandırma özelliği bakımından önemli role sahiptir (Cramton et al. 1999). *ica* lokusu çevresel faktörlerin etkileri ile düzenlenirler. Stafilokok solunumsal cevap düzenleme (*SrrAB*) proteini anaerobik koşullarda, *icaADBC* lokusunun üst bölgesinde bulunan 100 baz çiftlik bir bölgeye bağlanarak PIA üretiminden sorumludur. *ica* lokusu glikoz, etanol ve antibiyotik gibi farklı faktörler tarafından da düzenlenir (O'Gara 2007).

Bazı *S. aureus* suşlarında *ica* lokusunun delesyonu ile biyofilm oluşumunun etkilenmediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *ica* lokusunun hiç bulunmadığı *S. aureus* suşlarında da biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca, *ica* lokusunun bulunduğu bazı suşlarda da biyofilm oluşmadığı tespit edilmiştir. Bu çelişkiler sebebiyle, *ica* lokusu ile biyofilm arasında kesin bir ilişki ortaya konulamamaktadır (Qin et al. 2007). Farklı bir protein olarak, protein A (SpA) biyofilm oluşumunda kilit rol üstlenmiş ve PIA üretimini ve teikoplanin ilişkili lokusun transkripsiyonel regülatörünü (TcaR) baskılayarak biyofilm oluşumunu indüklemiştir. Ayrıca *S. aureus*'un farklı antibiyotiklere dirençli suşları farklı moleküler mekanizmalarla biyofilm oluşumunu yönetmektedir (Schroeder et al. 2009). Şekil 1.3'te metisilin antibiyotiğine hassas (MSSA) ve dirençli olan *S. aureus* (MRSA) suşlarına ait biyofilm yapıları şematize edilmiştir.



Şekil 1.3. *S. aureus*'da Biyofilm Oluşumu. MSSA ve MRSA'da farklı şekillerde biyofilm oluşumu görülür (McCarthy et al. 2015).

PIA bağımsız biyofilm oluşumu ise *ica* lokusu dışında, arIRS sistemleri tarafından düzenlenir. arIRS bileşeni biyofilm oluşumunu baskılar. Bu genlerin delesyonu PIA üretimini arttırır ve tutunmayı aktive eder (Archer et al. 2011).

1.4. Biyofilm Kontrol Stratejileri

70 yılı aşkın bir süredir bilinen biyofilmler, biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda endokarditis, akciğer gibi canlı dokularda veya implant, kateter gibi cansız yüzeylerde mikroorganizmaların kolonize olduğu ve yüksek tutunma özelliği gösterdiği yapılardır. Biyofilm içerisindeki hücreler planktonik hücrelere göre antibiyotiklere 10 ile 1000 kat daha fazla direnç göstermektedir (Donlan 2001). Bu durum tedavi edilmeyi güçleştirir. Bu nedenle biyofilm tedavisinde yeni terapötik moleküllerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Reffuveille 2015).

Antibiyotiklerin keşfi modern tıpta bir devrimdir ve günümüz insanının hayatta kalma sebepleri arasındadır. Ancak bakteriler çeşitli stratejiler geliştirerek antibiyotik ve antimikrobiyal moleküllere karşı direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri geliştirmek medikal ve endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır (Pletzer and Hancock 2016).

Medikal alanın dışında, endüstriyel alanda da büyük ekonomik problemlere yol açan biyofilmlere karşı çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bunlara bir örnek, enzim temelli deterjandır. Bu deterjanlar gıda endüstrisinde oluşmuş farklı türden mikroorganizmaları içeren biyofilmlerin degradasyonunu sağlar (Simões et al. 2010).

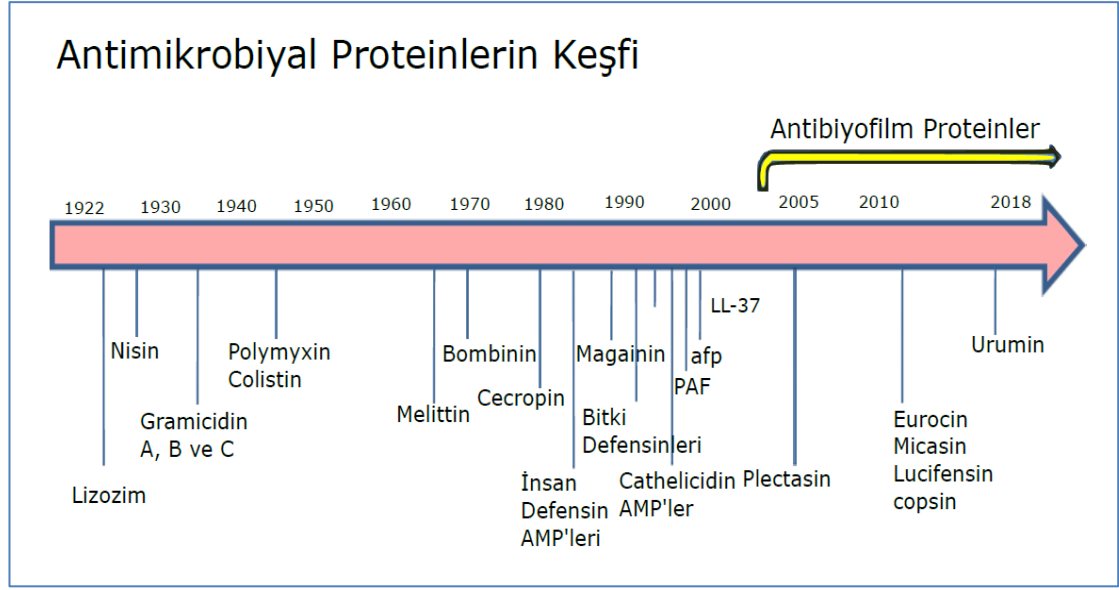
Antimikrobiyal moleküller planktonik hücrelere etki ederler. Yani serbest halde bulunan hücrelerin oluşturduğu semptomların tedavisinde kullanılırlar. Biyofilm yapısı içerisinde bulunan hücreler genellikle antimikrobiyal moleküllere karşı direnç göstermektedir. Bu nedenle, biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde QS, antagonizm mekanizmaları, antikorlar, antiadezyon molekülleri ve bakteriyofajlar son yıllarda kullanılan tedavi stratejileri arasındadır. Alternatif bir yaklaşım olarak pozitif yüklü ve amfipatik özellikteki peptid molekülleri de tespit edilmiştir (Pletzer et al. 2016).

1.5. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Peptitler

Antimikrobiyal polipeptitler (AMP) bakterilere, funguslara ve virüslere karşı etkili olan küçük, katyonik ve amfipatik polipeptit dizileridir. Genellikle 6-100 aa uzunluğunda olup, arjinin ve lizin kalıntıları içerirler. Kompozisyon, sekonder yapı, kütle ve yük olarak da çok çeşitlilik gösterirler. AMP'ler hayvanlarda, bitkilerde ve böceklerde savunma mekanizmasının bir parçası olarak sentezlenirler (Reffuveille 2015).

Lizozim (1922) ve nisin (1928) Alexander Fleming tarafından keşfedilen ilk antimikrobiyal polipeptitlerdir. *Lactobacillus lactis* tarafından üretilen katyonik özellikteki nisin, oda sıcaklığında aktiftir ve pH 2-6 arasında çalışabilme özelliği gösterir. En iyi çalışılmış AMP örnekleri arasında, polilizin ve gramicidin bulunur. Polilizin, *Streptomyces albulus* tarafından üretilen antimikrobiyal polipeptittir. Bakteriler tarafından üretilen gramicidin A, B ve C ise klinikte tedavi amacıyla kullanılan ilk antibiyotik peptitlerdir (Dubos 1939).

AMP molekülleri ile ilgili çalışmalar penisilinin keşfinden sonra gölgede kalmıştır. Ancak bakteriler tarafından antibiyotiklere direnç mekanizmalarının geliştirilmesi, 1960'lı yıllarda AMP moleküllerine olan ilgiyi yeniden arttırmıştır. Bakteri, sürüngen, bitki, böcek ve memelilerden AMP moleküllerinin keşfedilmesi ve AMP moleküllerine ait korunmuş gen bölgelerinin bulunması ile genom düzeyinde AMP çalışmalarına başlanmıştır. Şekil 1.4'te AMP moleküllerine ait keşif zamanı çizelgesi verilmiştir.



Şekil 1.4. AMP Moleküllerinin Keşif Zamanı Çizelgesi.

AMP molekülleri çok hücreli ökaryotlarda bağışıklık sisteminin önemli üyeleri olarak bulunan ve çeşitlilik gösteren polipeptit dizileridir. Bakteriler, funguslar, kurbağalar, böcekler, insanın da dahil olduğu memeli hayvanlar ve deniz canlıları AMP moleküllerinin izole edildiği canlı gruplarıdır. Bakteriyel enfeksiyonlarda savunma sisteminin ilk mücadeleci grupları AMP molekülleridir. Bu nedenle, AMP molekülleri immün sistem üzerinde düzenleyici olarak görev alırlar (Zhang and Gallo 2016).

Memelilerin epitel hücreleri tarafından üretilen AMP molekülleri genellikle bakteri, fungus ve virüs saldırıları tarafından indüklenir. AMP moleküllerinin fonksiyonları sadece antimikrobiyal olmaları değildir. Yapılan araştırmalar bu peptitlerin immün modülatör, apoptoz, antikanser, antibiyofilim, antiinflamator özelliklerinin olduğunu da göstermiştir.

1998 yılında ilk AMP veritabanı Alex Tossi ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır. Günümüzde, AMP molekülleri ile ilgili farklı veritabanları olmakla birlikte bunların içinde en kapsamlı hazırlanmış olanı “Antimicrobial Peptide Database” (APD3)’tür (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Çizelge 1.1’de AMP veritabanlarının listesi verilmiştir. Veritabanları, genellikle AMP moleküllerinin kaynağına veya özelliğine göre birbirinden ayrı olarak hazırlanmıştır.

1. GİRİŞ

Çizelge 1.1. AMP Moleküllerine ait Veritabanları

Veritabanı Adı	AMP Kaynağı	Adresi	Referans
Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP)	Genel	http://www.camp.bicnirrh.res.in	(Waghu et al. 2015)
The Antimicrobial Peptide Database	Genel	http://aps.unmc.edu/AP/main.php	(Wang et al. 2015a)
Dragon Antimicrobial Peptide Database (DAMPD)	Genel	http://apps.sanbi.ac.za/dampd	(Seshadri Sundararajan et al. 2011)
PhytAMP	Bitki	http://phytamp.hammamilab.org/main.php	(Hammami et al. 2008)
The defensins knowledgebase	Defensin	http://defensins.bii.a-star.edu.sg/	(Seebah et al. 2006)
Peptaibol Database	Peptaibol	http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/home.shtml	(Whitmore and Wallace 2004)
A database linking antimicrobial peptide (LAMP)	Genel	http://biotechlab.fudan.edu.cn/dindex.php	(Zhao et al. 2013)
Bactibase	Bakteri	http://bactibase.hammamilab.org/main.php	(Hammami et al. 2007)

AMP molekülleri, 2016 yılında revize edilen APD3 kaynaklarına göre, 7 gruba ayrılmıştır (Wang et al. 2015a). Bu gruplar, biyosentetik oluşum, biyolojik kaynak, fonksiyon, özellik, kovalent bağlanma durumu, üç boyutlu yapı ve moleküler hedeftir. Bu veritabanında, 2983 AMP molekülü kayıtlıdır. Bunların 335 tanesi bakteri, 4 tanesi arke, 8 tanesi protist, 13 tanesi fungus, 342 tanesi bitki ve 2202 tanesi hayvan kaynaklı AMP molekülleridir (Wang et al. 2015a).

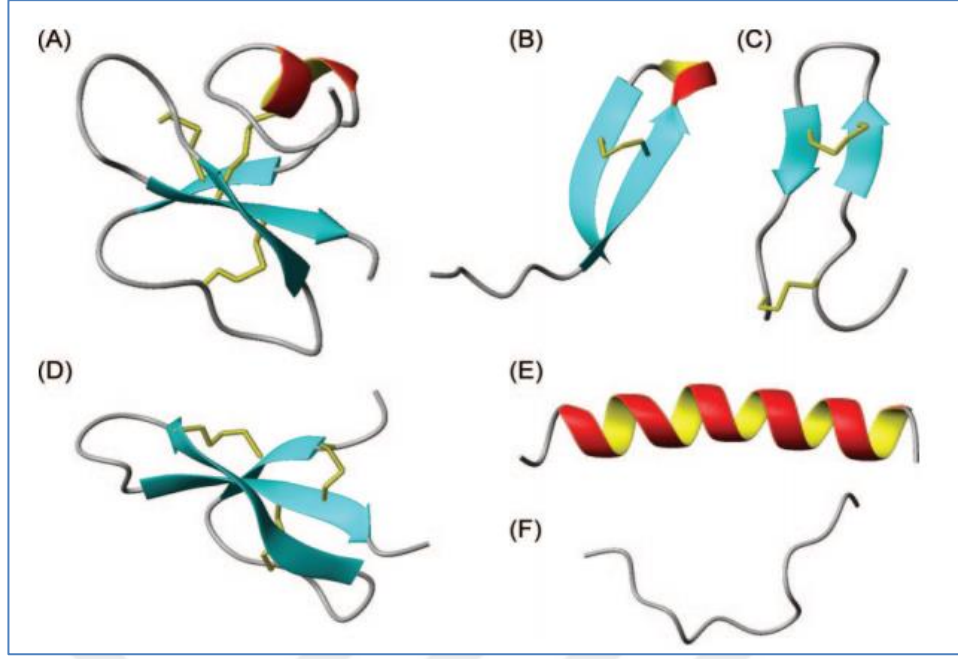
1. GİRİŞ

Doğal bağışıklık sisteminde AMP molekülleri, bakterileri öldürerek veya üremelerini inhibe ederek etki gösterirler (Hamamoto et al. 2002). Bağışıklık sisteminde AMP moleküllerinin fonksiyonlarını kaybetmesi sonucu, insan ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyon hastalıklarının oluştuğu belirlenmiştir. Kistik fibroziste görülen bakteriyel enfeksiyon ve biyofilm oluşumu bu duruma örnek olarak verilebilir (Goldman et al. 1997).

AMP moleküllerinin büyük çoğunluğu katyonik ve amfipatiktir. Yapısal olarak AMP molekülleri incelendiğinde, baskın olarak 4 yapı görülür. Bunlar, amfipatik 2 veya 4'lü β -tabaka taşıyan zincir yapısı, amfipatik α -heliks zinciri, ilmek yapısı ve uzun zincirli düzensiz yapıdır. Basit yapılı bir AMP molekülü α -heliks veya β -dönüş yapısı taşır. Her iki yapıda transmembran kanal oluşturabilme özelliğine sahiptir. α -heliks yapısı, aa başına $1,5 \text{ \AA}$ uzunluğundayken, β -dönüş yapısı ise $3,5 \text{ \AA}$ uzunluğundadır. Fosfolipit membranın hidrokarbon merkezi ise 30 \AA 'dur ve bu uzunluk yaklaşık 20 aa uzunluğuna denk gelir. Bu yaklaşıma göre, ortalama 15-20 aa uzunluğunda bir AMP molekülü teorik olarak membran yapısını bozarak etki gösterebilir (Ganz and Lehrer 1999). Şekil 1.5'te AMP moleküllerinin sekonder yapıları gösterilmiştir.

β -dönüş yapısına sahip magainin ve tachyplesin adlı doğal AMP molekülleri, bakteri membranının karakteristik özelliği olan anyonik fosfolipit tabakayı bozma eğilimindedir. Bir başka AMP molekülü örneği olan β -tabakaya sahip defensin, 3 tane korunmuş disülfit motife sahiptir. Defensin hedef membranda por yapısı oluşturur (Ganz and Lehrer 1999).

AMP molekülleri genellikle katyonik özelliktedir. Ancak insan kaynaklı AMP molekülleri arasında, istisnai olarak dermcidin adlı negatif yüklü bir AMP molekülü izole edilmiştir. Dermcidin, insan terinde bulunmaktadır (Schitteck et al. 2001).



Şekil 1.5. AMP Moleküllerinin Yapısal Olarak Sınıflandırılması. A. Karışık AMP yapısı B. İlmeği yapı C. β -tabaka yapısı D. Defensin yapısı E. α -heliks yapısı F. Uzun zincir yapısı (Jenssen et al. 2006).

ABP molekülleri ise AMP moleküllerinin bir alt grubu olup, biyofilm üzerine etki eden polipeptit dizileridir. ABP moleküllerinin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC), minimum biyofilm inhibitör konsantrasyonu (MBIC) değerinden daha yüksektir. Bu polipeptitler, 12 ile 50 aa uzunluğunda, proteazlara dirençli, +2 ile +9 net yüküne sahip olup, arjinin ve lizin aa'leri bakımından zengin yapı gösterirler (Pletzer and Hancock 2016).

AMP moleküllerinden ayrı olarak, ABP moleküllerine ait bir veritabanı (<http://www.baamps.it/>) geliştirilmiştir. Bu veri tabanında şu ana kadar 221 ABP molekülü listelenmiştir (Di Luca et al. 2015).

ABP ve AMP molekülleri arasında aktivite bakımından bir örtüşme görülmez. Örneğin, *Burkholderia* türlerinin oluşturduğu biyofilmler, *in vitro* şartlarda, AMP molekülleri ile tedavi edilemezken, ABP molekülleri ile tedavi edilebilir (de la Fuente-Núñez et al. 2012).

Yaşamın tüm formlarından 2600'den fazla antimikrobiyal özellikte polipeptit izole edilmiştir. AMP ve ABP molekülleri yüksek yapıli organizmalarda bağışıklık

1. GİRİŞ

sisteminin bir parçasıdır. ABP molekülleri, AMP moleküllerine benzer aa kompozisyonuna sahip olmalarına rağmen yapısal olarak farklı aktivite gösterirler (Wang et al. 2015a; Pletzer et al. 2016).

ABP molekülleri çeşitli şekillerde biyofilmlere etki ederler. ABP molekülleri, biyofilm içerisindeki antibiyotik dirençli bakterileri öldürerek veya antibiyotiklerle sinerjik etki oluşturarak enfeksiyonlarla mücadele ederler (Jenssen et al. 2006; Pletzer and Hancock 2016).

İnsan cathelicidin LL-37 peptidi fizyolojik koşullarda çok düşük aktiviteye sahip bir AMP molekülüdür. Ancak bu peptit, *Pseudomonas* cinsinde planktonik hücreleri öldürdüğü değerden 16 kat daha düşük bir değerde biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir (Overhage et al. 2008). Bu deneysel çalışma antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitenin birbirinden bağımsız özellikler olduğunu göstermektedir (Pletzer and Hancock 2016).

ABP molekülleri, fungal biyofilmlere karşı da aktivite gösterirler. Katelisinidin'den türevlendirilmiş peptit AS10, *Candida albicans*'ın biyofilm yapısına karşı, planktonik hücrelere olan etkisinden 200 kat daha fazla etkilidir (De Brucker et al. 2014).

IDR-1018, antibiyofilm özelliğinde geniş spektruma sahip sentetik bir polipeptittir. 10 µg/ml konsantrasyonunda mikroorganizmaları öldürme özelliğindeyken, 0,8 µg/ml konsantrasyonunda biyofilmlerin dağılmasına yol açar. Ayrıca bu polipeptit akış ortamındaki biyofilmlerin de dağılmasına yol açmaktadır (Mansour et al. 2015). IDR-1018 polipeptiti farklı türlerden mikroorganizmaların birlikte oluşturdukları dental biyofilmleri de bozmaktadır (Wang et al. 2015b).

1.5.1. AMP ve ABP Moleküllerinin Genetik Sentez Mekanizmaları

AMP ve ABP molekülleri, bitkiler, omurgalılar ve omurgasızlarda savunma sisteminin bir parçası olarak ribozomal veya ribozomal olmayan yollarla sentezlenirler. Birçok AMP molekülü devamlı olarak sentezlenir. Bununla birlikte, yaralanmalarda, çeşitli enfeksiyonlarda veya inflamasyon durumlarında sentezlenen AMP molekülleri de mevcuttur (Zhang and Gallo 2016). Bu durum, çeşitli sinyal

1. GİRİŞ

mekanizmalarının sentez yolağında görevli olduğunu göstermektedir (Pletzer et al. 2016). Birçok AMP, büyük öncül moleküller olarak sentezlenir ve proteolitik kesim süreçlerine maruz kalır.

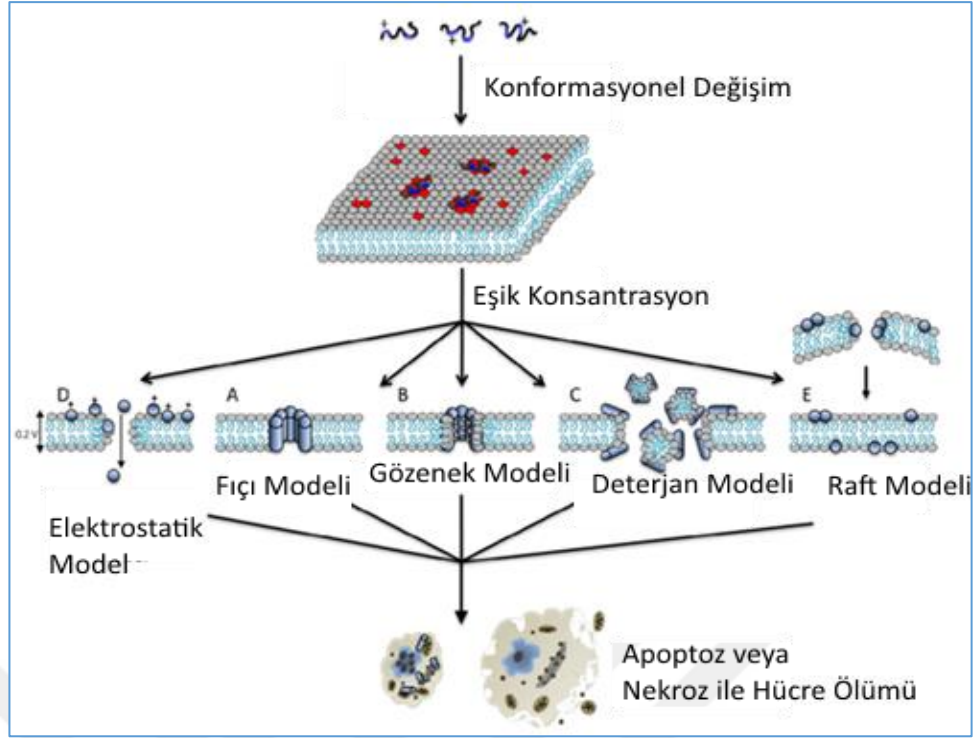
Genellikle, AMP molekülleri, N-terminal ucunda sinyal dizisi taşıyan öncül büyük proteinler halinde sentezlenir. C-terminal bölgelerinde ise antimikrobiyal protein domaini taşırlar. Sentez ve salgılanma aşamalarında üretildikleri hücreye zarar vermemek için inaktif formda kalan AMP molekülleri, proteolitik kesimler ile aktif proteinler haline dönüşürler. Örneğin, en iyi çalışılmış insan AMP molekülü LL-37, hCAP18 öncül proteininin serin proteinaz enzimi ile kesimi sonucu oluşturulur (Pletzer et al. 2016; Pletzer and Hancock 2016).

İndüklenme sistemine örnek olarak β -defensin çeşitlerinden biri olan tracheal antimikrobiyal peptit (TAP) verilebilir. Bu peptit, epitel hücrelerde bakteri enfeksiyonu olduğu zaman sentezlenir. Lipopolisakkarit reseptörleri aracılığı ile başlayan sinyal sürecinde Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) kompleksi iş görür. NF- κ B bağlanma motifleri TAP geninin promotör bölgesinde bulunur ve enfeksiyon sürecinde sentezi başlatılır (Zasloff 2002).

Ribozomal yolla sentezlenen AMP moleküllerinden başka ribozomal olmayan yollardan da sentezlenen AMP molekülleri mevcuttur. Bunlar, peptit sentetaz enzimleri ile enzimatik yollarla sentezlenen, kısa aa zincirleridir. Ribozomal olmayan AMP molekülleri genellikle bakteri ve funguslar tarafından sentezlenir. Bu AMP moleküllerine örnek olarak polimiksin, vankomisin ve teiksobaktin peptit antibiyotikleri verilebilir (Hancock and Chapple 1999).

1.6. AMP ve ABP'lerin Etki Mekanizmaları

AMP ve ABP molekülleri genel olarak mikroorganizmaların hücre membranı yapısını bozarak etki gösterirler. ABP molekülleri AMP moleküllerinden farklı olarak, hücrelerin yüzeye tutunmalarını ve birbirleriyle olan iletişimlerini engelleyerek biyofilm oluşumunu önler (Kumar et al. 2018).



Şekil 1.6. AMP'lerin Hücre Membranına Etki Şekillerinin Özeti (Camilio 2013).

Etki mekanizması olarak, literatürde çeşitli tahmini modeller bulunmaktadır. Etki mekanizmaları hücre membran yapısını bozmak şeklinde olsa da bu etkiyi gösterme biçimleri birbirlerinden farklı olabilmektedir. Tahmin edilen bu modellere göre bir AMP molekülü, hücre membranında por yapısı oluşturabilir. Membran geçirgenliğini bozarak hücrenin elektrostabilitesini bozabilir. Membran yapısındaki fosfolipid tabakasında deterjan benzeri etki göstererek misel oluşturabilir. Şekil 1.6'da AMP ve ABP moleküllerinin hücre membranı üzerinde oluşturdukları etkilere ait tahmin edilen modellerin özeti verilmiştir. Şekil 1.7'de ise ABP moleküllerinin etki şekilleri gösterilmiştir.

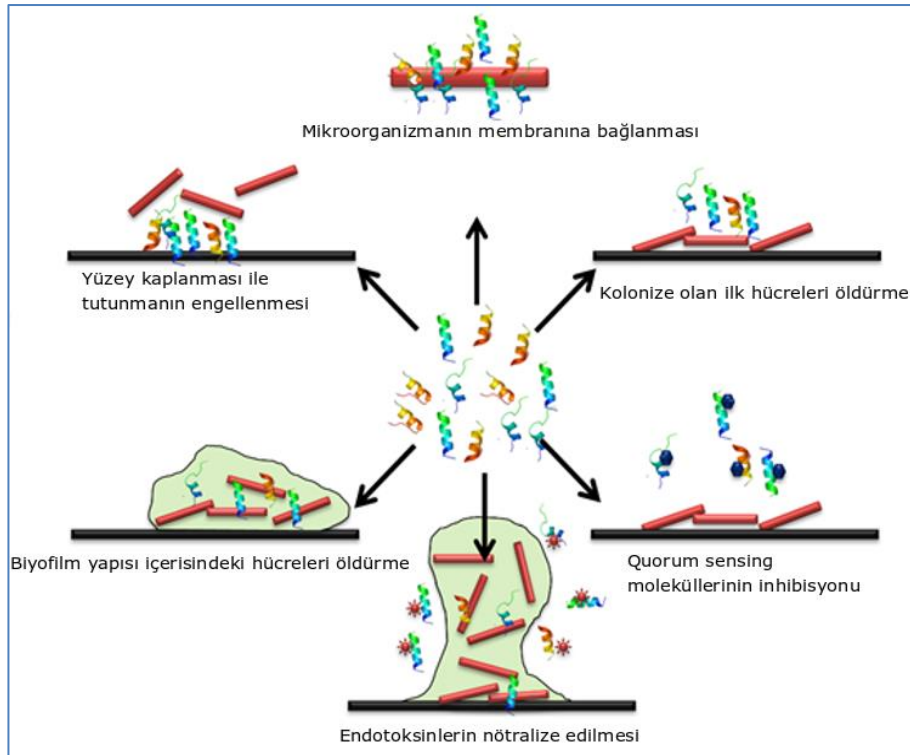
Gram pozitif ve gram negatif bakterilerde hücre içi sekonder mesajcı moleküller bulunmaktadır. Bu sinyal moleküllerini, ppGpp, c-di-GMP, cAMP ve cGMP molekülleri kapsar ve bakterilerde kolonizasyon, adezyon, hareket, konakçı ile iletişim ve biyofilm oluşumu gibi bir çok metabolik yolda görev alırlar (Pletzer et al. 2016). ABP moleküllerinin hücre içi etki mekanizmalarında bir hedef olarak, bu sinyal molekülleri gösterilebilir. Örneğin, antibiyofilm peptit IDR-1018, DJK-5 ve DJK-6 molekülleri, ppGpp sinyal moleküllerine bağlanır ve degradasyonuna yol açar. Bu şekilde bu sinyal

1. GİRİŞ

molekülün hücre içerisinde birikmesi önlenir. Bu mekanizma, gram pozitif ve gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumunu inhibe eder (de la Fuente-Núñez et al. 2012).

Sentetik KT2 ve RT2 adlı triptofanca zengin katyonik antimikrobiyal peptitlerin *Escherichia coli* O157:H7 suşuna MIC değerinden daha düşük bir değerde antibiyofilm aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu peptitler negatif yüklü lipopolisakkarit moleküllerine bağlanarak membrandan kolayca geçer ve sitoplazmik fosfolipitlerle etkileşir. Bu mekanizma sırasında por oluşumu ve agregasyon gerçekleşmez (Anunthawan et al. 2015).

AMP molekülleri stafilokokların hücre yüzeyi yüklerine, eksopolimer yapısına ve bakteriyel pompa yapılarına etki eder (Joo and Otto 2015). Stafilokoklarda 3 tane antimikrobiyal peptit sensör (aps) sistemi vardır. İlk kez *Staphylococcus epidermidis*'te keşfedilmiş olan bu sistem ApsS (Histidin Kinaz), ApsR (Regülatör) ve ApsX proteinlerinden oluşur. ApsS, AMP duyarlı membran proteinidir ve ekstrasellüler bölgede negatif yüklü 9 aa taşır. AMP bu bölgeyi bloklayarak etki gösterir. Stafilokoklardaki Aps sistemi LL-37 ve indolicidin peptitleri tarafından tanınır (Li et al. 2007).



Şekil 1.7. ABP Moleküllerinin Etki Şekilleri (BIOFIN, Prediction of Biofilm-Inhibiting Peptides veritabanından Türkçe'ye uyarlanmıştır.).

Klinik açıdan biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyofilm peptitlerle dağıtılması tehlikeli sonuçlara yol açabilir. Biyofilm yapısı içerisinde dağılan hücreler farklı organları enfekte edebilir ve septik şoklara yol açabilir. Bu nedenle antibiyofilm peptitlerin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde canlıya verilmesi önemli yararlar sağlar (Pletzer and Hancock 2016).

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerde strese karşı cevap mekanizması evrimsel olarak korunmuştur. *P. aeruginosa*'nın bu mekanizması içinde bulunan RelA ve SpoT homolog proteinleri hücre içi ppGpp miktarını düzenlemekten sorumludur. *S. aureus* ise farklı olarak RelA/SpoT homologu olarak Rsh proteinini sentezler. Rsh proteini strese cevap mekanizmasında ve biyofilm oluşumunda oldukça önemlidir. RelA ve SpoT proteinlerinin delesyonlu olduğu hücreler biyofilm oluşturamazlar. (p)ppGpp molekülünün biyofilm üzerindeki tam rolü aydınlatılamamış olmasına rağmen, peptit 1018, DJK-5 ve DJK-6 antibiyofilm peptitleri ppGpp moleküllerine bağlanarak degradasyonunu sağlarlar (Pletzer and Hancock 2016).

Yüksek dozda kullanılan antibiyotikler biyofilm yapısını bozmaz. Aksine, bakterilerin antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesine yol açar. Bu nedenle düşük konsantrasyonlarda antibiyofilm peptit ve antibiyotiklerin birlikte kullanımı direnç mekanizmasını tetiklemeden tedavi olanağı sağlar (Reffuveille 2015).

Bir başka mekanizma örneği olarak, buforin II adlı AMP molekülü verilebilir. Buforin II, membran yapısını bozmadan hücre içerisine geçer ve DNA'ya bağlanarak bakteri hücrelerinin ölümüne yol açar. Lantibiotic ve mersacidin AMP molekülleri ise lipit sentez yollarını bozarak bakteri ölümüne yol açar (Brötz et al. 1998; Brogden 2005). İndolicidin adlı AMP antimikrobiyal özelliği dışında, antiviral özellikte taşır ve HIV virüsünün zarf yapısını hedefler (Robinson et al. 1998).

1.7. Antibiyofilm Aktivite ve Protein Yapısının İlişkisi

Antibiyofilm özelliğine sahip peptit moleküllerinin aa dizilimleri anyonik, kationik, hidrofobik, amfipatik olma özelliklerini değiştirir. Bu bakımdan peptit

1. GİRİŞ

dizilerinin primer yapıları oldukça önemlidir. ABP molekülleri genellikle hidrofobik ve katyonik olma özelliğindedir (de la Fuente-Núñez et al. 2015).

Biyofilm tabakaları su, polisakkarit, protein, e-DNA ve lipid içeren EPS yapısı taşıdığından bu tabakaların yıkımları oldukça zordur. Antibiyofilm özellikteki bileşiklerin hedefleri ekstrasellüler matriks tabakası olmakla birlikte, katyonik özellikteki ABP moleküllerinin hedefi hücre membranıdır (Sharma et al. 2016).

Doğal AMP ve ABP molekülleri, konağın patojenlerle karşılaştıklarında ürettikleri ve antibiyotiklere alternatif özellikteki katyonik peptitlerdir. Bu moleküllerden biri olarak LL-37 ABP molekülü örnek verilebilir. Bu molekül *P. aeruginosa*'nın planktonik hücrelerine karşı 64 µg/ml'den daha büyük MIC değerine sahiptir. Ancak bu değerden 16 kat daha küçük MBIC değerine sahip olan bu molekül antibiyofilm özellik gösterir (Reffuveille 2015; Pletzer et al. 2016; Pletzer and Hancock 2016; Sharma et al. 2016).

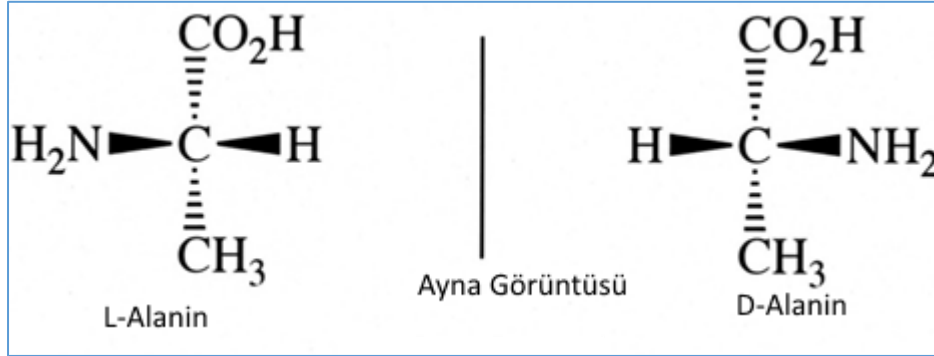
Peptit moleküllerinin proteazlara karşı dayanıklı olması tercih edilir. Doğal peptitlerin en büyük sınırlaması bakteriyel proteazlar tarafından çok kısa sürede degrade edilmesi ve uzun süre stabil kalamamasıdır. Bu durumlar sentetik AMP ve ABP üretimini zorunlu hale getirmektedir (de la Fuente-Núñez et al. 2015).

ABP ve AMP moleküllerinin primer dizilerinde birbirinden ayırt edilebilecek özel sinyal molekülleri bulunmamaktadır. Bu nedenle yeni nesil peptit antibiyotik tasarımında doğal AMP ve ABP moleküllerinin ikisi de kalıp olarak ana omurgayı oluşturmaktadır. Omurgayı geliştirerek, AMP ve ABP moleküllerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri arttırmak sentetik peptit çalışmalarının ana hedefini oluşturmaktadır (Powell et al. 1995; Rao and Zhong 1997; Blecha and Shi 1998).

L-peptitler, genellikle canlıların doğal olarak üretimini yaptıkları proteinlerdir. Bu proteinler, proteazlara karşı dayanıklı değildir. D-peptitler ise L-peptitlerin post translasyonel modifikasyonları sonucu oluşur ve L-peptitlerin ayna görüntüsüdür. Şekil 1.8'de L ve D-alanin aa'inin moleküler görüntüleri verilmiştir. Kurbağa derisinde sentezlenen AMP molekülleri bu D-peptitlere örnek olarak verilebilir. D-peptitler

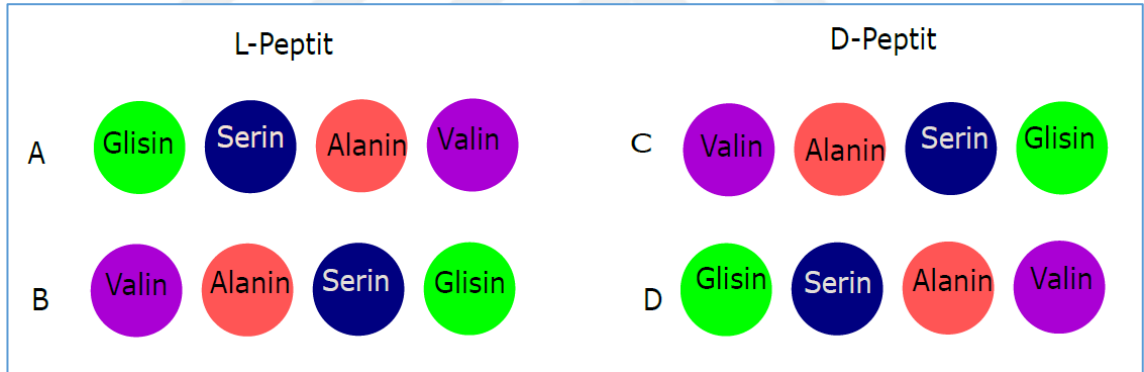
1. GİRİŞ

proteazlara karşı daha dirençlidirler (Blecha and Shi 1998; de la Fuente-Núñez et al. 2015).



Şekil 1.8. L-alanin ve D-alanin aa'lerinin Moleküler Görüntüsü.

Bir başka peptit formu da retroinverso D-peptit molekülüdür. Bu moleküller L-aa dizisinin ters döndüğü D-aa dizileridir. Bu peptitler uzun süreli proteolitik degradasyondan korunurlar.



Şekil 1.9. Proteinlerin L, İnverso ve Retro ve Retroinverso Formlarının Gösterimi. A. Peptitin L formu, B. Peptitin inverso formu C. Peptitin retroinverso Formu D. Peptitin Retro formu.

Doğal antibiyofilm peptitler, sentetik olan antibiyofilm peptitlerin çıkış noktasını oluşturmaktadır. Antibiyofilm özelliğın geliştirilmesi için aa dizisine, eklemeler veya çıkarmalar yapılmaktadır. Ayrıca proteinlerin retroinverso yapıları oluşturulmaktadır. Elde edilen tüm diziler MIC ve MBIC değerlendirmeleri ile aktiviteleri karşılaştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, proteinin konfigürasyonu ve dizi çevrimlerinin direk olarak aktivite değişimi ile ilişkili olmadığı da gösterilmiştir.

1.8. Filamentöz Funguslar ve Biyoteknolojik Önemi

Çok eski dönemlerden beri funguslar, yiyecek olarak kullanılmalarının yanı sıra, tıbbi amaçlar doğrultusunda da kullanılmıştır. Günümüzde, özellikle Çin’de yüzden fazla fungus türü geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Basidiomisetler; antibakteriyel, antiviral, antioksidant, antifungal, antiinflamator, antitümoral ve immunomodulator etki gibi geniş farmakolojik özellikler gösterirler. Askomisetler ise immunomodulator, antitumor ve hipoglisemik aktivite taşır (Akkara and Tosun 2014).

Dünya genelinde 5 milyon civarında fungus türü olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan ortalama 100.000’i tanılanmıştır. Bu fungusların ise çok azı farmakolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Mikroskopik fungusların tıbbi kullanımı için biyoaktif molekül araştırmaları üzerine olan çalışmalar, bu bağlamda büyük potansiyel taşımaktadır (Asan 2010).

Funguslar, ekosistemde karbon, azot ve fosfor döngülerinin kilit taşlarını oluştururlar. Enzim, organik asit, antibiyotik, pigment, alkol, polisakkarit, protein ve vitamin üreten funguslar endüstriyel açıdan büyük potansiyele sahiptir. Mikroorganizmalar biyosferin hemen hemen her tabakasında bulunmaktadır. Filamentöz funguslar da toprak ekosisteminin yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır ki bu oran oldukça önemli mikrobiyal kaynağı oluşturmaktadır (Kim et al. 2007; Akkara and Tosun 2014). Özetle, filamentöz funguslar, ekonomik değeri çok yüksek olan ürünler üretirler. Çok pahalı olmayan besiyerlerinde yetiştirilebiliyor olmaları onların ekonomik önemini daha da arttırmaktadır.

Hayvanlar ve funguslar ökaryotik organizmalar olmalarından dolayı ortak özellikler taşırlar. Ayrıca, ökaryotik canlıları etkileyen *E. coli* ve *S. aureus* gibi patojen bakterilere karşı benzer tepkiler gösterirler. Fungusların savunma sistemlerinin hayvanlara olan benzerliği dolayısıyla funguslar en iyi antibiyotik kaynağı olarak belirtilmektedir (Zjawiony 2004).

1.9. Filamentöz Fungusların Proteomiği

Proteomik, genom tarafından eksprese edilen proteinlerin sistematik analizidir. Filamentöz fungusların proteomik çalışmaları, 2000’li yıllarda fungal genomların sekanslanması sonucu hız kazanmıştır. Fungal proteomik, endüstriyel ürünlerin geliştirilmesi amacıyla biyoteknolojik olarak büyük potansiyele sahiptir ve bilinmeyenlerle dolu bir alanı oluşturmaktadır (Kim et al. 2007; de Oliveira and de Graaff 2011).

Fungal proteomik iki gruba ayrılmaktadır. Birincisi, sitoplazmik ve organellerin proteinleridir. İkincisi ise hücre dışına salgılanan proteinlerdir ki bunlara sekreteproteomik adı verilir (Kim et al. 2007).

Farklı fungus türleri, çok sayıda proteini hücre dışı ortama salgılar. Fungusların oluşturduğu bu sekreteproteom, hücre dışı sindirimin ve savunma mekanizmalarının bir parçasını oluşturur. İlk olarak, Lee Gun Dong ve arkadaşları 1999 yılında, *Aspergillus niger*’den Anafp adlı antifungal peptidi izole etmişlerdir (Lee et al. 1999). Ancak, fungal sekretomla ilgili öncü çalışmalar, 2005 yılında Martha Medina ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır. Bu araştırmacılar, *Aspergillus flavus* ile çalışarak, fungus proteomiği çalışmaları için protokolleri ve hücre dışına salgılanan proteinlerin tanımlanmasına ait metodları göstermişlerdir (Medina et al. 2005). 2006 yılında Oda ve arkadaşları *Aspergillus oryzae* fungusunda, ekstrasellüler proteinlerin profillerini belirlemişlerdir (Oda et al. 2006).

Doğada konak ve patojen arasında gerçekleşen karşılıklı etkileşimde (cross-streak) ekstrasellüler proteinlerin önemli bir rolü vardır. Dolayısıyla üretilen sekretomlar, patogeneze özgü olarak üretilmektedir. Buna bitki ve fungal patojenler arasındaki karşılaştırmalı proteomik analizler örnek olarak gösterilebilir (Kim et al. 2007).

Filamentöz fungusların dış ortama salgıladıkları antimikrobiyal özellikteki polipeptitler, asidik izoelektrik noktalı proteinlerdir. Bu polipeptitlerin arasında, serin proteazları sıklıkla bulunur. Genler tarafından kodlanan bu peptitlerin primer dizileri glisin, sistein, histidin, prolin, tirozin, arjinin, lizin ve serin aa’lerini yüksek oranda

taşınır. Genellikle küçük molekül ağırlıklıdır (5-8 kDa) (de Oliveira and de Graaff 2011).

1.10. Filamentöz Fungus Kaynaklı Antimikrobiyal Peptitler

Filamentöz funguslar, *Penicillium chrysogenum*'dan penisilinin keşfedilmesi ile antibiyotik kaynağı olarak kullanılmaya başlamıştır. Filamentöz funguslar 1990'lı yıllarda antifungal proteinlerin (AFP) keşfi ile antibiyotik kaynağı olarak ön plana çıkmış ve 2000'li yıllarda defensin benzeri proteinlerin tanımlanması ile potansiyel AMP kaynağı olmuştur.

Funguslar tarafından üretilen AMP molekülleri, genellikle ekstrasellüler ortama salınır. Memeli canlılarda, AMP molekülleri genellikle defensin ve katelisidin olmak üzere iki ana grupta toplanır. Defensin, hem omurgalı hem de omurgasızlarda en fazla bulunan AMP grubudur. Yapılan çalışmalarda, fungus kaynaklı katelisidin grubu AMP molekülü olmadığını ancak defensin proteinlerinin funguslar arasında oldukça yaygın olduğu görülmektedir.

AFP ve defensin benzeri proteinlerin tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan yöntem genom taramasıdır. Bu yöntemde, cDNA elde edilip, bunun çeşitli sistemlerde eksprese edilmesi uygulanır. *Pseudopeziza nigrella* saprofitik fungusundan bu yöntemle sentezlenen plektasin adlı protein literatüre kazandırılan ilk fungal defensindir (Mygind et al. 2005). Çizelge 1.2'de filamentöz fungus kaynaklı AMP'lerin listesi verilmiştir.

Defensin benzeri polipeptitlerin funguslardan sekansları, *in silico* cDNA tarama yöntemiyle belirlenebilir. Bu, diğer tarama yöntemlerinden çok daha basit ve daha ucuz bir yöntemdir. Son çalışmalarda, genom tarama stratejileri yardımıyla filamentöz funguslardan 100'den fazla AMP molekülü keşfedilmiştir. Ancak bu moleküllerin bir çoğu *in vivo* da aktif değildir.

Peptaibol, başka bir fungus AMP molekülü grubudur. Özellikle, *Trichoderma*, *Emerizopsis* ve *Gliocladium* türleri sekonder metabolit olarak peptaibollerini üretirler.

Peptaiboller antifungal ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Chugh and Wallace 2001; Whitmore and Wallace 2004).

1.10.1. Defensin Benzeri Proteinler

Defensin, sistein bakımından zengin, katyonik ve evrimsel olarak korunan AMP molekül gruplarından biridir. Defensinler, 2 veya 3 tane disülfid bağı oluşturabilen, 6 ile 10 adet sistein kalıntısı içerir. Genellikle antifungal özellik gösterirler. Defensinler, cis-defensin ve trans-defensin olmak üzere iki gruba ayrılır.

Funguslar tarafından sentezlenen defensin benzeri proteinler üzerinde çalışmalar oldukça fazladır. Özellikle genom tarama çalışmaları ile defensin genlerini tespit edebilir.

Mygind ve arkadaşları 2005 yılında ilk kez saprofitik bir fungus olan *P. nigrella*'dan plektasin adlı bir peptit antibiyotik keşfetmişlerdir. Plektasin, hayvanlardaki defensin ile yapısal olarak benzerdir. Plektasinin, *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bu peptit, funguslardan izole edilen ilk defensin benzeri polipeptittir. Plektasin, filamentöz fungusların AMP kaynağı olarak kullanılmasının yolunu açmıştır. Plektasin, hücre duvarı öncülü lipid II'ye bağlanarak etki yapmaktadır (Mygind et al. 2005; Schneider et al. 2010).

Endofitik fungus *Fusarium tricinctum* başka bir antimikrobiyal peptit kaynağıdır. Trtesin, *F. tricinctum*'dan elde edilen fungal defensindir. Bu antimikrobiyal peptit, bitki patojenlerine ve *Fusarium oxysporum*'a karşı aktiftir (Tejesvi et al. 2013).

Oeemig ve arkadaşları 2012 yılında, askomiset üyesi olan *Eurotium amstelodami*'nin eurosin adlı β -tabaka yapısında defensin proteini ürettiğini göstermişlerdir. Eurosinin, gram pozitif bakterilerin üremelerini *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Eurosinin mekanizması plektasin gibi lipid II öncülüne bağlanmak şeklindedir. Hücre zarı ile etkileşime girmemekle birlikte, eurosin, insan patojeni olan *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerinin peptidoglikan biyosentezini inhibe eder (Oeemig et al. 2012).

1. GİRİŞ

Zhu ve arkadaşları 2012 yılında, *Microsporium canis*'ten 17 fungal defensin benzeri peptidin olduğunu göstermiştir. Bunlardan biri olan mikasin, hayvanlarda defensinlere sekans bakımından yaklaşık % 60 benzerdir. Mikasin *in vivo* şartlarda *S. aureus* (MRSA) ve *P. aeruginosa*'yı inhibe etmektedir (Zhu et al. 2012).

Qi ve arkadaşları 2001 yılında, *Rhizomucor pusillus* tarafından üretilen sillusin adı verilen antimikrobiyal peptidi keşfettiler. Bu peptidin, 30 aa ve 4 disülfid bağına sahip olduğunu ve RNA metabolizmalarına etki ettiğini bildirilmiştir (Qi et al. 2001).

Literatürde defensin benzeri proteinler dışında, gen dizisinde korunmuş bölge bakımından defensinlerden farklı olan fungus kaynaklı antifungal proteinler (AFP)'de bulunmaktadır. AFP grubu yaklaşık 85-100 aa uzunluğunda, antifungal protein domain içeren AMP molekülleridir. Genellikle askomisetler tarafından sentezlenir.

Aspergillus giganteus kaynaklı afp, *fusarium* türlerine karşı inhibitör etki gösterir. Bu afp molekülü, hücre duvarında bulunan kitin ile etkileşime girerek funguslarda strese yol açar. Bir başka AFP örneği de *P. chrysogenum*'dan elde edilmiştir. *P. chrysogenum*'un, kültür ortamına 12 kDa'lık bir protein olan PAF molekülünü salgıladığı ve memeli hücreleri üzerinde toksik etkisi olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, iyi bir antifungal ilaç adayıdır. Dizi analizleri, PAF ve afp'nin homolog proteinler olduğunu göstermektedir ve bunların ekspresyonlarının karbon kaynağına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Marx et al. 1995; Mygind et al. 2005).

1.10.2. Peptaiboller

Peptaiboller, funguslardan izole edilen büyük bir peptit grubudur. 5 ila 20 aa kalıntısı arasında kısa aa zincirine sahiptirler ve ribozomal olmayan yolla üretilirler (Rebuffat et al. 1995). Peptaiboller hem antifungal hem de antibakteriyel özellik gösterir. Peptaiboller hakkında bir veritabanı Lee Whitmore (<http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk>) tarafından derlenmiştir. Bu veri tabanında 317 peptaibol listelenmiştir, ancak bugün yaklaşık 450 peptaibol tanımlanmıştır. Bu peptitlerin yaklaşık yarısı *Trichoderma* cinsine aittir. Peptaibollerin N-terminali ve C-terminali genellikle alkol fonksiyonel gruplara sahiptir (Whitmore and Wallace 2004).

1. GİRİŞ

Amfipatik özelliklerinden dolayı, peptaiboller membran üzerinde kanal oluşturabilirler. Bu şekilde, peptaiboller hücre içindeki iyonik ve ozmotik dengeyi bozar. Peptaiboller ayrıca hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) yükseltir. ROS seviyesindeki artış, hücrenin apoptozuna yol açar (Chugh and Wallace 2001).

Alamethicin, *Trichoderma viride*'den elde edilen ve en çok çalışılan peptaibollerden biridir (Meyer and Reusser 1967). Bu molekül, membran da por yapısı oluşturarak etki gösterir. Trichokonin, *Trichoderma pseudokoningii*'den elde edilen bir peptaibol örneğidir. *Bacillus subtilis* üzerinde morfolojik değişiklikler ile inhibe edici etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Su et al. 2012).



1. GİRİŞ

Çizelge 1.2. Funguslardan İzole Edilen Doğal AMP'ler. *

Tür	Defensin Benzeri Proteinler & AFP'ler
<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Plektasin
<i>Fusarium tricinctum</i>	Trtesin
<i>Aspergillus nidulans</i>	Echinocandin B
<i>Penicillium canescens</i>	d-Phe-l-Val-d- Val-l-Tyr
<i>Eurotium amstelodami</i>	Eurosin
<i>Coprinopsis cinerea (Mushroom)</i>	Copsin
<i>Aspergillus giganteus</i>	afp
<i>Aspergillus oryzae</i>	Oryzeasin
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PAF
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Sillusin
<i>Microsporum canis</i>	Mikasin
<i>Aspergillus clavatus</i>	Antifungal protein (AcAFP)
<i>Neosartorya fischeri</i>	Antifungal protein 2 (NFAP)
	Peptaibol
<i>Trichoderma viride</i>	Alamethicin
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Trichokonin

*Fungal AMP'ler, defensin benzeri proteinler, antifungal proteinler ve peptaiboller olarak gruplara ayrılırlar.

1.11. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Günümüzde bakteriler tarafından antibiyotiklere direnç mekanizmaları hızla evrilmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip ve biyofilm oluşturan bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlar dünya genelinde, ciddi ölümlere ve sağlık endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle yeni nesil antibiyotik arayışları hızla devam etmektedir.

Literatürde filamentöz fungus kaynaklı doğal AMP molekülleri olmasına rağmen ABP molekülü ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, filamentöz funguslardan doğal antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteye sahip polipeptit moleküllerinin izolasyonunun ve karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nakaya ve arkadaşları (1990) *Aspergillus giganteus* adlı filamentöz fungusun antifungal protein (afp) saflaştırması yapmışlardır. Bu çalışma ile afp'nin aa dizilimini ve disülfid köprülerinin yerlerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada afp'nin fosfolipaz A2 proteini ile aynı atasal genden gelebileceğini öne sürmüşlerdir (Nakaya et al. 1990).

Marx ve arkadaşları (1995) *Penicillium chrysogenum* adlı filamentöz fungusun 12 kDa ağırlığında, antifungal aktiviteye sahip bir protein'in (PAF) varlığını göstermişlerdir. Bu proteinin, laboratuvar koşullarında sukrozun tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyeri ortamında üretildiği ve %2'lik glikoz varlığında üretilmediği rapor edilmiştir. Protein karakterizasyonu için iyon değişim kromatografisi ve HPLC yöntemleri kullanılmış, ardından N-terminal bölgesi dizilenmiştir. Elde edilen dizi, veritabanı karşılaştırması ile daha önceden dizilenmiş *A. giganteus* filamentöz fungusunun afp proteini ile yüksek derecede homoloji gösterdiği bulunmuştur (Marx et al. 1995).

Mygind ve arkadaşları (2005) ilk kez saprofit filamentöz funguslarından olan *Pseudoplectania nigrella*'dan defensin benzeri AMP molekülü izole etmişlerdir. Plektasin adlı bu AMP, 40 aa uzunluğunda olup örümcek, sinek ve akrep gibi canlılardan izole edilen defensin proteinleri ile benzer primer yapıya sahiptir. Plektasinin *Streptococcus pneumoniae*'a karşı öldürücü etki gösterdiği ve yapılan *in vivo* testlerde farelere karşı çok düşük toksisite gösterdiği tespit edilmiştir (Mygind et al. 2005).

Park ve arkadaşları (2008) *Aspergillus oryzae* türünden 17 kDa ağırlığında antimikrobiyal protein (exAP-AO17) izole etmişlerdir. Bu AMP, *Fusarium moniliforme* ve *Colletotrichum coccodes* gibi patojenik funguslar ile *E. coli* O157 ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Ayrıca, exAP-AO17'nin üretiminin fizyolojik koşullar tarafından çok fazla değişkenlik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Park et al. 2008).

Schneider ve arkadaşları (2010), önceki çalışmalarında izole edilen plektasinin etki mekanizmasını ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında plektasinin, bakterilerin hücre

duvarı öncülü olan Lipid II'ye direk olarak bağlanarak hücre duvarı biyosentez yolağını bozduğunu tespit etmişlerdir (Schneider et al. 2010).

Plektasinin keşfinden sonra filamentöz funguslarında AMP kaynağı olabileceği düşünülerek genom boyutunda defensin taramaları yapılmıştır. Zhu ve arkadaşları (2012) dermatofit funguslardan olan *Microsporium canis*'te 17 adet defensin benzeri proteinin (fDLP) varlığını rapor etmişlerdir. Bunlardan ikisinin adı mikasin ve mikasin-1'dir. Bu çalışmada araştırmacılar düşük konsantrasyonlardan dolayı geleneksel kültür metodları ile mikasin adlı fDLP izole edememişlerdir. İzolasyonları 2 basamaklı nested PCR ile gerçekleştirmişlerdir (Zhu et al. 2012).

Tejesvi ve arkadaşları (2012), endofitik filamentöz funguslardan olan *Fusarium tricinctum*'dan *Candida albicans*, *C. utilis* ve *Staphylococcus carnosus* karşı antimikrobiyal etkili AMP molekülü izole etmişlerdir. Trtesin isimli bu AMP'nin, 6 kDa ağırlığında olduğu ve birçok bakteri türüne karşı 64 µg/µl MIC değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Tejesvi et al. 2013).

Oeeming ve arkadaşları (2012), eurosin isimli yeni bir fungal defensin tanımlamışlardır. *Eurotium amstelodami*'den cDNA klonlama metodu ile elde ettikleri diziyi *Aspergillus oryzae* ekspresyon sistemi ile ürettirmişlerdir. Eurosinin gram pozitif bakterilere karşı gram negatif bakterilere nazaran daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Oeemig et al. 2012).

Bacillus subtilis antimikrobiyal bileşik üreticisi bir türdür. Yapılan çalışmalarda farklı *B. subtilis* izolatları kullanılarak farklı özelliklerde AMP moleküllerinin üretimi gerçekleştirmişlerdir. Baindara ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmalarda, topraktan izole ettikleri *B. subtilis* izolatından bakteriyosin izolasyonu gerçekleştirerek, Maldi-TOF/MS ile karakterizasyonunu yapmışlardır (Baindara et al. 2013). Teixeira ve arkadaşlarının (2013) yapmış oldukları çalışmada, mevcut tez çalışmasında kullanılan metodları kullanarak, *B. subtilis* (ATCC 6633) suşundan *Haemophilus parasuis* enfeksiyonlarına karşı kullanılabilecek antimikrobiyal peptit izole ederek, Maldi-TOF/TOF analizi ile proteini karakterize etmişlerdir (Teixeira et al. 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Muhammad ve diğerleri (2015), topraktan AMP üreticisi bakterilerin izolasyonu için üç teknik önermişlerdir. Bu teknikler, jel yatırma yöntemi, çapraz çizgi yöntemi, agar difüzyon testidir (Muhammad et al. 2015).

Lim ve arkadaşları (2016) yapmış oldukları antimikrobiyal peptit karakterizasyon çalışmasında, *Bacillus amyloliquefaciens*'ten bakteriyosin grubundan AMP molekülünün üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu bakteriyosinin, α -amilaz, pepsin ve lipaz enzimlerinin varlığında aktivite kaybetmediği rapor edilmiştir. Ayrıca, pH 3-8 aralığında aktivitesi değişmemiştir. Sıcaklıktan çok az etkilenen bakteriyosinin, 100°C'de 30 dakika inkübasyonu sonucu aktivitesi % 20 oranında azalmıştır. Bu çalışmada, *B. amyloliquefaciens*'in endüstriyel öneminden dolayı, tıp alanında ve gıda korumasında kullanılabilecek bir AMP olabileceğini önermişlerdir (Lim et al. 2016).

Mohamed ve arkadaşları (2016) WR12 ve D-IK8 adlı kısa sentetik AMP moleküllerinin *S. aureus* enfeksiyonları üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Özellikle MRSA ve VRSA suşlarının klinik izolatlarına etkili olan bu peptitler, biyofilm üzerine de etkili sonuçlar vermiştir. Araştırmacılar, klinik çalışmalarda kullanılabilecek peptitleri göstererek karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır (Mohamed et al. 2016).

Boon Lim ve arkadaşları (2016) topraktan antimikrobiyal protein üreticisi bakteri taraması yapmışlar ve izole ettikleri *B. 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 bildirmişlerdir (Lim et al. 2016).

Doğal AMP moleküllerinin araştırma çalışmaları devam etmekle birlikte, bulunan bu AMP'leri *in vivo* koşullarda daha aktif hale getirmek ve klinikte kullanımlarını sağlamak için sentetik üretimleri ve modifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Fuente Nuez ve arkadaşları (2015) proteinlerin retroinverso, L ve D formları arasındaki aktivite farklarını incelemişlerdir. *In vitro* çalışmalarda, L ve D formları aynı etkiyi gösterdiği, *in vivo* ise D-formları daha aktif olmaktadır. İstisnası olmakla birlikte, yaptıkları karşılaştırmada D-proteinlerin proteazlara karşı daha dirençli olduklarını göstermişlerdir (de la Fuente-Núñez et al. 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tucker ve arkadaşları (2018), bakteriler tarafından AMP moleküllerine direnç mekanizmalarının geliştirmesi sebebiyle yeni bir peptit tarama yöntemi geliştirmişlerdir. Rastgele sentezlenen yaklaşık 800.000 peptitin antimikrobiyal aktivitesi bu yöntemle tanımlanabildiğini bildirmişlerdir. Yöntem kısaca, sentetik olarak oluşturulan dizilerin plazmidlere ligasyonu ve bu plazmidlerin bakterilere toplu şekilde klonlanmasıdır. İndükleyici moleküller yardımı ile üretimi yaptırılan peptitlerden antimikrobiyal aktivitesi olanlar diğer bakterileri öldürerek selekte olurlar. Kalan plazmidlerin çoğaltılması ile binlerce sekans arasında aktif sekansa sahip plazmidler elde edilir (Tucker et al. 2018).

Haney ve arkadaşları (2018) antibiyofilm peptit tarama çalışmalarında *in siliko* metodlarla (SPOT Sentezi) sentezlenen peptitlerin antibiyofilm aktivitelerini taramışlardır. MRSA biyofilmine etki eden peptit 1018'in varyantları arasında bu peptitten daha yüksek aktiviteye sahip sentetik peptitlerin olduğu bu çalışma ile bulunmuştur (Haney et al. 2018)

Günümüzde doğal antimikrobiyal ve antibiyofilm polipeptit tarama çalışmaları devam etmektedir. Bununla birlikte mevcut aa dizilerinin modifikasyonları gerçekleştirilerek daha etkili polipeptitler literatüre kazandırılmaya çalışılmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında bulunmaktadır. Cihazların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Cihaz Adı	Model
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini Protean Tetra Cell
Elisa Plak Okuyucu	Biotek EPOCH
Hassas Terazi	Shimadzu ATX 224
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
Maldi TOF MS	4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (AB Sciex)
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST 3100F
PZR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Taramalı elektron Mikroskobu	FEI Quanta 250
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

3.1.2. Sarf Malzemeler

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

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları

3.1.3.1. Patates Dekstroz Agar

Patates dekstroz agar (PDA), 1 L'sinde 20 g dekstroz, 15 g agar ve 4 g patates infüzyonu bulunan bir besiyeridir. Ticari olarak satın alınmış toz besiyerinden 39 g tartılarak, 1 L saf suya eklenmiştir. Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.3.2. Kloramfenikol ve Rose Bengal Agar

Kloramfenikol ve rose bengal agar (RBCA) dekstroz, magnezyum sülfat, pepton, rose bengal, kloramfenikol ve agardan oluşan bir besiyeridir. Ticari olarak satın alınmış toz besiyerinden 31 g tartılmış ve saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.3.3. Yeast Pepton Glikoz Besiyeri

Yeast pepton glikoz (YPG) besiyeri filamentöz funguslardan antimikrobiyal aktif polipeptit üretimi için kullanılan besiyeridir (Park et al. 2008). Besiyeri içeriği Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. pH'ı % 37'lik HCl ile 6,2 olacak şekilde ayarlanıp, otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

Çizelge 3.2. YPG Besiyeri

İçerik	Miktar
Maya Özütü	10 g/L
Pepton	20 g/L
Glikoz	20 g/L
Mineral Tuz Solüsyonu	1 ml/L

3.1.3.4. Luria-Bertani Agar

Luria-Bertani (LB) agar besiyeri 1 L’inde, 10 g tripton, 15 g agar, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl olan standart bakteri besiyeridir. Ticari olarak alınan toz besiyerinden 40 g tartılarak 1 L’de çözülmüştür. Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.3.5. Luria-Bertani Broth

LB broth besiyeri, LB agar besiyerinin agar eklenmemiş halidir. Ticari olarak satın alınan toz bileşenden 25 g alınarak 1 L suda çözülmüştür. Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

3.1.3.6. Mueller-Hinton Agar

Muller Hiltone Agar (MHA), 1 L’inde 17,5 g kazein, 2 g et özütü, 1,5 g nişasta ve 15 g agar bulunan, antimikrobiyal testlerde tercih edilen besiyeri türüdür. 36 g ticari formülasyon tartılarak, 1 L’de çözülmüştür. Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.3.7. Mueller-Hilton Broth

MHA besiyerinin agar eklenmemiş halidir. Bu besiyeri Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) belirlenmesinde “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) tarafından önerilen besiyeridir. Ticari formülasyondan 26,5 g MHB tartılarak 1 L’de çözülmüş ve otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

3.1.3.8. Soft Besiyerleri

Soft besiyerleri, MHB besiyerlerinin içerisine % 0,8 agar eklenerek hazırlanmıştır. Bu besiyeri agar difüzyon testinde kullanılmıştır.

3.1.3.9. Mineral Tuz Solüsyonu

Mineral tuz solüsyonu (MTS) çeşitli eser elementleri içeren solüsyondur (Park et al. 2008). YPG besiyerinin içeriğinde kullanılmıştır. Çizelge 3.3’te MTS’nin içeriği verilmiştir.

Çizelge 3.3. MTS içeriği

İçerik	Miktar
KH ₂ PO ₄	1,4 g/L
(NH ₄)SO ₄	6 g/L
MgSO ₄	750 mg/L
NaCl	750 mg/L
CuCl ₂ .H ₂ O	15 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	75 µg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	75 µg/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	75 µg/L

3.1.4. Biyofilm Testi Solüsyonları

3.1.4.1. %1'lik Kristal Viyole Boyası

Granül halindeki kristal viyole (CV) boyasından 0,5 g olarak tartılmış ve 35 ml %96'lık etil alkolde çözülmüştür. Üzerine 15 ml saf su eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.1.4.2. % 30'luk Asetik Asit

35 ml saf suyun üzerine yavaş yavaş olacak şekilde %99,9'luk asetik asitten 15 ml ilave edilmiştir.

3.1.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) Malzemeleri

Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) proteinleri yüklerinden bağımsız olarak, moleküler ağırlıklarına göre ayırmak amacıyla kullanılır. SDS-PAGE jeli, ayırma ve yükleme jeli olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Çizelge 3.4'te jel içerikleri verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ayırma ve Yükleme Jeli İçerikleri

% 15'lik Ayırma Jeli	% 15'lik Yükleme Jeli
dH ₂ O → 2,8 ml	dH ₂ O → 3,6 ml
2 M Tris (pH:8.8) → 1,95 ml	1 M Tris (pH:6.8) → 625 µl
% 30 Akrilamid Karışımı → 5 ml	% 30 Akrilamid Karışımı → 670 µl
% 10 SDS → 100 µl	% 10 SDS → 50 µl
% 10 APS → 100 µl	% 10 APS → 50 µl
TEMED → 10 µl	TEMED → 5 µl

Çizelge 3.5'de SDS-PAGE yürütme, boyama, yıkama solüsyonlarının içeriği verilmiştir. Verilen miktarlar 1 L içindir.

Çizelge 3.5. Yürütme, Boyama ve Yıkama Tamponlarının İçerikleri.

Yürütme Tamponu	Boyama Tamponu	Yıkama Tamponu
3 g Tris	1 g Coomasie Brilliant Blue R	100 ml Asetik asit
14,4 g Glisin	100 ml Asetik asit	300 ml Etanol
1 g SDS	300 ml Etanol	600 ml dH ₂ O
	600 ml dH ₂ O	

3.1.6. Trisin Poli Akrilamid Jel Elektrofrez (Trisin-PAGE) Malzemeleri

Trisin-PAGE, 1-100 kDa aralığındaki proteinlerin görüntülenmesinde kullanılan bir jel sistemidir (Schägger 2006). Tez çalışmasında kullanılan Trisin-PAGE jeli (Mini-PROTEAN® Tris/Tricine Precast Gels), BioRad firmasından temin edilmiştir. Yürütme ve örnek yükleme tamponları formülleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Trisin-PAGE tampon çözeltileri

Yürütme Tamponu (10X, 1L)	Yükleme Tamponu
100 mM Tris	200 mM Tris-HCl (pH:6,8)
100 mM Trisin	% 40 Gliserol
% 0,1 SDS	% 2 SDS
pH:8,3	% 0,04 Coomasie G-250

3.1.7. Hücre Fiksasyon Malzemeleri

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) analizi öncesi hücre fiksasyonu, % 5'lik glutaraldehid ile yapılmıştır. Yıkama solüsyonları olarak % 100, % 90, % 50, %30 etil alkol kullanılmıştır (Liu et al. 2016).

3.1.8. DNA İzolasyon Malzemeleri

DNA izolasyonu, fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) ekstraksiyonu ile yapılır. Liziz tamponu içeriğinde, 50 mM 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraasetik

3. MATERYAL ve YÖNTEM

asit (EDTA), % 3 SDS, 100 mM Tris-HCl (pH:8.0) bulunur. DNA çöktürme aşamasında, % 100 etil alkol kullanılmıştır.

3.1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Malzemeleri

PZR için taq polimeraz enzimi kiti (Sigma) kullanılmıştır. PZR görüntüleme için % 1'lik agaroz jel, ticari olarak satın alınmış 1X tris-asetat-EDTA (TAE) tampon ile hazırlanarak yapılmıştır.

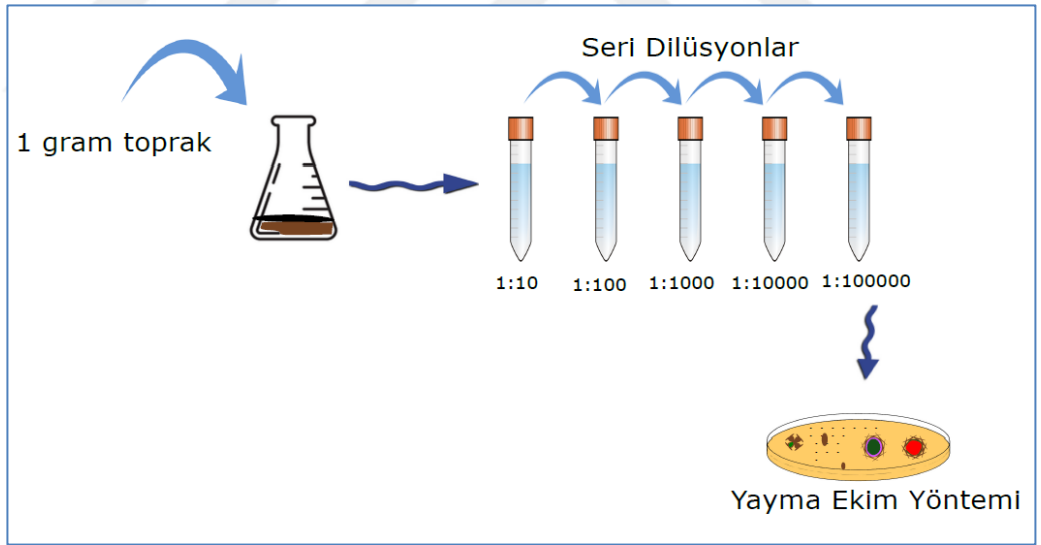


3.2. Yöntem

3.2.1. Filamentöz Fungusların İzolasyonu

Bu tez çalışmasında, filamentöz fungus izolasyonları topraktan yapılmıştır. Toprak örnekleri, Erzurum ilinde bulunan, 1800 m ve daha üzeri rakıma sahip bölgelerden alınmıştır.

Topraktan fungusların izolasyonu için toprak dilüzyon metodu kullanılmıştır. Kısaca, 1 g toprak alınmış ve 10 ml distile dH₂O'ya eklenmiştir. 1 dakika vorteks yapılarak, 1 ml örnek alınmış ve 9 ml distile dH₂O ile dilüe edilmiştir. 10⁻⁶ seyreltmeden alınan 100 µl örnek, RBCA ve PDA besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Petriler, 1 hafta 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde günlük olarak takip edilerek, oluşan fungus kolonileri PDA besiyerine alınmıştır (Pepper et al. 2011; Souza-Motta et al. 2003). Şekil 3.1'de deneyin şematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1. Topraktan Fungus İzolasyonu.

3.2.2. Filamentöz Fungus Kültürleri

Saflaştırılan filamentöz funguslar, PDA besiyerinde 25 °C'de inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir. Stok besiyeri ise yatık agarda yapılmış ve 3 haftaya kadar +4 °C'de saklanmıştır Ekstrasellüler ortama salgılanan AMP ve ABP molekülü üreticisi

izolatların ön seleksiyonu, PDA besiyerinde yetişen 7 günlük filamentöz funguslardan 6 mm mantar delici ile alınan 10 adet diskin, 100 ml'lik YPG besiyerine inokule edilmesi ile yapılmıştır. İnokulasyon 25°C, 150 rpm koşullarında 7 gün sürdürülmüştür.

3.2.3. Patojen Bakteri Kültürleri

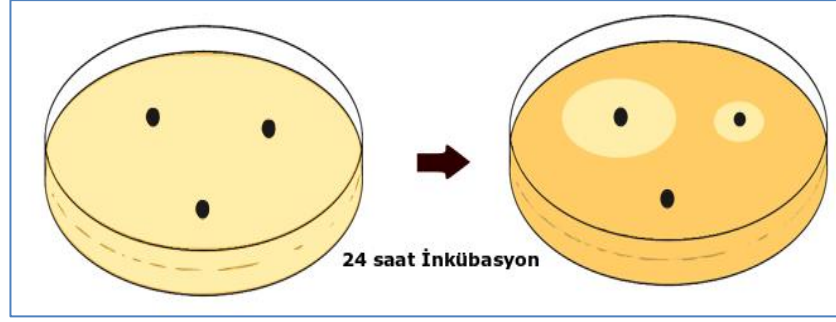
Tez çalışmasında kullanılan patojenik suşlar, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'dır. Tüm bakteri suşları, MHA besiyerinde 37°C'de 1 günlük inkübasyonlar ile geliştirilmiştir.

3.2.4. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve AMP Üreticisi Filamentöz Fungusların Seleksiyonu

Antimikrobiyal özellikte polipeptitlerin ön seleksiyonu amacıyla, YPG besiyerinde geliştirilen filamentöz fungusların hücresel kısımları ve kültür filtratları birbirlerinden süzme ve 10 dakika 9000 rpm'de yapılan santrifüjleme ile ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.2.4.1. Agar Difüzyon Testi

Antimikrobiyal aktivite belirleme amacıyla agar difüzyon testi kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan, soft MHA besiyeri ile dökme plak yöntemi yapılmıştır. Bu petriler içine, 6 mm mantar delici ile kuyular açılarak, 200 µl kültür filtratı eklenmiş ve petriler düz pozisyonda 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Şekil 3.2'de deneyin şematik olarak gösterimi verilmiştir (Wiegand et al. 2008).



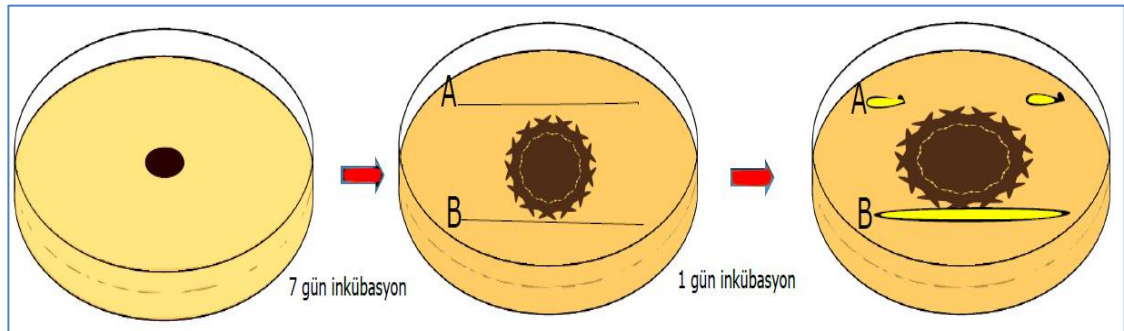
Şekil 3.2. Agar Difüzyon Testinin Şematik Gösterimi.

3.2.4.2. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi

Antimikrobiyal aktivitenin protein kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılan bu yöntemde, hüresiz kültür filtratlarının pH'sı 7'ye ayarlanarak proteazların çalışmasına uygun hale getirilmiştir. 10 mg/ml tripsin ve 10 mg/ml proteinaz K ile 37 °C'de 6 saat muamele edilmiş ve süre sonunda 100 °C'de 5 dakika bekletilerek, proteazlar inaktif edilmiştir (Dusane et al. 2013).

3.2.4.3. Çapraz Ekim Yöntemi

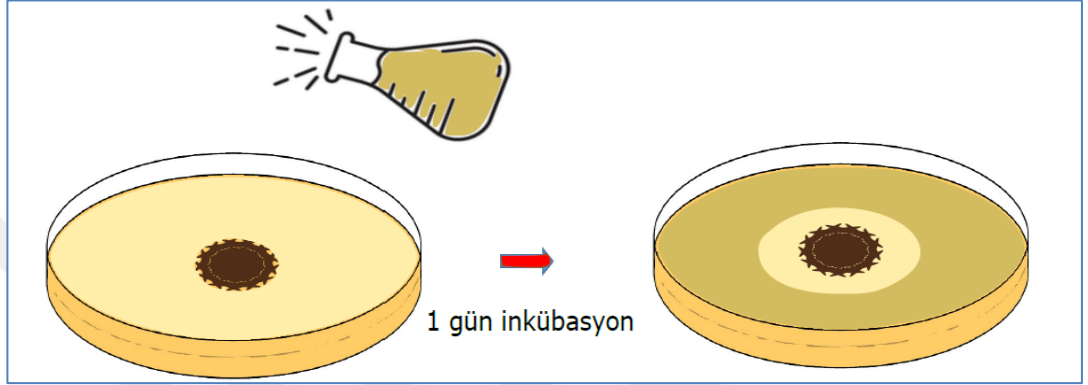
Filamentöz funguslardan 6 mm mantar delici ile disk alınmış ve 25°C'de 7 gün süreyle YPG agar besiyerinde geliştirilmiştir. 7. gün referans bakteri suşları fungus gelişim bölgesine 1 cm kalacak şekilde çizgi ekim ile ekilmiştir. 8. günde ise bakterilerin gelişimleri değerlendirilmiştir. Şekil 3.3'te deneyin şematik olarak gösterimi verilmiştir. Bu şekilde A bakterisinin petrinin ortasına disk alınarak yerleştirilen filamentöz fungus varlığında gelişmediği, B bakterisinin ise geliştiği gösterilmiştir (Muhammad et al. 2015).



Şekil 3.3. Çapraz Ekim Yönteminin Şematik Gösterimi.

3.2.4.4. Radyal İnhibisyon Testi

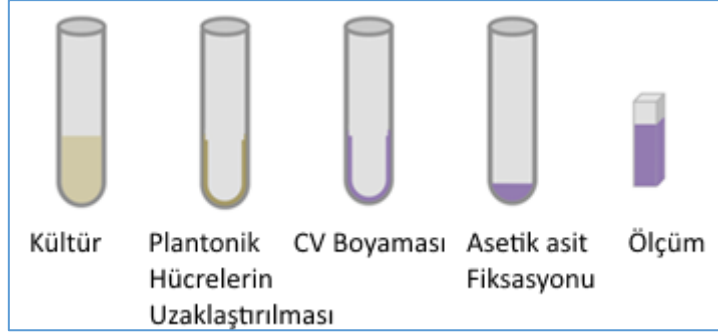
Filamentöz funguslardan 6 mm mantar delici ile disk alınarak, 25°C’de 7 gün YPG agar besiyerinde geliştirilmiştir. Süre sonunda referans bakteri suşları dökme plak şeklinde fungus kültürünün üzerine inokule edilmiştir. 24 saat sonra, inhibisyon zonu değerlendirilmiştir. Şekil 3.4’te deneyin şematik olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.4. Radyal İnhibisyon Testinin Şematik Gösterimi.

3.2.4.5. CV Testi

Antibiyofilm aktivite belirleme amacıyla, CV testi yapılmıştır. Bu test, biyofilm oluşumunun inhibisyonunu göstermektedir. Polistren özellikteki 96 kuyulu plaklara antimikrobiyal aktivite gösteren kültür filtratı eklenmiş 100 µl MHB besiyeri ve 100 µl 0,5 McFarland’a ayarlanmış bakteri hücreleri eklenerek 37°C’de 48 saat statik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüm besiyeri içeriği atılarak, 3 kez PBS ile tüm kuyular yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücreler, % 0,5’lik CV ile 20 dakika boyanmış ve süre sonunda boyanın fazlası musluk suyu ile temizlenmiştir. %30’luk asetik asit ile fiksasyonun ardından, 590 nm’de ölçüm alınmıştır. Şekil 3.5’te deneyin şematik olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.5. CV Testinin Şematik Gösterimi.

3.2.5. Ultrafiltrasyon

Kültür filtratlarının yoğunlaştırılması amacıyla ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. AMP ve ABP üreticisi fungusun seleksiyonu çalışmalarında kullanılan hüresiz kültür filtratlarının 12 ml'si alınıp, ultrafiltrasyon tüplerine eklenmiş ve 6000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından kolonun üst kısmında kalan yoğunlaşmış kültür filtratı yeni tüplere alınmıştır (Dusane et al. 2013).

3.2.6. Protein İzolasyonu

Konsantre kültür filtratı örneği, eşit hacimde %20 TCA ile pipetaj yardımı ile karıştırılmış ve -20 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda, 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. 3 kez %70'lik etanol ile yıkanarak 13.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve son olarak, aseton ile yıkama yapılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan pellet, ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.7. Diyaliz

Proteinleri asitlerden, tuzdan ve kimyasallardan arındırmak için 3 kDa moleküler ağırlık cut-off (MWCO) özelliğindeki ultrafiltrasyon kolonları ile diyaliz işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Ultrafiltrasyon Kolonları.

3.2.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu, Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Hazırlanan 1X Bradford solüsyonundan 96 kuyulu plaklara 90 µl alınmış ve üzerine 10 µl protein örneği eklenmiştir. 10 dakika inkübasyonun ardından, 590 nm’de ölçüm alınmıştır. Sığır serum albümini (BSA) ile hazırlanan standart grafiğin formülü kullanılarak protein konsantrasyonu belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.2.9. SDS-PAGE

SDS-PAGE, proteinleri moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayırmak için kullanan elektroforez sistemidir. Bu sistem kullanılarak, 1-100 kDa proteinleri görünür hale getirmek için yüksek akrilamid oranına sahip %15’lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır.

Protein örnekleri, 4X yükleme boyası ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve 1X konsantrasyonu halinde 95 °C’de 5 dakika kaynatılmıştır. Süre sonunda örnekler, sekonder yapıların oluşmasını engellemek amacıyla buza alınmıştır. Hazırlanan jele yüklenen örnekler, 70 V’da 3 saat yürütülmüştür. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, coomassie R-250 boyası ile 20 dakika boyanmış ve proteinlerin görüntülenmesi amacıyla yıkama solüsyonunda 2 saat bırakılmıştır. Görünür hale getirilen jelin, Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.10. Trisin-PAGE

Trisin-PAGE, 1-100 kDa proteinlerin görüntülenmesinde kullanılan, elektroforetik jel sistemidir. Akrilamid oranının düşük olması hidrofobik proteinler için uygunluğunu göstermekte ve bu nedenle SDS-PAGE yöntemine göre daha iyi bir ayırım sağlamaktadır. Tampon sistemleri farklı olmasına rağmen uygulaması SDS-PAGE ile aynıdır. SDS-PAGE uygulamasından farkı ise göç hızı ve süresinin düşük olmasıdır. Trisin-PAGE uygulamasında hazırlanan proteinler, 125 V, 140-150 mA/jel ve 2saat süre ile yürütülmüştür (Schägger 2006).

3.2.11. AMP Molekülünün Belirlenmesi ve Saflaştırılması

AMP ve ABP üreticisi filamentöz fungusun belirlenmesinin aksine, AMP ve ABP moleküllerinin belirlenmesi deneyleri, bu tez çalışmasında daha önceden kullanılmamış bir yaklaşım ile yapılmıştır. İndükleme sistemi olarak adlandırdığımız bu yöntemde, patojenik bakteri türleri MHB besiyerinde 37°C ve 150 rpm'de 2 gün geliştirilmiştir. A grubu olarak, bu kültürlerin hücresiz kültür filtratları alınmış, B grubu olarak ise bu kültürlerin otoklavlanmış halleri alınmıştır. 25°C ve 150 rpm koşullarında, 100 ml'lik sıvı kültürlerde geliştirilen üç günlük filamentöz funguslara A ve B gruplarından 1 ml eklenmiş ve inkübasyona devam ettirilmiştir. İnkübasyonun dördüncü, beşinci, altıncı ve yedinci günlerinde alınan kültür filtratları ile SDS-PAGE yapılmıştır. Sonuçlar agar difüzyon testi ile karşılaştırılmıştır.

Saflaştırma işlemlerinde farklı MWCO değerlerine sahip ultrafiltrasyon kolonları kullanılmıştır.

3.2.12. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi

MIC değerinin belirlenmesi amacıyla, "European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) protokolleri uygulanmıştır (<http://www.eucast.org/>). MIC değeri mikroorganizmanın gelişimini inhibe eden en küçük madde konsantrasyonudur. Bu miktarı bulmak için sıvı dilüsyon metodu kullanılmıştır. Kısaca, 96 kuyulu plaklara 0,5 McFarland konsantrasyonunda bakteri hücrelerinden 100 µl ve

belirli konsantrasyonlarda (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/µl) saflaştırılmış protein eklenmesi yapılmıştır. Total hacim 200 µl'ye ayarlanmıştır. Negatif kontrol olarak hücre eklenmemiş bir grup, pozitif kontrol olarak da protein eklenmemiş grup oluşturulmuştur. 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyonun ardından, kuyulardan 100 µl örnek alınarak MHA besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bu petrilerin, 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyonunun ardından koloni gelişimi gözlenmeyen konsantrasyon değeri MIC değeri olarak değerlendirilmiştir.

3.2.13. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve)

İzole edilen saf proteinin bakteri hücrelerini zamana bağlı olarak öldürme eğrisini belirlemek amacıyla yapılan bu deneyde, 0,5 McFarland konsantrasyonunda 5 ml'lik *S. aureus* kültürleri hazırlanmıştır. Her tüpe, içeriğinde 0, ¼ MIC ve MIC değerlerinde protein eklenmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 0,5; 1, 2, 4, 6, 12 ve 24. saatlerde örnekler alınıp, 10⁻⁴lük seyreltmelerle TSA besiyerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Petrilerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda oluşan koloniler sayılarak cfu/ml hesabı yapılmıştır (Balouiri et al. 2016). Cfu/ml hesaplama formülü aşağıda verilmiştir.

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Petriye yayılan miktar (mL)}}$$

3.2.14. Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonun (MBIC) Belirlenmesi

CV testi ile MBIC değeri belirlenmiştir. Kısaca, 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmış hücrelerden 96 kuyulu plağın her kuyusuna 75 µl eklenmiş, üzerine proteinin belirli konsantrasyonlarda (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/µl) eklenmesi yapılmıştır. Total hacim 150 µl'ye MHB besiyeri ile tamamlanmıştır. Plak, 48 saat 37 °C'de statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyulardaki tüm içerik atılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Üzerine 200 µl, % 0,5'lik CV boyası eklenmiş ve karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular yıkanarak, %30'luk asetik asit ile fikse edilmiştir. 590 nm'de absorbans ölçümü alınarak değerlendirme yapılmıştır (Schillaci et al. 2014).

3.2.15. Antibiyofilm Peptitin Sinerjik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sinerjik etkileşim belirleme amacıyla, disk difüzyon testi yapılmıştır. Bu çalışmada antibiyotik olarak kloramfenikol ve ampisilin kullanılmıştır. Kısaca, tüm örneklerden 1 µg/ml konsantrasyonu disklere emdirilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından zon çapları değerlendirilmiştir.

3.2.16. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Antimikrobiyal ve antibiyofilm özellikteki polipeptitin *S. aureus* ve MRSA hücrelerinde oluşturduğu etkiyi gözlemlemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Bunun için hücreler 6 kuyulu plakların içerisine yerleştirilen steril lameller üzerinde ¼ MIC, MIC ve kontrol grupları olacak şekilde 48 saat 37 °C'de geliştirilmiştir.

Süre sonunda tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması için yıkama işlemleri yapılmıştır. Tutunmuş hücreler ise % 5'lik glutaraldehit ile 15 dakika fikse edilmiş ve 10'ar dakika süreler ile % 20, %50, % 80 ve % 100 etanol ile inkübe edilerek sabitlenmiştir. Ardından SEM cihazında, SE modülünde, 10 paskal basınç altında, 60.000 kat büyütme ile görüntülenmiştir (Kong et al. 2018).

3.2.17. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Saflaştırılan polipeptitin eritrosit hücrelerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla, hemolitik aktivite testi yapılmıştır. Wu ve arkadaşlarının 2014'te yaptıkları çalışmada kullanılan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Kısaca, etik rapor gerektirmeyen, araştırma amaçlı ticari kan örneğinden 5 ml alınarak eşit hacimde PBS ile yıkanmıştır. 1:20 oranında PBS ile dilüe edilen kan örneği üzerine 0,125 - 128 µg/ml konsantrasyon aralığında polipeptit eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst kısım 96 kuyulu plaklara alınmış ve 405 nm'de ölçüm yapılmıştır. % 100 hemoliz oluşturan Tween-20 pozitif kontrol, % 0 hemoliz oluşturan PBS ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Wu et al. 2014).

3.2.18. Filamentöz Fungusun Klasik ve Moleküler Tanısı

3.2.18.1. Klasik Tanı

İzolatlar, selüloz bant yöntemi ile mikroskopik olarak tanılanmıştır. Kısaca, uygun uzunlukta kesilen bant, PDA besiyerinde yetiştirilen fungusların üzerine hafifçe bastırılmıştır ve laktofenol pamuk mavisi eklenmiş lam üzerine yapıştırılmıştır. Elde edilen preparat ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Butler and Mann 1959). İncelenen preparatlar, koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri bakımından değerlendirilerek cins bazında tanılanmıştır.

3.2.18.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, 7 günlük PDA kültüründen manuel olarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 2 ml'lik ependorf tüplerine alınan bir öze dolusu miselyum örneği üzerine 1 ml liziz tamponu eklenmiştir. Bu örnek, 30 dakika maksimum hızda homojenizatörde parçalanmıştır. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjün ardından, üst kısım yeni tüpe alınmış ve 2 µl, 20 U'luk RNase A eklenmiştir. Ardından, 15 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Üzerine 1 hacim fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenmiştir. Vorteks yapılarak, 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım yeni tüpe alınmış ve eşit hacimde %100 etanol eklenerek -20 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrası oluşan çökelti, % 70'lik etanol ile üç kez yıkanarak havada kurutulmuş ve 50 µl TE tamponunda çözülmüştür.

3.2.18.3. ITS, Kalmodulin ve β-tubulin Bölgelerinin PZR ile Çoğaltımı

PZR, fungal DNA'da korunmuş bölgeleri çoğaltmak ve moleküler tanı yapmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.8'de PZR koşulları verilmiştir. Fungal sistematikte en çok tercih edilen Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesinin çoğaltılması için evrensel 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 3.7. 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
Total = 50 µl	

Çizelge 3.7’de verilen miktarlarda değişiklik yapılmaksızın kalmodulin genine ait cmd5 (5’ CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC 3’) ve cmd6 (5’CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG 3’) evrensel primerleri ile; β-tubulin genine ait Bt2a (5’ GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3’) ve Bt2b (5’ ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3’) evrensel primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR cihazında kullanılan program Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. PZR Döngüsü

PZR Döngüleri	Zaman	
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	Sonsuz	

3.2.19. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri, % 1’lik agaroz jel hazırlanarak görüntülenmiştir. 1 g agaroz tartılarak, 100 ml TAE tamponu ile birleştirilerek kaynatılmış ve çözünmenin ardından,

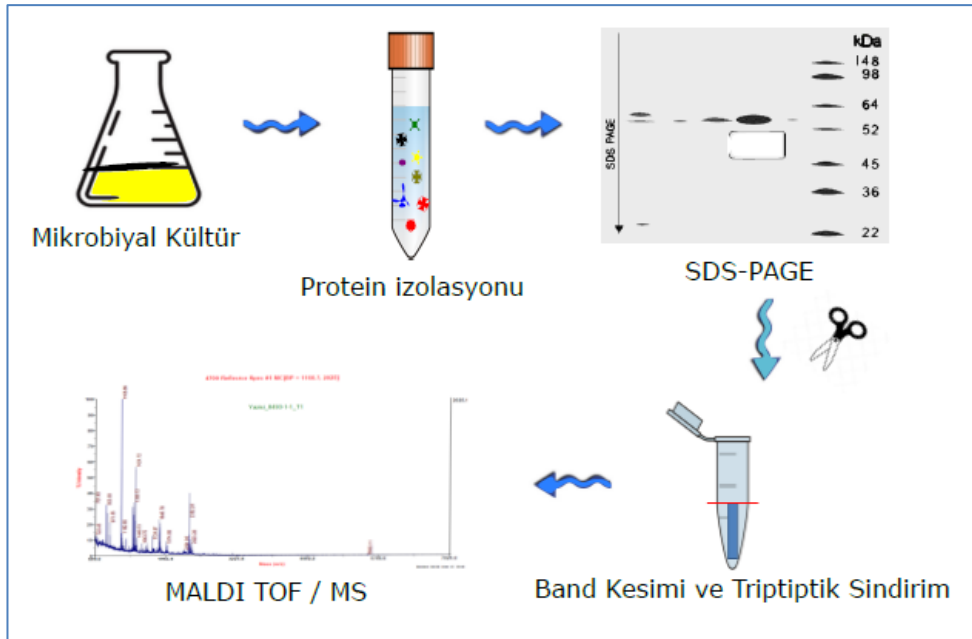
4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Donan jele PZR ürünleri yüklenmiş ve 90V'da 50 dakika yürütme işlemi yapılmıştır.

3.2.20. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Sekans Analizi

PZR ürünlerinden tuzların, primerlerin ve polimeraz enziminin uzaklaştırılması amacıyla, ticari olarak satılan PZR pürifikasyon kiti (Invitrogen) ile saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırılan örnek, Oligomer Biyoteknoloji Firması'ndan (Türkiye, Ankara) sekans hizmeti alınarak diziletilmiştir. Dizilenen örnekler, Bioedit software programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.21. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF / MS)

Saflaştırılan ABP molekülünün karakterizasyonu, TOPLAB Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Germany, Münih) firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.7'de proteomik çalışmalarının akış şeması verilmiştir.



Şekil 3.7. Proteomik Çalışmalarının Akışı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Örnekleme Bölgesi

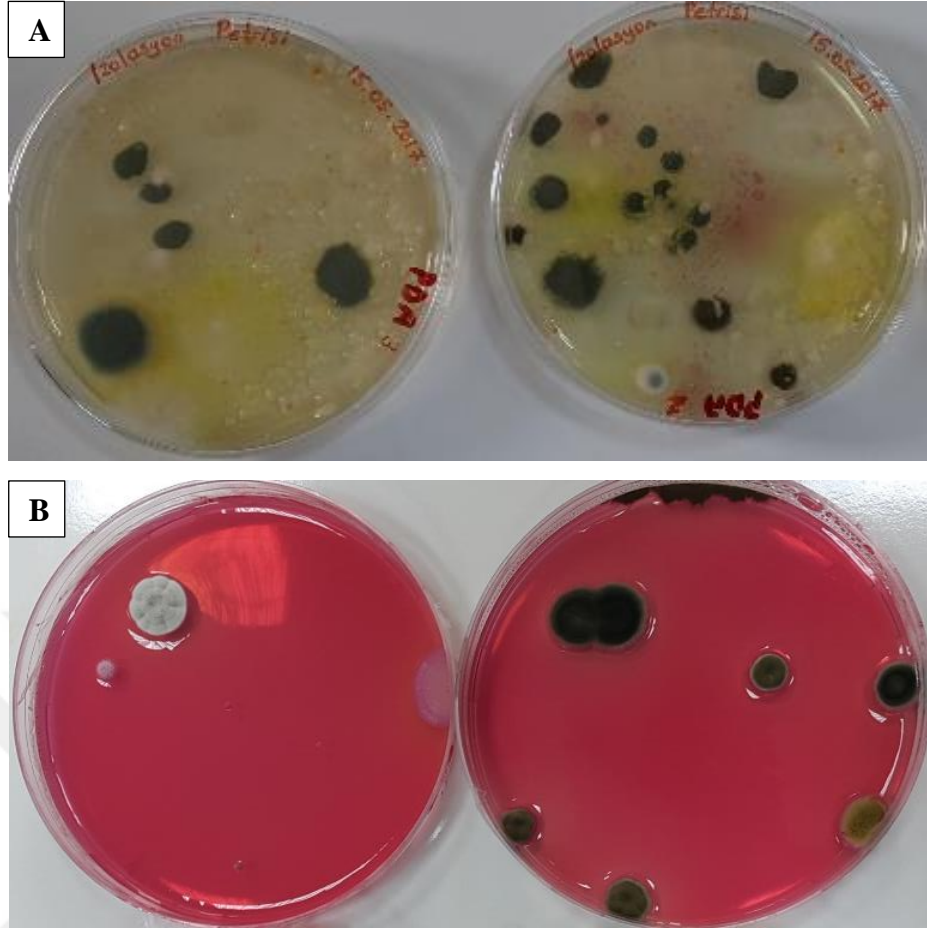
Toprak, mikroorganizmanın doğal habitatı olup, farklı türden mikroorganizmaların etkileşim halinde yaŐadıkları yerdir. Toprağın mikroorganizmalar bakımından zengin olması ve hali hazırda antibiyotik üreticisi birçok fungusun topraktan izole edilmesi kaynak materyali açısından toprağı önemli kılmaktadır (Paul 2014). Bu nedenlerden dolayı, mevcut tez çalışmasında filamentöz fungus kaynağı olarak toprak seçilmiŐtir. Örnekler, Erzurum ilinde 1800 m ve üzeri rakıma sahip, farklı toprak habitatlarından alınarak, steril polietilen torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiŐ ve izolasyonlarda kullanılmıştır.

4.2. Filamentöz Fungusların zolasyonu

Filamentöz fungusların izolasyonu, toprak örneklerinin seri dilüsyonlarının RBCA ve PDA besiyerlerine yayma ekimi ile yapılmıştır (Pepper et al. 2011). Şekil 4.1’de izolasyon petrilere ait görüntüler verilmiştir.

zolasyonlarda kullanılan RBCA besiyerinin içerisinde bulunan rose bengal bakteriyostatik özellik taşıyan bir boyadır. Ayrıca, filamentöz fungusların üremelerini sınırlayarak seleksiyonunu kolaylaŐtırdıđından izolasyonlarda tercih edilmiştir (Ottow 1972).

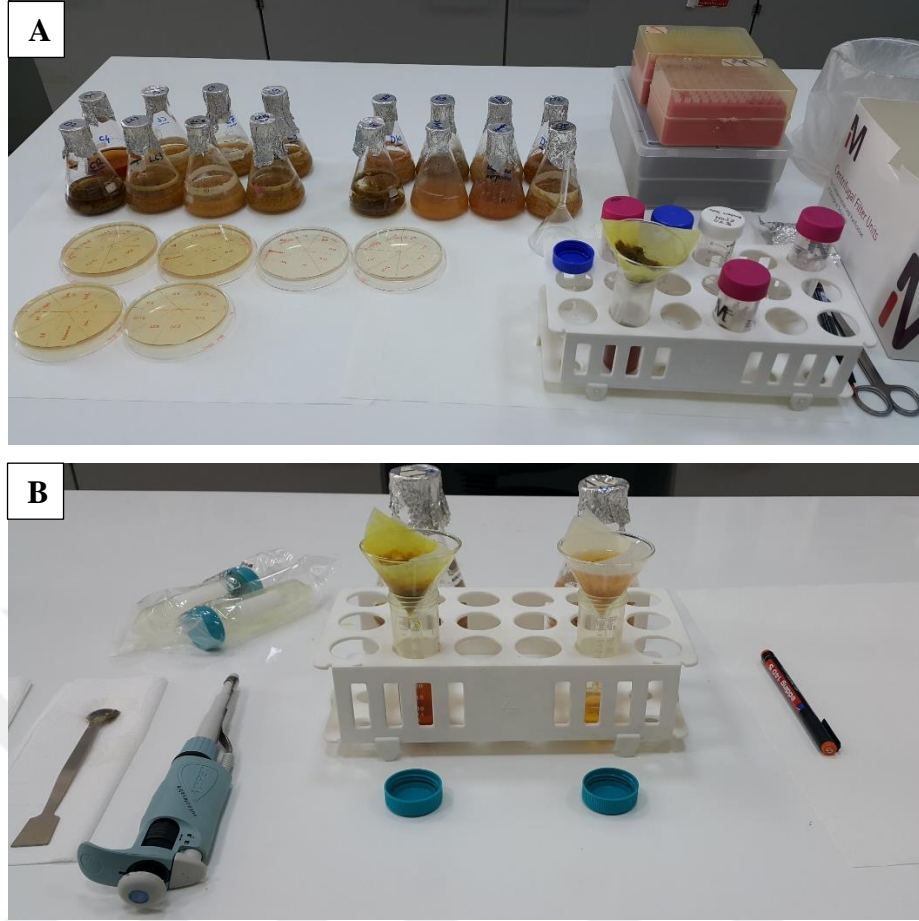
zolasyon petrilinde gelişen filamentöz fungus kolonileri, PDA besiyerine 3 nokta ekimi ile alınmıştır. zolasyonlar sonucu, toplamda 120 farklı izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar AMP ve ABP reticisi filamentöz fungusların seleksiyonunda kullanılmıştır.



Şekil 4.1. İzolasyon Petrilerinin Görüntüleri. A. PDA besiyeri ile yapılan izolasyon görüntüsü B. RBCA besiyerinde yapılan izolasyon görüntüsü.

4.3. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve AMP Üreticisi Filamentöz Fungusların Seleksiyonu

Antimikrobiyal özellikteki ekstrasellüler polipeptit üretici fungusların seleksiyonu amacıyla, izole edilen filamentöz fungusların 25 °C’de gelişen 7 günlük katı kültürlerinden alınan diskler, 100 ml YPG besiyerine inokule edilmiştir. Bu örnekler, 25°C’de 150 rpm’de 7 gün inkübasyona tabi tutulmuş ve kültür filtratları elde edilmiştir. Şekil 4.2’de kültür filtratı elde etme aşamalarının görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.2. Ekstrasellüler Kültür Filtratı Elde Etme Deneylerinin Görüntüsü

Deneysel çalışmalarda kullanılan kültür filtratları oluşabilecek kontaminasyonlardan korunmalıdır. Bu nedenle hücresiz kültür filtratı elde etme sürecinin filtrasyon aşamaları aseptik şartlarda çalışılmıştır. Dusane ve arkadaşlarının (2013) yapmış oldukları çalışmada kullanılan yöntemlerde olduğu gibi hücresiz kültür filtratı elde etme seleksiyon çalışmalarının doğruluğu açısından önem taşımaktadır (Dusane et al. 2013).

4.3.1. Agar Difüzyon Testi

Elde edilen kültür filtratları, patojen türlerin dökme plak yöntemleri ile hazırlanan soft MHA petrilere, 6 mm'lik mantar delici ile açılan kuyulara 200 µl olacak şekilde eklenmiştir. Petriler, 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zon oluşturan kültür filtratları belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

120 adet filamentöz fungusun kültür filtratlarının denemelerinde C16, A01, C8, C6, LC3, M1 kodlu izolatlardan pozitif sonuç alınmıştır. Bu izolatlar morfolojik olarak incelendiğinde A01, C16, LC3, C8 izolatları *Aspergillus* cinsine, M1 ve C6 izolatlarının ise *Penicillium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Diğer izolatların ise patojen türlerde herhangi bir zon oluşumuna yol açmadığı tespit edilmiştir. Çizelge 4.1’de bu izolatların zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Agar Difüzyon Testi Sonuçları *

İndikatör suş	A01	LC3	C6	C8	C16	M1	Diğer İzolatlar
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	+++	++	++	-
MRSA (Klinik izolat)	+++	+++	+++	+++	++	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	+	-	-	++	+	++	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	+	-	-	++	-	+	-

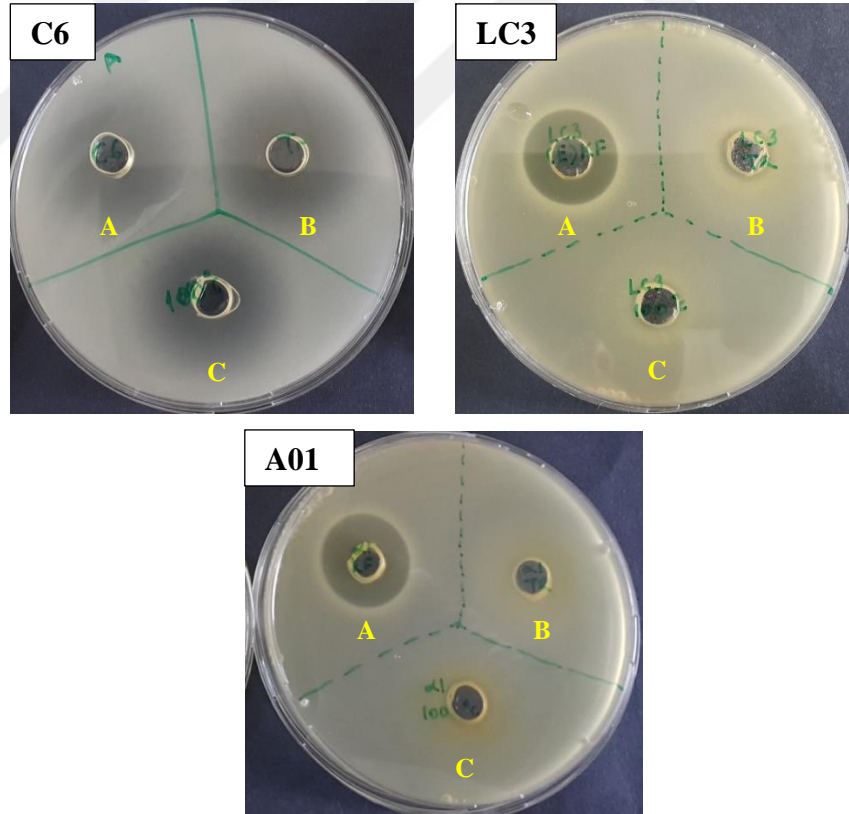
*+, 10 mm’den küçük zon, ++, 10-20 mm arası zon; +++, 20 mm’den büyük zon çaplarını temsil etmektedir.

Test edilen patojen türler içerisinde, zon oluşumu en iyi *S. aureus*’a ve MRSA’ya karşı gözlenmiştir. Bu örnekler içerisinde *P. aeruginosa*’nın gelişimini engelleyen bir izolat bulunamamıştır. Bu nedenle deneylerin devamında *S. aureus* ve MRSA bakterileri kullanılmıştır.

4.3.2. Tripsin / Proteinaz K Parçalama Yöntemi

C16, A01, C8, C6, LC3, M1 izolatlarının kültür filtratlarında bulunan antimikrobiyal aktivitenin protein kaynaklı olup olmadıklarını belirlemek amacıyla, kültür filtratları 37 °C’de 6 saat tripsin ve proteinaz K enzimleri ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kültür filtratlarının oluşturduğu zonlar agar difüzyon testi ile belirlenmiştir.

Bu deneysel çalışmada, kültür filtratının pozitif, proteazlarla muamele edilen kültür filtratının ise negatif sonuç vermesi, aktivitenin protein kaynaklı olduğu sonucunu gösterir (Dusane et al. 2013). Bu mantık çerçevesinde deney sonuçları yorumlandığında, pozitif zon veren 6 izolat içerisinde sadece A01 ve LC3 kodlu izolatların protein kaynaklı zon oluşturduğu görülmüştür. Şekil 4.3’te C6, LC3 ve A01 kodlu izolatların agar difüzyon testine ait petri görüntüleri verilmiştir.

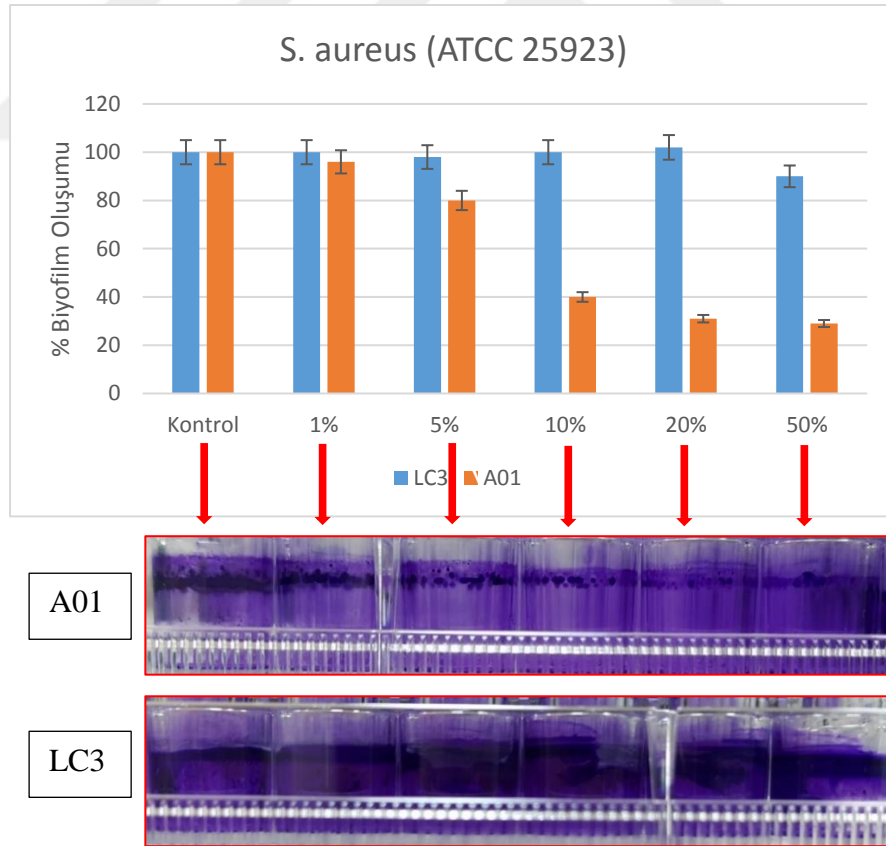


Şekil 4.3. C6, LC3 ve A01 Kodlu İzolatların Agar Difüzyon Testi Görüntüsü. A. Kültür filtratı B. Proteazlarla muamele edilmiş kültür filtratı C. 100°C’de inkübasyona bırakılmış kültür filtratı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi C6 örneğinde, AMP kaynaklı zon oluşumu yoktur. Bu örnekte oluşan zon, muhtemelen protein olmayan farklı bir metabolitten kaynaklanmıştır. LC3 ve A01 izolatlarında ise proteaz uygulaması ile elde edilen kültür filtratı zon oluşturmamıştır. Bu şekilde, LC3 ve A01 izolatlarının AMP molekülü üreticisi izolatlar olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, 100°C'de yapılan kaynatma işleminin de proteinlerin yapısını bozma eğilimi gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, kültür filtratları 100°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu örneklerde de zon oluşumu gözlenmemiştir.

AMP üretici izolatların belirlenmesinin ardından, hacimsel olarak alınan kültür filtratlarının antibiyofilm aktiviteleri değerlendirilmiştir. A01 izolatının kültür filtratı yapılan ilk denemelerde antibiyofilm aktivite göstermiştir. LC3 izolatının kültür filtratı ise antibiyofilm aktivite göstermemiştir. Bu nedenle çalışmalara A01 izolatı ile devam edilmiştir. Şekil 4.4'te LC3 ve A01 izolatlarının antibiyofilm aktivitelerinin karşılaştırmaları gösterilmiştir.

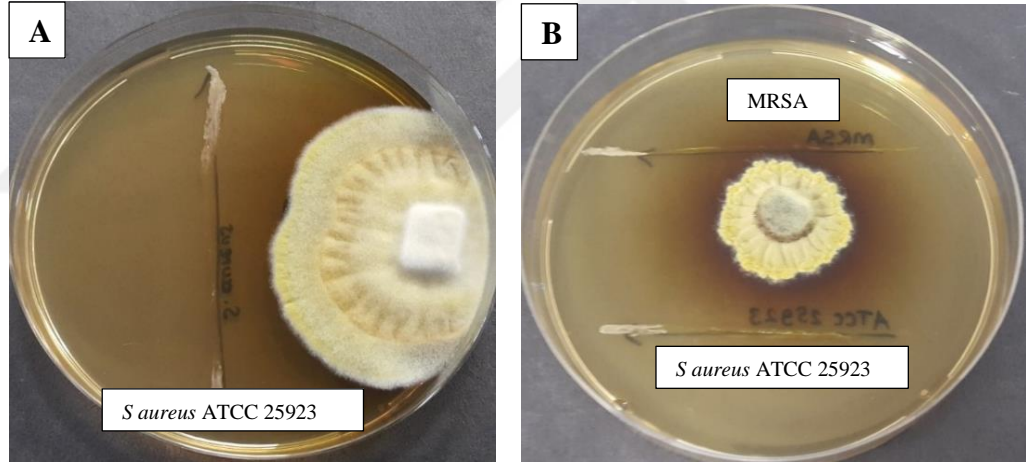


Şekil 4.4. LC3 ve A01 İzolatlarının Kültür Filtratlarının Antibiyofilm Aktiviteleri

CV boyası, non-spesifik bir şekilde negatif yüklü yüzey moleküllerinden olan ve EPS içerisinde bulunan polisakkaritlere ve e-DNA'ya bağlanır. Bu özelliğinden dolayı biyofilm çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir boyadır (Shukla and Rao 2017). Mevcut tez çalışmasında, *S. aureus* hücrelerinin biyofilm oluşturması ve kültür filtratlarının biyofilm oluşumuna olan etkileri CV testi ile belirlenmiştir.

4.3.3. Çapraz Ekim Yöntemi

A01 izolatu ile *S. aureus* ve MRSA bakterilerinin YPG agar besiyerinde ikili kültürleri yapılmıştır. 7 günlük A01 izolatının yanına bakteriler çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. 1 günlük inkübasyonun ardından *S. aureus* ve MRSA'da üremenin engellendiği görülmüştür. Şekil 4.5'te çapraz ekim yöntemine ait petri görüntüleri verilmiştir.

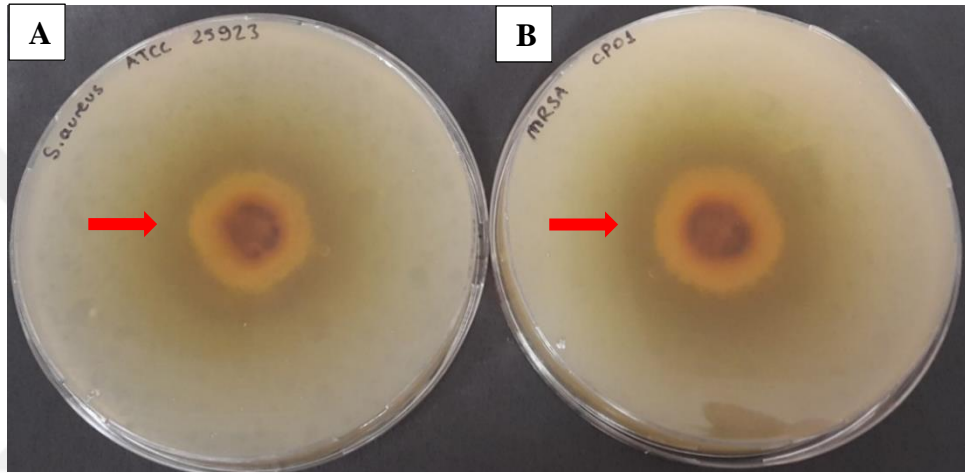


Şekil 4.5. Çapraz Ekim Yöntemi Petri Görüntüleri.

Muhammad ve arkadaşlarının (2015), AMP üreticisi bakterilerin seleksiyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada kullanılan çapraz ekim yöntemi, mevcut tez çalışmasında A01 izolatu ile yapılmış ve *S. aureus* ve MRSA'da antogonistik bir etkileşim görülmüştür. (Muhammad et al. 2015). Bu yöntem, AMP üreticisi izolatların seleksiyonunda proteaz muamelesi kadar kesin olmamakla birlikte, destekleyici bir yöntem olarak kullanılmıştır.

4.3.4. Radyal İnhibisyon Testi

Radyal inhibisyon testinde, *S. aureus* ve MRSA bakterilerinin dökme plak ile hazırlanan kültürleri YPG agar besiyerinde gelişen 7 günlük A01 izolatının üzerine eklenmiştir. 1 günlük inkübasyonun ardından patojen bakterilerin gelişimleri değerlendirilmiştir. *S. aureus* ve MRSA, A01 izolatının çevresinde sırasıyla 35 ve 30 mm'lik zon oluşturmuştur. Şekil 4.6'te radyal inhibisyon testine ait petri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.6. Radyal İnhibisyon Testi. A. *S. aureus* B. MRSA 'a karşı A01 izolatında oluşan zonlar

Radyal inhibisyon testi antimikrobiyal molekül üretici izolatların seleksiyonunda kullanılan bir yöntemdir (Lee et al. 2004). Bu yöntem, çapraz ekim yönteminde olduğu gibi, AMP üreticisi izolatların seleksiyonunda destekleyici bir yöntem olarak kullanılmıştır.

4.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE

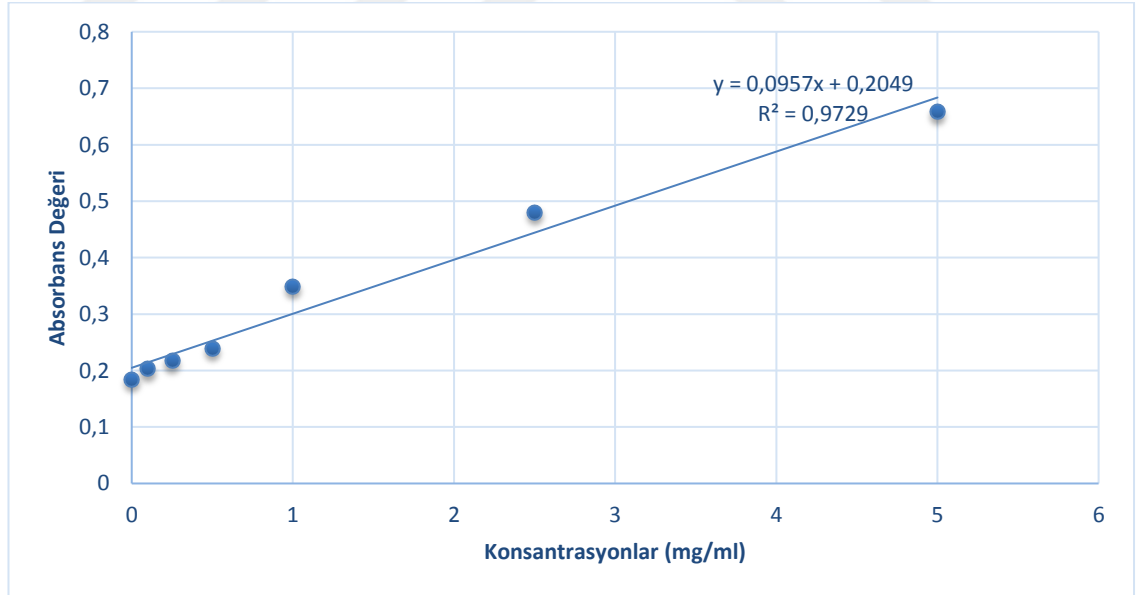
A01 izolatının kültür filtratı, 3 kDa MWCO ultrafiltrasyon kolonları ile yoğunlaştırma işlemine tabi tutulmuş ve TCA yöntemi ile proteinleri izole edilmiştir. Kuvvetli bir asit olan TCA, polipeptit zincirinde bulunan aa'lerin iyonik gruplarını değişikliğe uğratarak, polipeptitlerin degradesyonuna yol açar. Degrade olan proteinlerin çökme eğilimi, izolasyonun yapılmasına olanak sağlar.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

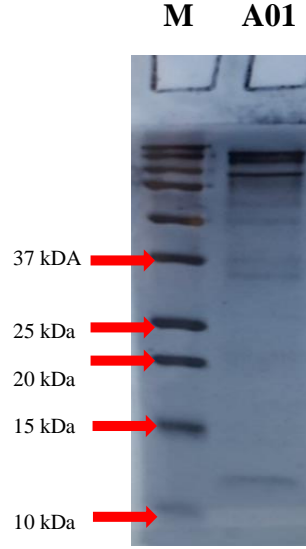
AMP izolasyonunda, TCA yöntemi dışında farklı yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan amonyum sülfat çöktürmesi protein izolasyonunda sıklıkla tercih edilir. Bu tuz, proteinlerin degradasyonuna yol açmadan agregasyonu sağlar. Agregasyona uğrayan proteinler çökme eğilimi gösterir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise çöktürmeden sonra kalan fazla miktarda tuzun uzaklaştırılmasında yaşanan problemlerdir (Wang et al. 2011).

TCA metodu, Medina ve arkadaşları (2008) ile Lankshman ve arkadaşları (2008) tarafından önerilmektedir. Ayrıca bu çalışmalarda, filamentöz fungusların ekstrasellüler proteinlerinin en iyi TCA yöntemi ile izole edilebildiği gösterilmiştir (Lakshman et al. 2008; Medina and Francisco 2008).

Elde edilen proteinlerin miktarları, Bradford testi ile belirlenmiştir (Bradford 1976). Sıklıkla tercih edilen bu test, oldukça hassas bir ölçüm yapmaktadır. Bradford testi için standart grafik, BSA proteini ile hazırlanmıştır. Şekil 4.7’de Bradford standart grafiği verilmiştir.



Şekil 4.7. BSA ile Hazırlanan Standart Grafik

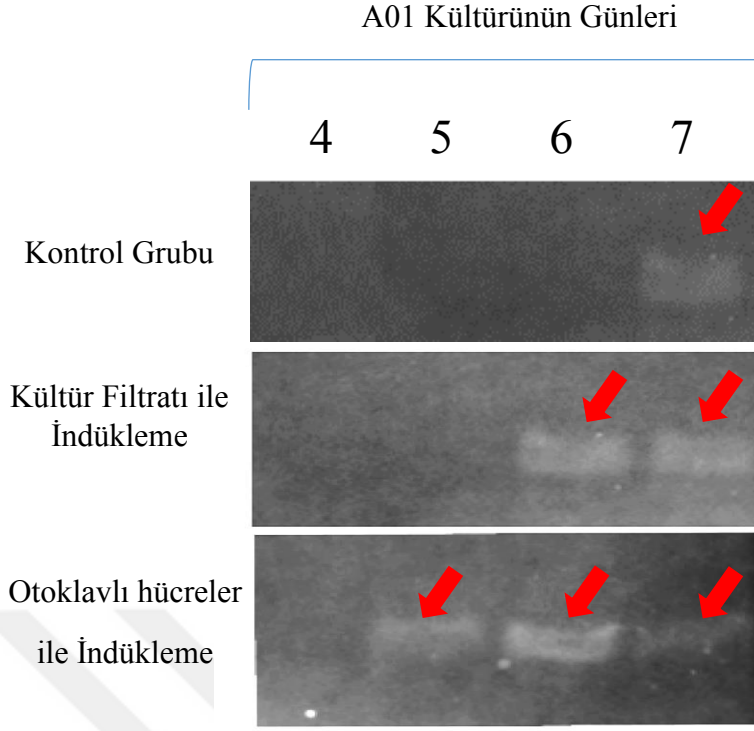


Şekil 4.8. A01 İzolatının Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE Profili. (M: Marker)

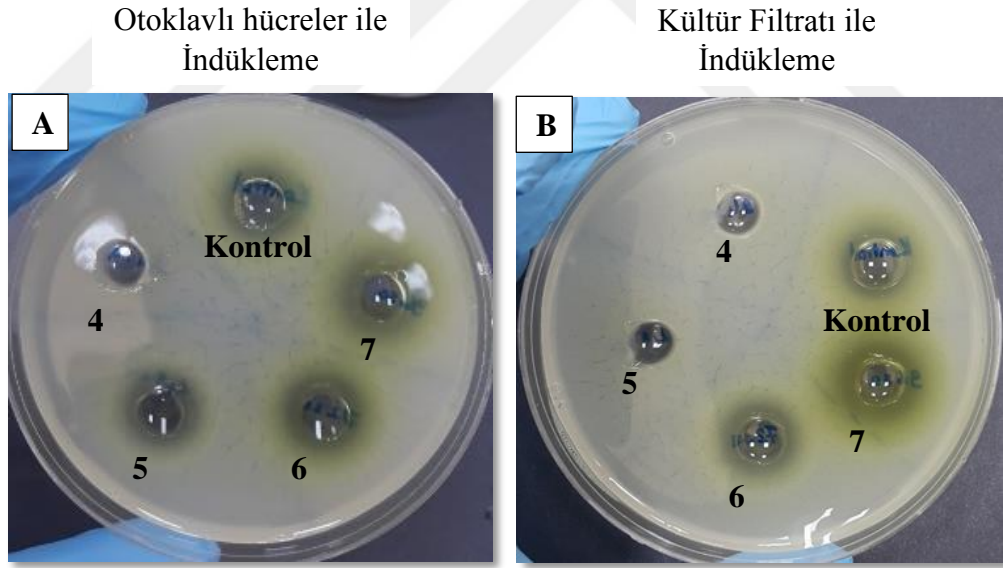
Farklı organizmalardan izole edilen AMP molekülleri genellikle küçük moleküler ağırlığa sahip olduğu için, görüntüleme çalışmalarında küçük proteinlerin ayırımına olanak sağlayan %15'lik SDS-PAGE kullanılmıştır. Şekil 4.8'da A01 izolatının ekstrasellüler proteinlerinin SDS-PAGE profili gösterilmektedir.

4.5. AMP Moleküllerinin Belirlenmesi ve Saflaştırılması

Total ekstrasellüler proteinlerden AMP moleküllerinin belirlenmesi amacıyla A01 izolatı *S. aureus* kültürü ile indükleme işlemine tabi tutulmuş ve iki farklı grup kullanılmıştır. Birinci grup, 37 °C'de 2 gün MHB besiyerinde geliştirilen *S. aureus* hücrelerine ait 1 ml hücresiz kültür filtratının A01 kültürüne eklenmesi ile oluşturulmuştur. İkincisi ise, aynı şartlarda geliştirilen *S. aureus* hücreleri otoklavlanarak öldürülmüş ve bunun 1 ml'si A01 kültürüne eklenmiştir. İndükleme işleminden sonraki 24, 48, 72 ve 96 saatlerde A01 izolatına ait kültür filtratları toplanarak agar difüzyon testi ile zon oluşup oluşmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca bu kültür filtratları, protein izolasyonu yapılmaksızın SDS-PAGE'de görüntülenmiştir. Şekil 4.9'da kültür filtratının SDS-PAGE görüntüsünün zamana bağlı analizi ve Şekil 4.10'da zamana bağlı agar difüzyon testi sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.9. İndükleme Deneyine ait Kültür Filtratlarının SDS-PAGE Görüntüsü.



Şekil 4.10. İndükleme Sistemine ait Kültür Filtratlarının Zon Değerlendirmesi. A. Otoklavlı hücreler ile indüklenmiş A01 kültür filtratlarının zon değerlendirilmesi. B. Kültür filtratı ile indüklenmiş A01 kültür filtratının zon değerlendirilmesi.

İndükleme sistemi uygulanmayan kontrol grubunda, sadece yedinci günde 10 kDa üzerinde bir bant alınmıştır. Kültür filtratı ile indükleme işleminde altıncı ve yedinci günlerde 10 kDa üzerinde bir bant alınmıştır. Otoklavlı hücreler ile indükleme işleminde ise beşinci, altıncı ve yedinci günlerde 10 kDa üzerinde bir bant alınmıştır. Agar difüzyon

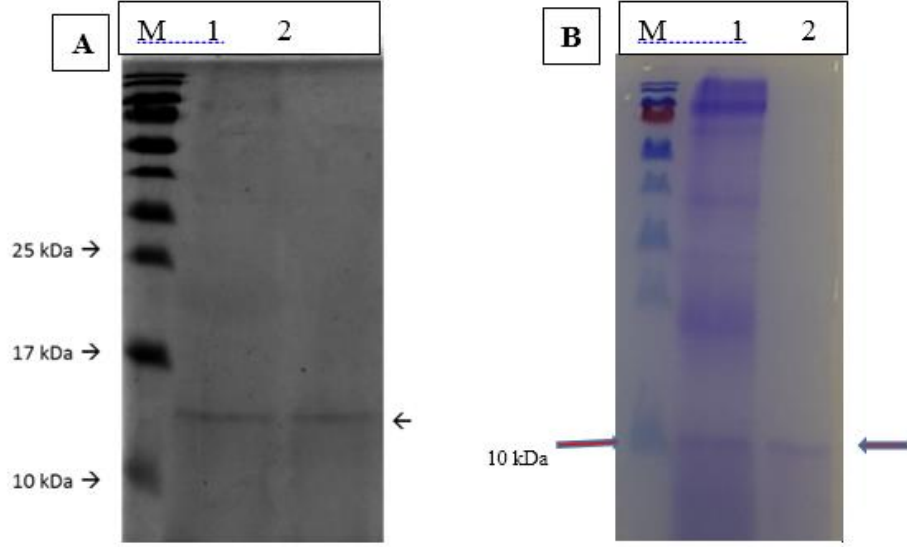
testinde ise bant görülen bu örneklerde zon oluşumu görülmüştür. Bant görülmeyen günlerde ise zon oluşumu görülmemiştir. Bu deneyler değerlendirildiğinde, kültür filtratının SDS-PAGE görüntüsünde görülen bu protein bantının AMP molekülü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca indükleme sistemlerinde otoklavlı hücreler ile indüklemenin proteinin üretiminde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, A01 izolatının indükleme olmaksızın, gelişiminin yedinci gününde bu molekülü ürettiği de gösterilmiştir.

Literatürde AMP molekülünün belirlenmesi ile ilgili, indükleme yöntemi daha önceki çalışmalarda bulunmamaktadır. Mevcut tez çalışmasının yöntemsel yeniliği olarak gösterebilecek bu metod, farklı mikroorganizmalarda AMP molekülünün belirlenmesinde kullanılabilir.

Deney sonuçlarının yorumlanması ile 10 kDa üzerinde görülen tek bantın AMP olma özelliği taşıdığı sonucuna varılmıştır. Literatürde bulunan AMP moleküllerinin de benzer ağırlıklarda olması indükleme sisteminde bulunan sonucu desteklemektedir. Bu tek bant 30 MWCO membran filitre kullanılarak saflaştırılmıştır.

Trisin-PAGE düşük moleküler ağırlığa sahip proteinlerin yürütülmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Özellikle 30 kDa'dan daha küçük ağırlığa sahip proteinler bu yöntem ile birbirlerinden net bir şekilde ayrılabilir (Haider et al. 2012). Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında da tercih edilmiştir.

Şekil 4.11'de saflaştırılan proteinin SDS-PAGE ve Trisin-PAGE görüntüsü verilmiştir. Görüntülerdeki 1. kuyular, total protein ekstraksiyonuna 2. kuyular ise saflaştırılan polipeptite aittir. MIC değerinin belirlenmesi, öldürme kinetiği eğrisinin çıkarılması, MBIC değerinin belirlenmesi, sinerjik etkileşimin değerlendirilmesi ve SEM analizleri bu saflaştırılmış protein ile yapılmıştır.



Şekil 4.11. Saflaştırılan AMP'nin Görüntüsü. A. SDS-PAGE, B. Tris-PAGE görüntüsü

4.6. MIC Değerinin Belirlenmesi

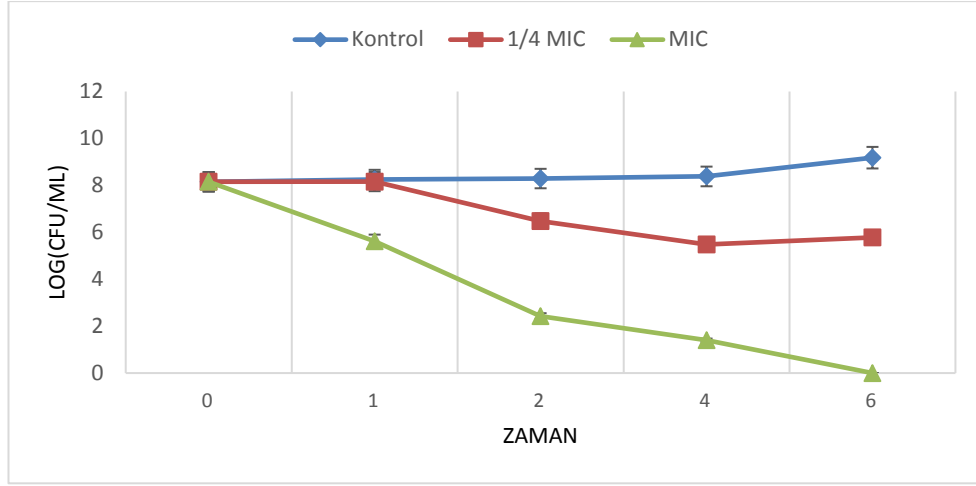
MIC mikroorganizmaların üremelerini durduran en küçük konsantrasyon miktarıdır. MIC belirleme işlemi EUCAST protokolleri (Eucast Discussion Document E. Dis 5.1) ile yapılmıştır. Sıvı dilüsyon yöntemi ile yapılan deneylerde farklı bakteri suşları kullanılmıştır. İzole edilen polipeptit, *S. aureus*'a 32 µg/µl, MRSA'ya 128 µg/µl, *E. coli*'ye 16 µg/µl ve *E. feacalis*'e 128 µg/µl MIC değerini vermiştir. Bu polipeptit *P. aeruginosa*'yı incelenen konsantrasyon aralıklarında inhibe etmemiştir.

4.7. Öldürme Kinetiği Eğrisinin Değerlendirmesi

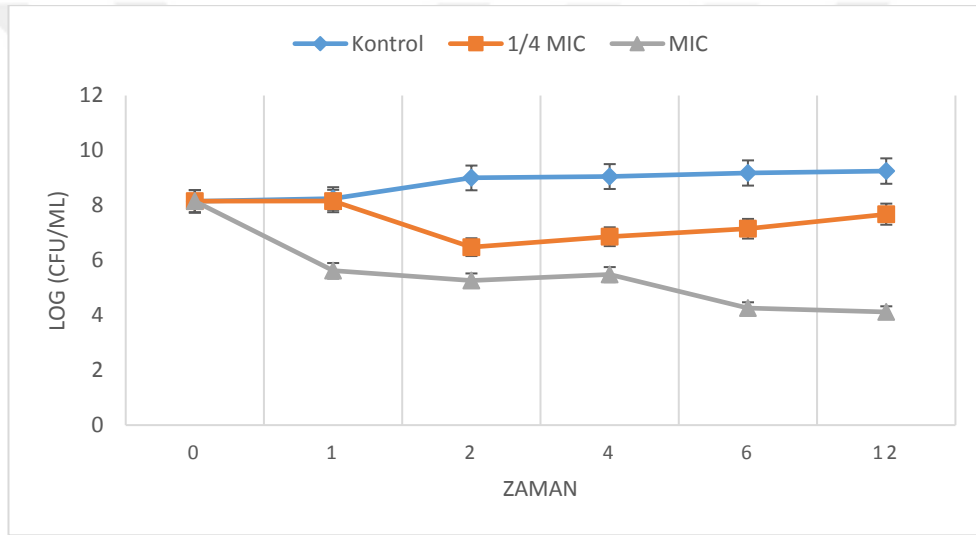
Öldürme kinetiği testinde, saflaştırılan polipeptitin, patojen hücreleri inhibe etmesi için gerekli olan zaman belirlenir (Ruppen and Sendi 2015).

Şekil 4.12'de *S. aureus*'a ait zamana bağlı canlılık sayısı aşağıdaki grafikte verilmiştir. Şekil 4.13'de ise MRSA'ya ait öldürme eğrisi grafiği verilmiştir. Öldürme kinetiği testine göre, AMP molekülü, MIC değerinde, 6 saat içerisinde *S. aureus* hücrelerinin gelişimlerini inhibe etmiştir ve bakteriyosid bir etki göstermiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.12. *S. aureus*'a Karşı Öldürme Kinetiği Eğrisi



Şekil 4.13. MRSA'ya Karşı Öldürme Kinetiği Eğrisi

Öldürme kinetiği eğrisi, ilaç adayı molekülün farmakodinamik fonksiyonları hakkında birgi vermektedir (Foerster et al. 2016). Bakterisidal bir aktivite varlığından söz etmek için, verilen konsantrasyonun orijinal inokulasyon miktarından >3 log(cfu/ml) kadar hücrenin azalması gerekmektedir. Daha az sayıda hücre azalması ise antimikrobiyal ilaç adayının verilen konsantrasyon miktarında bakteriyostatik etki gösterdiğini belirtmektedir (Silva et al. 2011).

Nitekim, CLSI (<https://clsi.org/>) dökümanlarına göre, *S. aureus* hücrelerine karşı bakterisidal aktiviteye sahip antibiyotiklerin kullanımının enfeksiyonların kontrolünde daha etkili olacağı bildirilmiştir. Mevcut çalışmada öldürme kinetiği eğrisi sonuçları incelendiğinde, saflaştırılan polipeptitin *S. aureus* ve MRSA hücrelerine karşı, $\frac{1}{4}$ MIC

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

konsantasyonunda bakteriyostatik, MIC konsantrasyonunda ise bakterisidal aktivite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

4.8. MBIC Değerinin Belirlenmesi

MBIC, biyofilm oluşumunu inhibe eden en küçük madde konsantrasyonudur. MBIC değerinin belirlenmesi amacıyla CV testi yapılmıştır. Çizelge 4.2’de MIC ve MBIC değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. MIC ve MBIC Değerleri

İndikatör suş	İnhibitör Zon Çapı*	MIC (mg/L)	MBIC ₁₀₀ (mg/L)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+++	32	2
MRSA (Klinik izolat)	+++	128	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	> 512	B.S.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	+	16	B.S.
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	+	128	B.S.

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

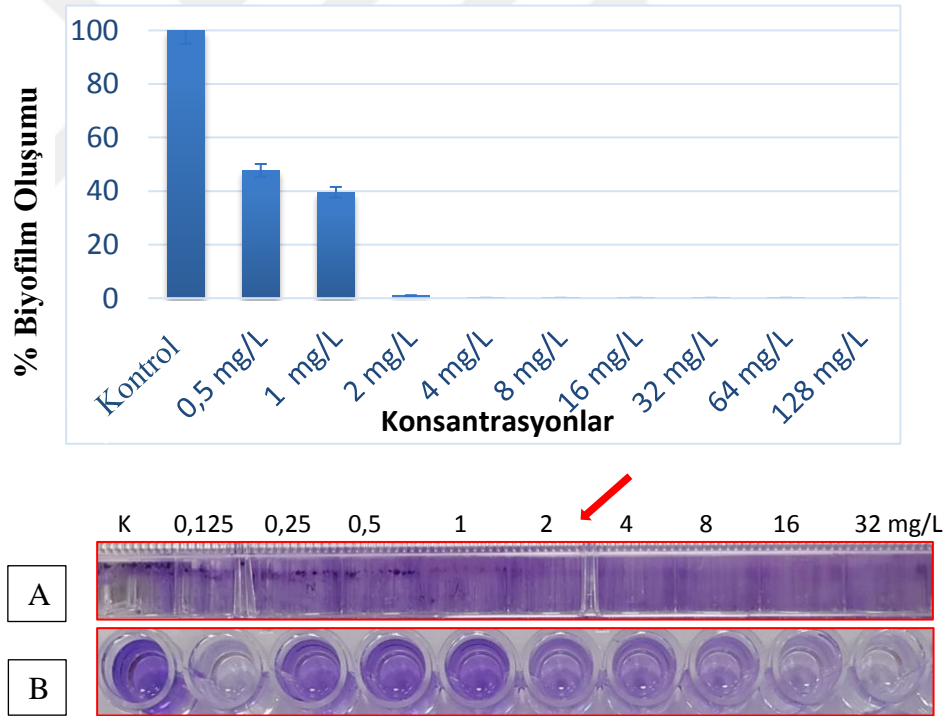
MIC ve MBIC değerleri EUCAST kriterlerine göre 0,125 ile 512 µg/µl konsantrasyon aralığında değerlendirilmelidir. Bu konsantrasyonlar aralığında yapılan çalışmalarda, izole edilen AMP molekülü *S. aureus*’a karşı 32 µg/µl MIC değerine ve 2 µg/µl değerinde MBIC değeri vermiştir. MRSA’da ise MIC değeri 128 µg/µl ve MBIC değeri 8 µg/µl’dir.

MBIC değerinin, MIC değerinden küçük olması izole edilen AMP molekülünün antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu açıdan sonuçlar incelendiğinde, saflaştırılan polipeptitin antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

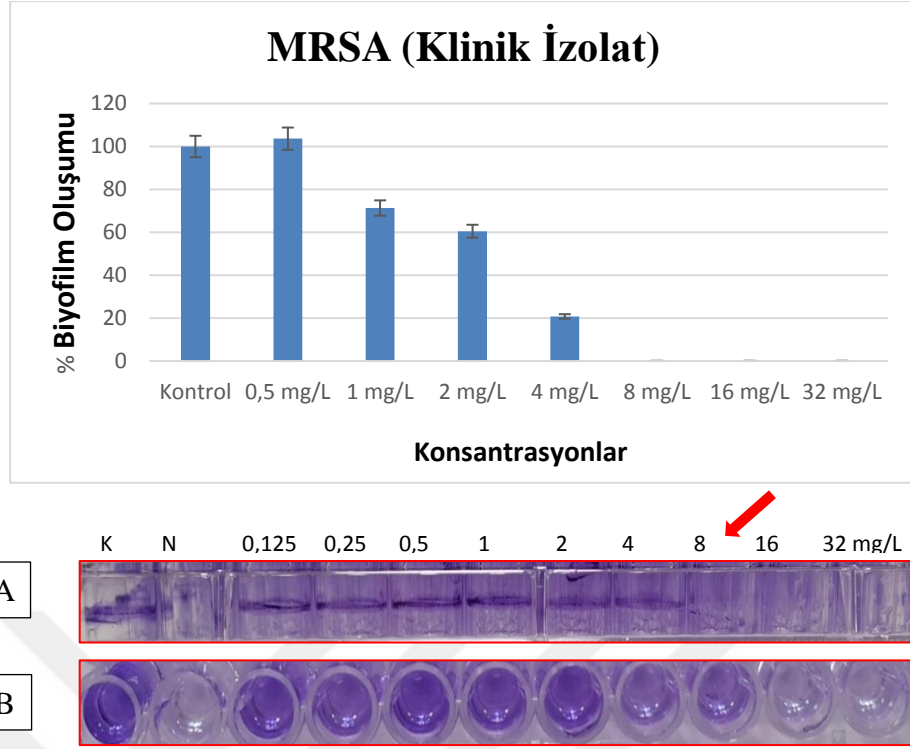
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Literatürde bulunan fungal kaynaklı AMP moleküllerinden, plektasinin MRSA'ya karşı MIC değeri, farklı suşlarda değişmekle birlikte ortalama 32 µg/µl'dir. Plektasinin biyofilm inhibisyonu ise çalışılmamıştır (Mygind et al. 2005). Başka bir fungal kaynaklı AMP olan mikasin, MRSA'ya karşı 3,35 µg/µl MIC değeri vermiştir (Zhu et al. 2012). *Coprinopsis cinerea*'dan izole edilen kopsin'in ise *S. aureus*'a karşı >64 µg/ml MIC değerine sahiptir (Essig et al. 2014). İnsan kaynaklı LL-37' nin ise *S. aureus*'a karşı MIC değeri 3,6 µg/ml'dir. MBIC değeri ise bu değerden ortalama 16 kat daha düşüktür. Farklı izolatlarda değerler değişiklik göstermektedir (Dürr et al. 2006). Bu örneklerle karşılaştırıldığında tez çalışması kapsamında izole edilen polipeptidin, funguslardan izole edilen AMP'lere yakın olduğu, buna ek olarak da antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de *S. aureus* ve MRSA'ya ait antibiyofilm aktivite grafikleri verilmiştir.

S. aureus (ATCC 25922)



Şekil 4.14. Saflaştırılmış Polipeptidin Konsantrasyona Bağlı Antibiyofilm Aktivitesi. A. CV testi fiksasyon öncesi B. CV testi fiksasyon sonrası.



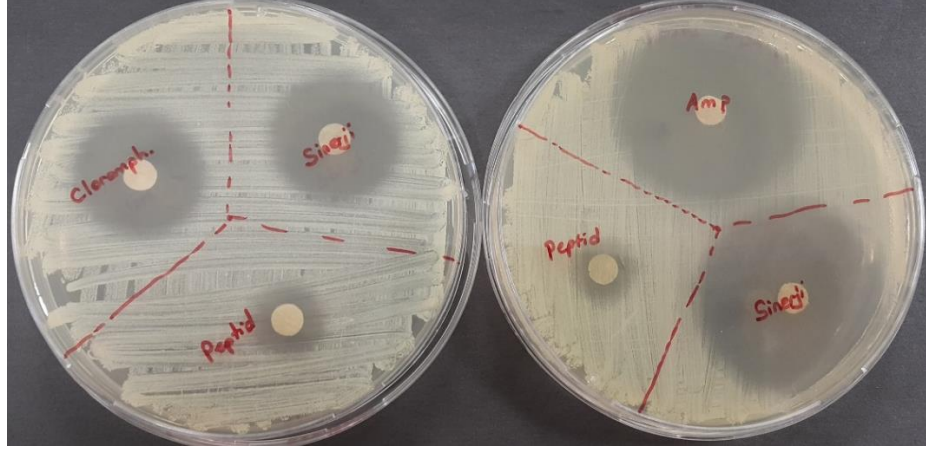
Şekil 4.15. Saflaştırılmış Peptinin Konsantrasyona Bağlı Antibiyofilm Aktivitesi. A. CV testi fiksasyon öncesi B. CV testi fiksasyon sonrası.

4.9. Sinerjik Etkileşimin Değerlendirilmesi

A01 izolatının proteinleri saflaştırılarak amfisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri ile etkileşimleri *S. aureus* (ATCC 25922)'a karşı disk difüzyon testi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak sinerjik etkileşimin varlığı saptanmamıştır. Bununla birlikte, saflaştırılan polipeptidin bu antibiyotiklerle antagonistik etkileşiminin olmadığı deney sonuçlarımız ile doğrulanmıştır. Çizelge 4.3'te sinerjik etkileşime ait zon çapları ve Şekil 4.16'da petri görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sinerjik Etkileşim Zonlarının Belirlenmesi

	Saflaştırılmış Polipeptit	Amfisilin	Kloramfenikol	Sinerjik Zon
Zon	15,5±0,5	38±2	23±1	Amp-peptit: 47±1
Çapları (mm)				Chp-peptit: 26±1

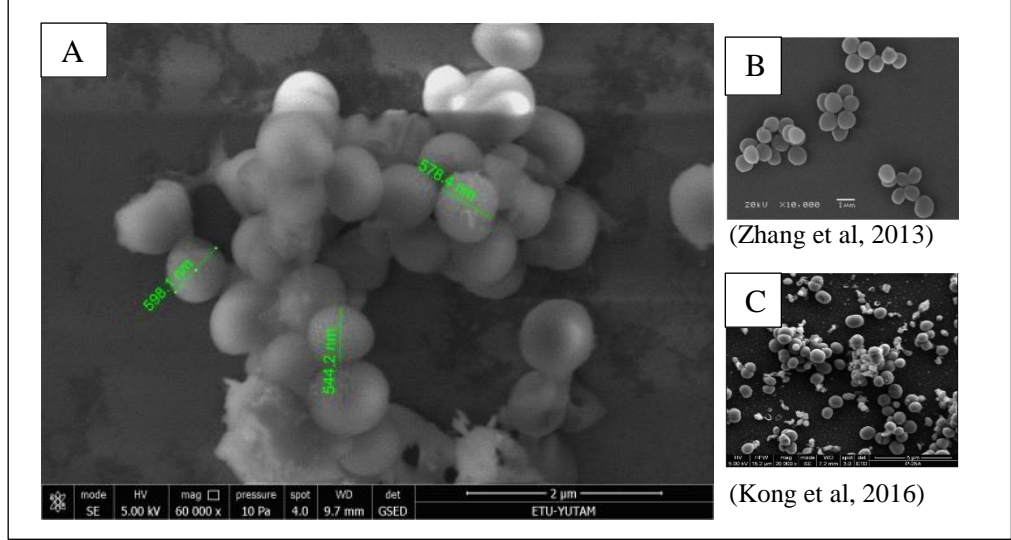


Şekil 4.16. Sinerjik Etkileşime ait Petri Görüntüleri.

AMP ve ABP moleküllerinin, antibiyotiklerle sinerjik etkileşimi tedavinin kolaylaştırılması bakımından önemlidir. Pletzer ve arkadaşları (2016) yayınladıkları derleme çalışmasında sinerjik etkileşiminin önemini vurgulamaktadırlar. Çalışmada, sinerjik etkileşim ile daha az miktarda antibiyotik kullanımının sağlabileceği ve mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmasının önüne geçilebileceği bildirilmiştir (Pletzer et al. 2016).

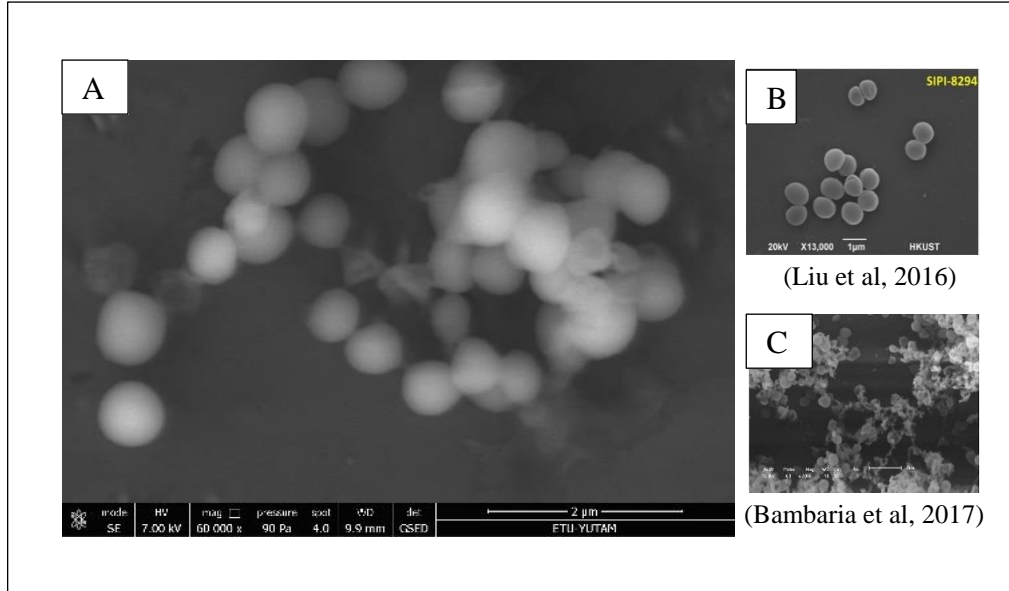
4.10. SEM Analizi

6 kuyulu plaklarda hazırlanan biyofilm modelinde, lamellere tutunan *S. aureus* ve MRSA hücrelerinin 60.000 kat büyütme ile görüntüleri alınmıştır. Ayrıca $\frac{1}{4}$ MIC ve MIC değerlerinde saflaştırılmış polipeptit eklenerek, *S. aureus* ve MRSA hücrelerinde morfolojik değişimler tespit edilmiştir. Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19'da *S. aureus*'a ait SEM görüntüleri verilmiştir.

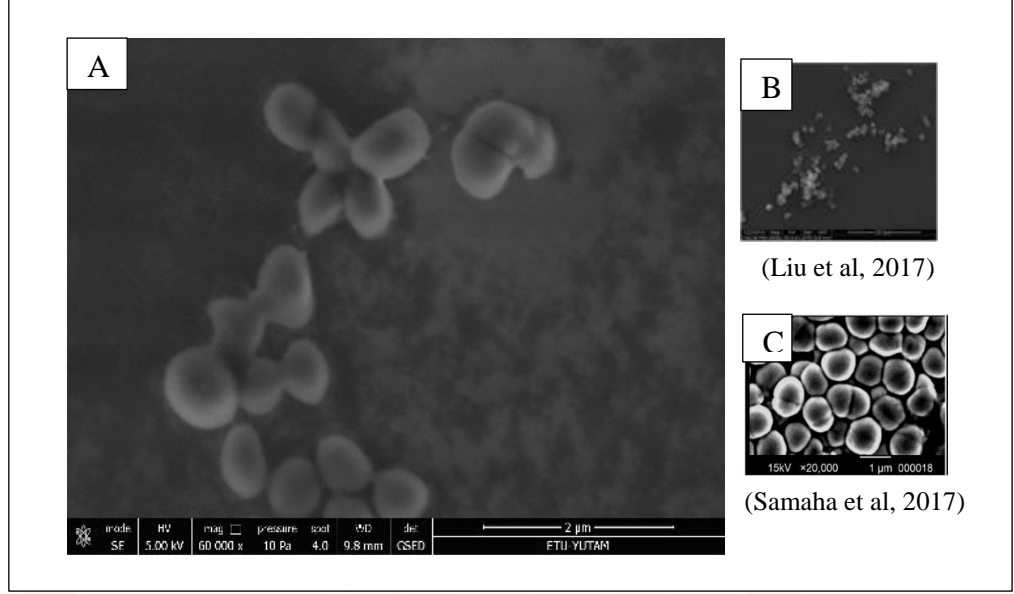


Şekil 4.17. Polipeptit Uygulanmayan *S. aureus* Hücrelerinin SEM Görüntüleri. A. Mevcut tez çalışmasında çekilmiş görüntü. B. ve C. Literatürde bulunan *S. aureus* hücrelerine ait görüntüler.

Şekil 4.17’de gösterildiği gibi *S. aureus* hücreleri biyofilm oluşturma ve yüzeye tutunma eğilimindedir. Nitekim, deneysel olarak 60.000 kat büyütme ile çekilmiş görüntülerde bu durumu desteklemektedir.

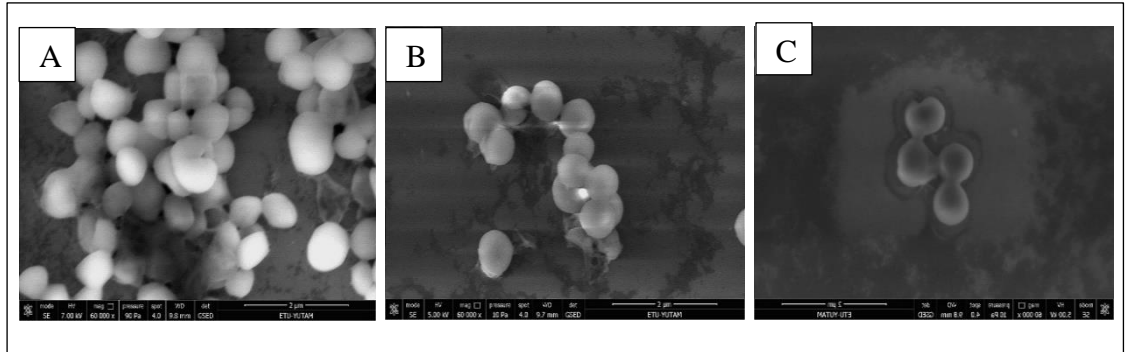


Şekil 4.18. ¼ MIC Konsantrasyonunda Polipeptit Uygulanmış *S. aureus* Hücreleri. A. Mevcut tez çalışmasında çekilmiş görüntü. B. ve C. Literatürde bulunan *S. aureus* hücrelerine ait görüntüler.



Şekil 4.19. MIC Konsantrasyonunda Polipeptit Uygulanmış *S. aureus* Hücrelerinin Görüntüleri A. Mevcut tez çalışmasında çekilmiş görüntü. B. ve C. Literatürde bulunan *S. aureus* hücrelerine ait görüntüler.

Saflaştırılmış polipeptitlerle muamele edilmiş *S. aureus* hücrelerinin $\frac{1}{4}$ MIC ve MIC konsantrasyonunda cam yüzeye tutunmalarının azaldığı görülmüştür. Literatürde bulunan görüntülerle karşılaştırıldığında, tutunan hücrelerin azalması olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.20’de de MRSA’ya ait SEM görüntüleri verilmiştir.



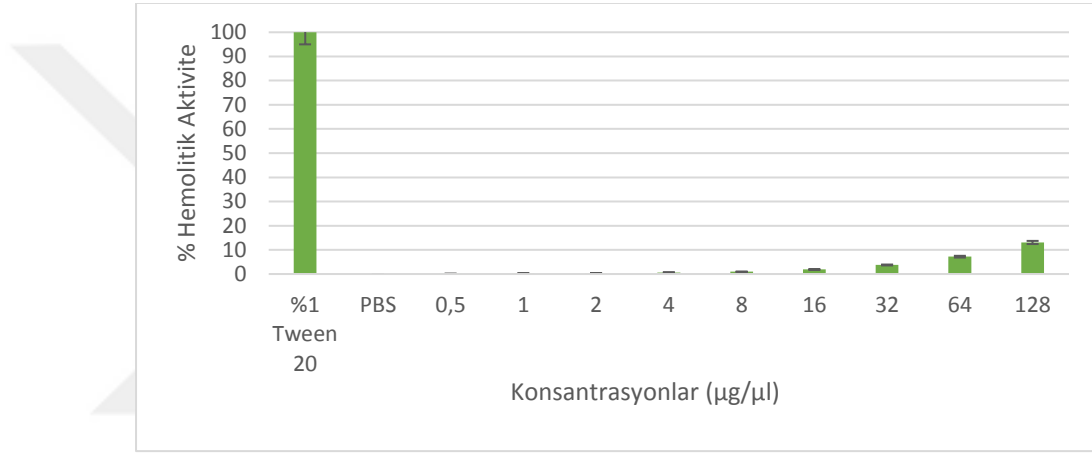
Şekil 4.20. MRSA Hücrelerinin SEM Görüntüleri A. MRSA kontrol hücreleri B. $\frac{1}{4}$ MIC konsantrasyonunda polipeptit ile muamele edilmiş MRSA hücreleri. C. MIC konsantrasyonunda polipeptit ile muamele edilmiş MRSA hücreleri.

Elde edilen bulgular ışığında, saflaştırılan polipeptit *S. aureus* ve MRSA hücrelerinde morfolojik değişime yol açtığı sonucuna ulaşıldı. Literatürde yapılmış

çalışmalarda, MIC değerinde *S. aureus* hücrelerinin membran yapısının bozulduğu görülmektedir. Benzer şekilde, MIC değerinde polipeptit eklenmiş hücrelerde membran yapısının bozulduğu ve tutunan hücre sayısının azaldığı görülmüştür.

4.11. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Araştırma amaçlı ticari kan ile yapılan hemolitik aktivite testinde PBS negatif kontrol, Tween 20 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Şekil 4.21’de hemolitik aktivite sonucuna ait grafik verilmiştir.



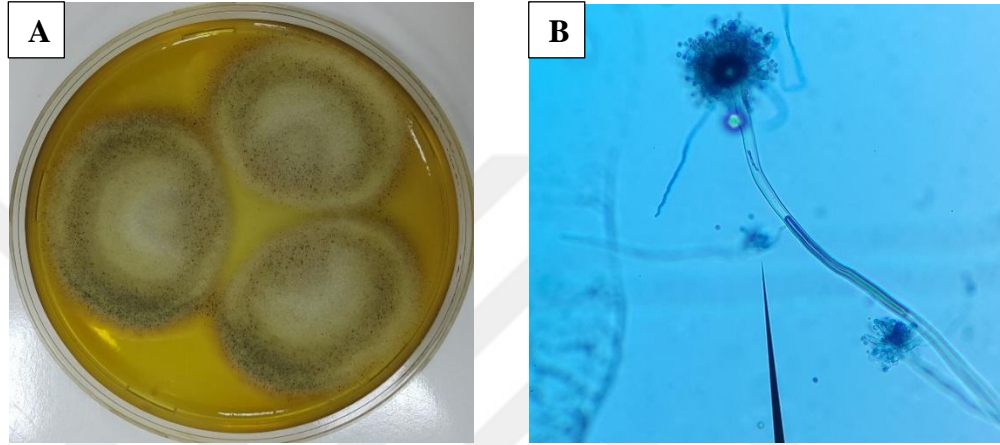
Şekil 4.21. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Hemolitik aktivite testi antimikrobiyal moleküllerin eritrosit hücrelerine verebileceği zararın değerlendirildiği bir yöntemdir (Mahajan et al. 2014; Wu et al. 2014). Literatürdeki örneklerden olan mikasin’de hemolitik aktivite göstermemektedir. Plektasin ise 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonunda eritrosit hücrelerinin yarısını hemolize uğratmaktadır (Zhu et al, 2012; Umerska et al, 2017). Yapılan deneylerin pozitif kontrol ile karşılaştırılması sonucu, saflaştırılan polipeptitin 0,5 – 128 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyon aralığında, kanda hemoliz meydana getirmediği belirlenmiştir.

4.12. A01 Kodlu İzolatın Klasik ve Moleküler Tanısı

4.12.1. Klasik Tanı

A01 izolatının cins bazında tanısı için hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Samson et al. 2014). Şekil 4.22’ de A01 kodlu izolatın görüntüleri verilmiştir.



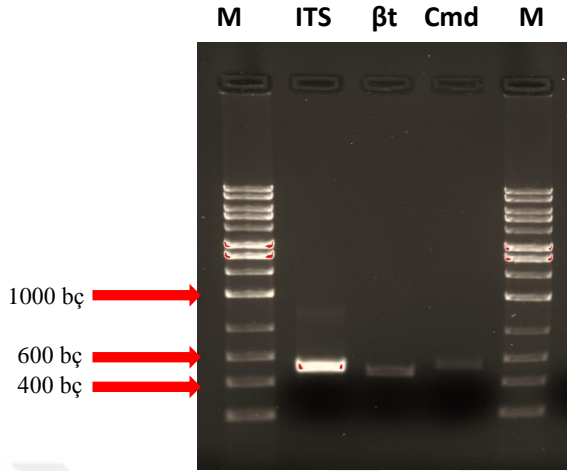
Şekil 4.22. A01 Kodlu İzolatın Görüntüleri A. Koloni görüntüsü B. Konidiafor ve konidiler

Moleküler tanı çalışmaları yapılmadan önce, cins bazında tanı yapılması PZR’de hangi bölgelerin çoğaltılacağına belirlemesi açısından önemlidir (Samson et al. 2014). Klasik tanı ile A01 izolatının *Aspergillus* cinsine ait bir fungus olduğu belirlenerek, ITS’e ek olarak kalmodulin bölgesinin de çoğaltılması gerektiği bulunmuştur.

4.12.2. Moleküler Tanı

Moleküler olarak tür tayini için A01 izolatından DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA’daki ITS ve kalmodulin bölgelerinin PZR’ları yapılmıştır. Buna ek olarak, *Aspergillus* cinsi funguslarda çalışılmış olan β -tubulin gen bölgesi de çoğaltılmıştır (Seip et al. 1990). Çoğalan PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Şekil 4.23’de agaroz jel elektroforezinin görüntüsü verilmiştir. ITS ve

kalmodulin ürünleri yaklaşık 600 baz çifti, β -tubulin ise ortalama 550 baz çifti uzunluğundadır.



Şekil 4.23. A01 İzolatının ITS, β -tubulin(Bt) ve Kalmodulin (Cmd) PZR Görüntüsü.

Elde edilen PZR ürünleri, saflaştırılmış ve çift yönlü okuma ile dizi analizi yaptırılmıştır. Hizmet alımı ile gerçekleştirilen bu aşama ile elde edilen veriler, Bioedit programında analiz edilmiş ve blast algoritması (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak GenBank'ta kayıtlı diğer türlerle karşılaştırılmıştır. ITS bölgesinin karşılaştırılması sonucu A01 izolatının *Aspergillus tubingensis* olduğu belirlenmiştir. Kalmodulin ve β -tubulin dizilerinin karşılaştırılması ile bu sonuçlar doğrulanmıştır. ITS bölgesine ait dizi, MH540151 NCBI kayıt numarası ile NCBI veritabanına kaydedilmiştir. EK1, 2 ve 3'te Bioedit program görüntüleri verilmiştir.

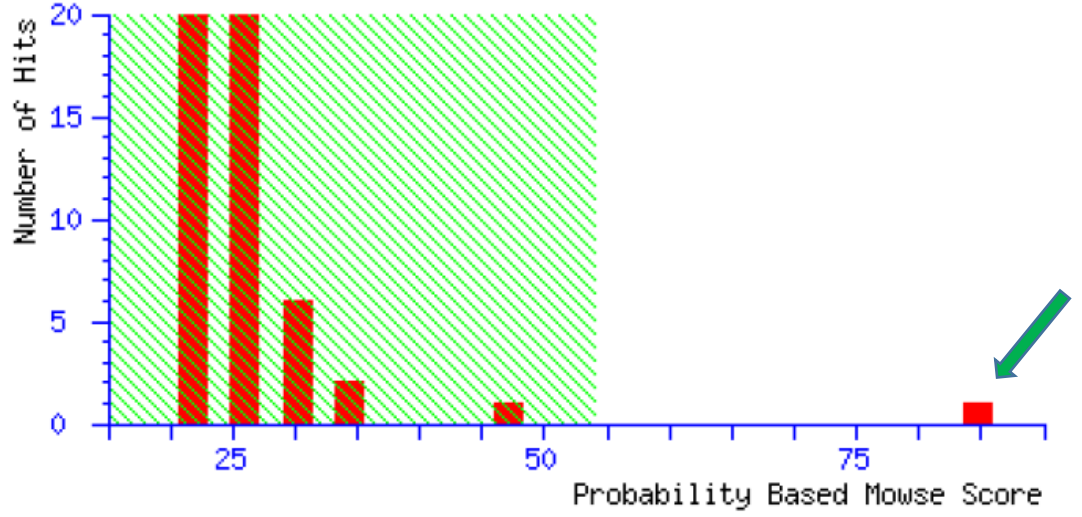
4.13. MALDİ-TOF / MS ile Proteinin Karakterizasyonu

Saflaştırılmış polipeptitin belirlenmesi peptit kütle parmak izi yaklaşımı ile yapılmıştır. “Applied Biosystem 4700 Proteomics Analyzer 430510” cihazı ile yapılan MALDİ-TOF MS analizi, hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.24'de gösterilen skor histogramı identifikasyonun doğru olup olmadığı vermektedir. Burada protein skoru $-10 \times \log(P)$ formülü ile hesaplanır. Yaptığımız analizde 54'ten büyük protein skor değerleri anlamlıdır ($p < 0.05$). Deneysel skor değeri ise 85'dir. Mascot analizinde veritabanında bulunan proteinlerle en yüksek benzerliği gösteren proteinler karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Mascot analizi sonuçlarına

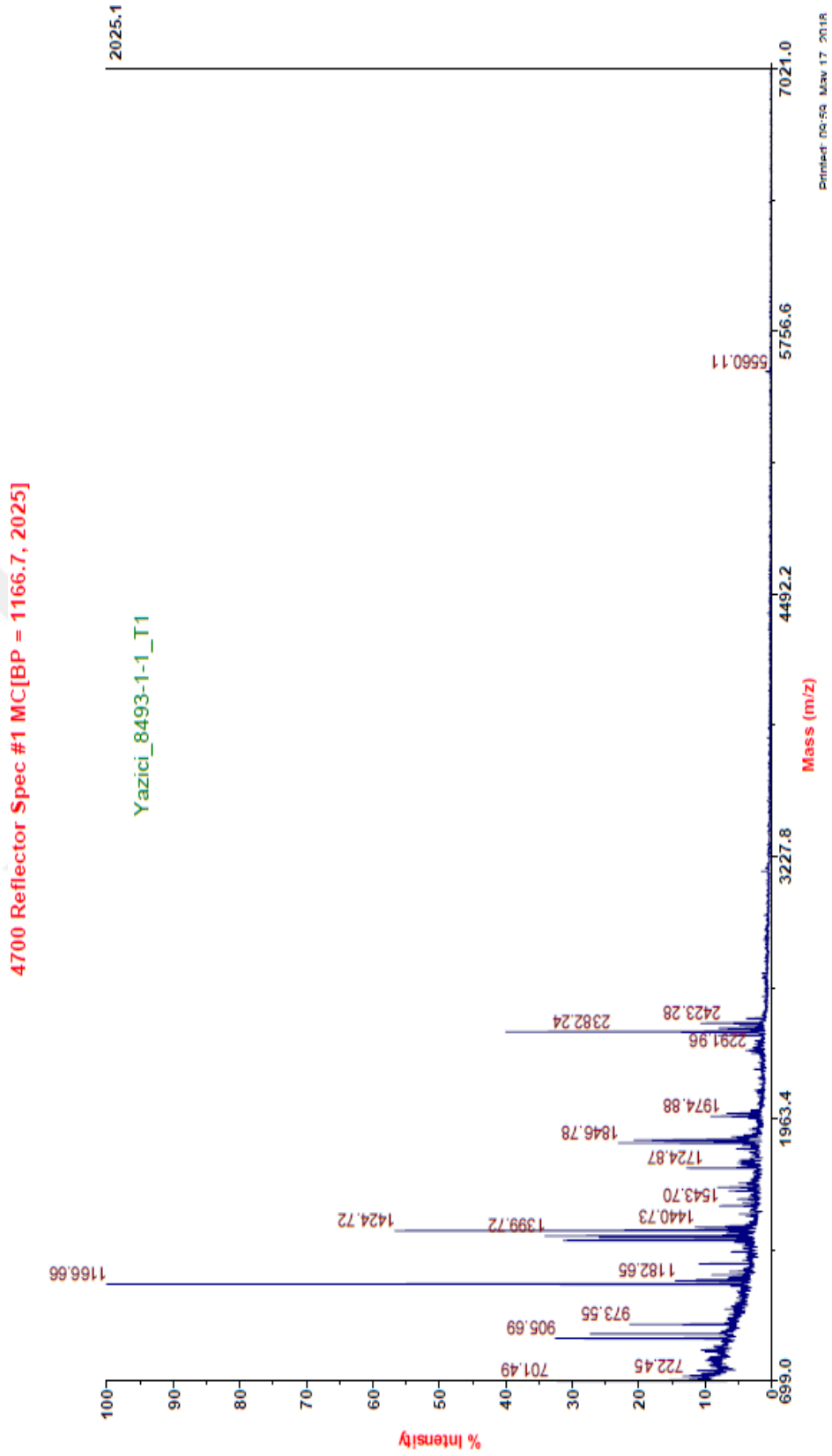
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

göre, %57 sekans benzerlik oranı ile *Aspergillus tubingensis*'in karakterize edilmemiş proteini (A0A1L9MXD7_ASPTU) olduğu bulunmuştur. Şekil 4.25'de de küttele/ zaman grafiği verilmiştir.



Şekil 4.24. Skor Histogramı.

Analiz sonuÇlarına göre veri tabanında eŐleŐen proteinin aa dizisi Şekil 4.26'da verilmiştir. Kırmızı ile iŐaretli aa eŐleŐen bđlgeleri gđstermektedir. Bu Şekilde proteinin, 92 aa uzunluğunda ve 10.087 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. % Yoğunluk ve Kütle / Zaman

MQLTSAIILFAAMGAIANPIAAESDLLARDAQLSKYGGCSLEHNTCT
YRKDGKNHVVSCPSAANLRCKTDRHHCEYDDHHKTVDCQTPV

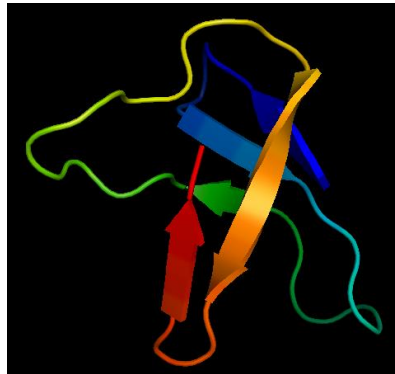
Şekil 4.26. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteinin aa Dizisi. Kırmızı olarak işaretlenmiş aa'ler eşleşmelerin olduğu bölgelerdir.

NCBI veritabanı karşılaştırmalarında polipeptitin antifungal protein süper ailesine ait korunmuş bir bölge taşıdığı bulunmuştur. Şekil 4.27'de antifungal protein süper ailesinin protein üzerindeki lokasyonu verilmiştir. Literatürde afp olarak adlandırılan filamentöz fungus kaynaklı AMP'ler *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinden izole edilmişlerdir (Nakaya et al. 1990; Park et al. 2008). Ancak literatürde *A. tubingensis*'ten izole edilen afp'ye rastlanmamıştır. Ayrıca literatürde bulunan afp'lerin antibiyofilm aktiviteleri de değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.27. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteininin Korunmuş Bölgesinin Gösterimi.

Proteinin 3 boyutlu yapısı ve "CPHmodels-3.2 Server" algoritması ile tahmin edilmiştir. Bu algoritma yardımıyla elde edilen veriler "PyMOL Molecular Graphics System" programı ile hazırlanmıştır. Şekil 4.28'de proteinin tahmini 3 boyutlu yapısı görülmektedir. Proteinin aa dizisinde diğer afp moleküllerine benzer şekilde 6 tane sistein aa'i bulunmaktadır. İlk 18 aa'lik kısım diğer afp'lerde olduğu ekstrasellüler ortama salgılanmada sinyal bölgesi olarak görev yapmaktadır.



Şekil 4.28. A0A1L9MXD7_ASPTU Proteininin 3 Boyutlu Yapısı

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son on yıldır, yeni nesil antibiyotikler olarak gösterilen protein kaynaklı antimikrobiyal moleküller, antibiyotik tarama çalışmalarının merkezinde olmuştur. AMP'ler antimikrobiyal özelliklerinin yanında, antibiyofilm, antikanser, antiinflamator, antiviral gibi özellikleri de birlikte barındırabilir. Bu özelliklerin ne kadar çoğunu birlikte taşırsa, o AMP o kadar değerli olur. Literatürde, filamentöz fungus kaynaklı doğal ABP'ler bulunmamaktadır. Bu nedenle, literatürdeki bu boşluğu tamamlamak ve yeni ABP molekülü ortaya koymak için filamentöz funguslardan AMP üreticilerinin seleksiyonu gerçekleştirildi. Bu AMP üretici funguslardan antibiyofilm özelliği taşıyan polipeptit izole edilerek, saflaştırıldı ve karakterize edildi.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışması ile ilk kez filamentöz funguslardan antibiyofilm aktiviteye sahip polipeptit gösterilmiştir. Maldi-TOF/MS sonuçlarına göre bu polipeptitin, UniProt veritabanında bulunan A0A1L9MXD7_ASPTU kodlu karakterize edilmemiş bir protein olduğu bulunmuştur. Bu polipeptitin, *S. aureus* ve MRSA suşlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı da belirlenmiştir.

Elde edilen polipeptit, APD3 veritabanında bulunan adlandırma sisteminde önerildiği gibi, *Aspergillus tubingensis* tür isminin ilk iki harfleri alınarak, bunların sonuna "sin" ekinin eklenmesi ile oluşturulan "astusin" ismi ile adlandırılmıştır.

Astusinin, üzerinde çok fazla çalışma yapılmış olan plektasin, mikasin ve eurosin gibi filamentöz fungus kaynaklı AMP molekülleri ile karşılaştırıldığında, AMP özelliğinin yanında, antibiyofilm aktivitesinin de bulunması bakımından avantaja sahip olduğu gösterilmiştir.

İleri çalışmalar olarak bu ABP molekülünün farklı bakterilerde antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmelidir. Ayrıca fizyolojik koşullara dayanıklılığı değerlendirilerek in vivo deneylerde uyumluluğu, aktivitesi ve stabilitesi belirlenmelidir.

Bu tez çalışması ile izole edilen astusinin, klinikte kullanıma geçirilebilmesi için farklı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar aşağıda maddeler halinde sunulmuş ve ileriki çalışmalar için önerilmiştir.

1. *S. aureus*'un farklı klinik suşlarında ve diğer stafilokoklarda MIC ve MBIC değerleri karşılaştırılarak, sonuçları değerlendirilmelidir.
2. Astusinin üretimi *A. tubingensis* A01 izolatında (Yabanil tip) optimize edilmelidir. Ayrıca rekombinant üretimi için uygun ekspresyon sistemleri bulunmalıdır.
3. Semisentetik ve sentetik ABP molekülü üretiminde, astusin kalıp olarak kullanılabilir. Bu nedenle, D ve L formlarının aktiviteleri karşılaştırılabilir ve proteazlara daha direçli hale getirilmesi için modifikasyonlara tabi tutulabilir.
4. Astusinin, sıcaklığa dayanımı, pH değişimindeki davranışı ve çeşitli kimyasallardaki aktivite değişimleri değerlendirilmelidir.
5. Fizyolojik pH koşullarında dayanımı değerlendirilmeli ve transplantasyona uygun olup olmadığı belirlenmelidir.
6. Astusinin ilaç sanayisinde kullanılabilme potansiyeli değerlendirilmelidir.
7. İnsan hücrelerine toksik özellik gösterip göstermediği belirlenmelidir.
8. Hayvan deneyleri ve faz çalışmaları ile *in vivo* antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Akkara, M., Tosun H., 2014. Funguslardan elde edilen endüstriyel ürünler. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 9, 46-53.
- Anunthawan, T., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E., Klaynongsruang S., 2015. Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes* 1848, 1352-1358.
- Archer, N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirtliff M.E., 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2, 445-459.
- Asan, A., 2010. Tıpta Önemli Mantarların Filogenetik ve Sistematığı. *Enfeksiyon Dergisi*. 86-95.
- Baindara, P., Mandal S.M., Chawla N., Singh P.K., Pinnaka A.K., Korpole S., 2013. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK. DU. 4 isolated from a rhizosphere soil sample. *Amb Express* 3, 2.
- Balouiri, M., Sadiki M., Ibsouda S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
- Blecha, F., Shi J., 1998. Synthetic antimicrobial peptide. Google Patents.
- Bozdoğan, B., Yıldız Ö., Oryaşın E., Kırdar S., Gülcü B., Aktepe O., Arslan U., Çoban G.B., Ahmet Yılmaz, Coşkun S.A., Güdücüoğlu H., 2013. t030, Türkiye'deki Hastanelerden İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatları Arasında En Yaygın spa Tipidir. *Mikrobiyol Bul* 47, 571-581.
- 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, 248-254.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology* 3, 238.
- Brötz, H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Götz F., Bierbaum G., Sahl H.G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular microbiology* 30, 317-327.
- Butler, E., Mann M.P., 1959. Use of cellophane tape for mounting and photographing phytopathogenic fungi. *Amer Phytopathological Soc* 3340 Pilot Knob Road, St Paul, Mn 55121, pp. 231-232.
- Camilio, K.A., 2013. Short Lytic Anticancer Peptides as a Novel Therapy against Cancer. 48-51.
- Chugh, J., Wallace B., 2001. Peptaibols: models for ion channels. Portland Press Limited. 36-41.
- Cramton, S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Götz F., 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity* 67, 5427-5433.
- Dawgul, M., Maciejewska M., Jaskiewicz M., Karafova A., Kamysz W., 2014. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol. Pharm* 71, 39-47.
- De Brucker, K., Delattin N., Robijns S., Steenackers H., Verstraeten N., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L., Dovgan B., Fröhlich M., 2014. Derivatives of the mouse cathelicidin-related antimicrobial peptide (Cramp) inhibit fungal and bacterial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58, 5395-5404.

- De La Fuente-Núñez, C., Korolik V., Bains M., Nguyen U., Breidenstein E.B., Horsman S., Lewenza S., Burrows L., Hancock R.E., 2012. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 2696-2704.
- De La, Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Mansour S.C., Reckseidler-Zenteno S.L., Hernández D., Brackman G., Coenye T., Hancock R.E., 2015. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry & biology* 22, 196-205.
- 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.
- Di Luca, M., Maccari G., Maisetta G., Batoni G., 2015. Baamps: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling* 31, 193-199.
- Donlan, R.M., 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1387-1392.
- Dubos, R.J., 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of experimental medicine* 70, 1.
- Dusane, D.H., Damare S.R., Nancharaiyah Y.V., Ramaiah N., Venugopalan V.P., Kumar A.R., Zinjarde S.S., 2013. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *PloS one* 8, e64501.
- Dürr, U.H., Sudheendra U., Ramamoorthy A., 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes* 1758, 1408-1425.
- Ehrlich, G.D., Renata Arciola C., 2012. From Koch's postulates to biofilm theory. The lesson of Bill Costerton. *International Journal of Artificial Organs* 35, 695.
- Essig, A., Hofmann D., Münch D., Gayathri S., Künzler M., Kallio P.T., Sahl H.-G., Wider G., Schneider T., Aebi M., 2014. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, jbc. M114. 599878.
- Foerster, S., Unemo M., Hathaway L.J., Low N., Althaus C.L., 2016. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *Bmc microbiology* 16, 216.
- Ganz, T., Lehrer R.I., 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular medicine today* 5, 292-297.
- Goldman, M.J., Anderson G.M., Stolzenberg E.D., Kari U.P., Zasloff M., Wilson J.M., 1997. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88, 553-560.
- Gün, İ., Ekinci F.Y., 2009. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda Dergisi* 34.
- Haider, S.R., Reid H.J., Sharp B.L., 2012. Tricine-sds-page, *Protein Electrophoresis*. Springer, pp. 81-91.
- Hamamoto, K., Kida Y., Zhang Y., Shimizu T., Kuwano K., 2002. Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. *Microbiology and immunology* 46, 741-749.
- Hammami, R., Ben Hamida J., Vergoten G., Fliss I., 2008. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic acids research* 37, D963-D968.
- Hammami, R., Zouhir A., Hamida J.B., Fliss I., 2007. Bactibase: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *Bmc Microbiology* 7, 89.

- Hancock, R.E., Chapple D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1317-1323.
- Haney, E.F., Brito-Sánchez Y., Trimble M.J., Mansour S.C., Cherkasov A., Hancock R.E., 2018. Computer-aided discovery of peptides that specifically attack bacterial biofilms. *Scientific reports* 8, 1871.
- Irie, Y., Parsek M.R., 2008. Quorum sensing and microbial biofilms, *Bacterial biofilms*. Springer, pp. 67-84.
- Jenssen, H., Hamill P., Hancock R.E., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19, 491-511.
- Joo, H.-S., Otto M., 2015. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes* 1848, 3055-3061.
- Kim, Y., Nandakumar M., Marten M.R., 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* 25, 395-400.
- Kong, C., Chee C.-F., Richter K., Thomas N., Rahman N.A., Nathan S., 2018. Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, Um-C162. *Scientific reports* 8, 2758.
- Kumar, P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K., 2018. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 8, 4.
- Lakshman, D.K., Natarajan S.S., Lakshman S., Garrett W.M., Dhar A.K., 2008. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 100, 867-875.
- Lappin-Scott, H., Burton S., Stoodley P., 2014. Revealing a world of biofilms—the pioneering research of Bill Costerton. *Nature Reviews Microbiology* 12, 781.
- Lee, D.G., Shin S.Y., Maeng C.-Y., Jin Z.Z., Kim K.L., Hahm K.-S., 1999. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochemical and biophysical research communications* 263, 646-651.
- Lee, M., Ganz T., Lim D.J., 2004. Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Bmc infectious diseases* 4, 12.
- Li, M., Cha D.J., Lai Y., Villaruz A.E., Sturdevant D.E., Otto M., 2007. The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 66, 1136-1147.
- Lim, K.B., Balolong M.P., Kim S.H., Oh J.K., Lee J.Y., Kang D.-K., 2016. Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *BioMed research international* 89-95.
- Liu, X., Pai P.-J., Zhang W., Hu Y., Dong X., Qian P.-y., Chen D., Lam H., 2016. Proteomic response of methicillin-resistant *S. aureus* to a synergistic antibacterial drug combination: a novel erythromycin derivative and oxacillin. *Scientific reports* 6, 19841.
- Mahajan, R.V., Kumar V., Rajendran V., Saran S., Ghosh P.C., Saxena R.K., 2014. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One* 9, e99037.
- Mansour, S.C., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E., 2015. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science* 21, 323-329.
- Marx, F., Haas H., Reindl M., Stöffler G., Lottspeich F., Redl B., 1995. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium*

- chrysoygenum paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* 167, 167-171.
- McCarthy, H., Rudkin J.K., Black N.S., Gallagher L., O'Neill E., O'Gara J.P., 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5, 1.
- Medina, M.L., Francisco W.A., 2008. Isolation and enrichment of secreted proteins from filamentous fungi, 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation. Springer, pp. 275-285.
- Medina, M.L., Haynes P.A., Brezi L., Francisco W.A., 2005. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics* 5, 3153-3161.
- Meyer, C., Reusser F., 1967. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* 23, 85-86.
- Mohamed, M.F., Abdelkhalek A., Seleem M.N., 2016. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports* 6, 29707.
- Muhammad, N., Akbar A., Shah A., Abbas G., Hussain M., Khan T., 2015. Isolation optimization and characterization of antimicrobial peptide producing bacteria from soil. *J. Anim. Plant Sci* 25, 1107-1113.
- Mygind, P.H., Fischer R.L., Schnorr K.M., Hansen M.T., Sönksen C.P., Ludvigsen S., Raventós D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437, 975.
- Nakaya, K., Omata K., Okahashi I., Nakamura Y., Kolkenbrock H., Ulbrich N., 1990. Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *The Febs Journal* 193, 31-38.
- O'Gara, J.P., 2007. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Fems microbiology letters* 270, 179-188.
- Oda, K., Kakizono D., Yamada O., Iefuji H., Akita O., Iwashita K., 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and environmental microbiology* 72, 3448-3457.
- Oeemig, J.S., Lynggaard C., Knudsen D.H., Hansen F.T., Nørgaard K.D., Schneider T., Vad B.S., Sandvang D.H., Nielsen L.A., Neve S., 2012. Eurocin, a new fungal defensin structure, lipid binding, and its mode of action. *Journal of Biological Chemistry* 287, 42361-42372.
- Otto, M., 2008. *Staphylococcal biofilms, Bacterial biofilms*. Springer, pp. 207-228.
- Ottow, J., 1972. Rose Bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. *Mycologia*, 304-315.
- Park, S.-C., Yoo N.C., Kim J.-Y., Park H.K., Chae B.J., Shin S.Y., Cheong H., Park Y., Hahm K.-S., 2008. Isolation and characterization of an extracellular antimicrobial protein from *Aspergillus oryzae*. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 9647-9652.
- Paul, E.A., 2014. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- Pepper, I.L., Gerba C.P., Brusseau M.L., 2011. *Environmental and pollution science*. Elsevier.
- Pletzer, D., Coleman S.R., Hancock R.E., 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current opinion in microbiology* 33, 35-40.
- Pletzer, D., Hancock R.E., 2016. Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents. *Journal of bacteriology* 198, 2572-2578.
- Powell, W.A., Catranis C.M., Maynard C.A., 1995. Synthetic antimicrobial peptide design. *Mpmi-Molecular Plant Microbe Interactions* 8, 792.

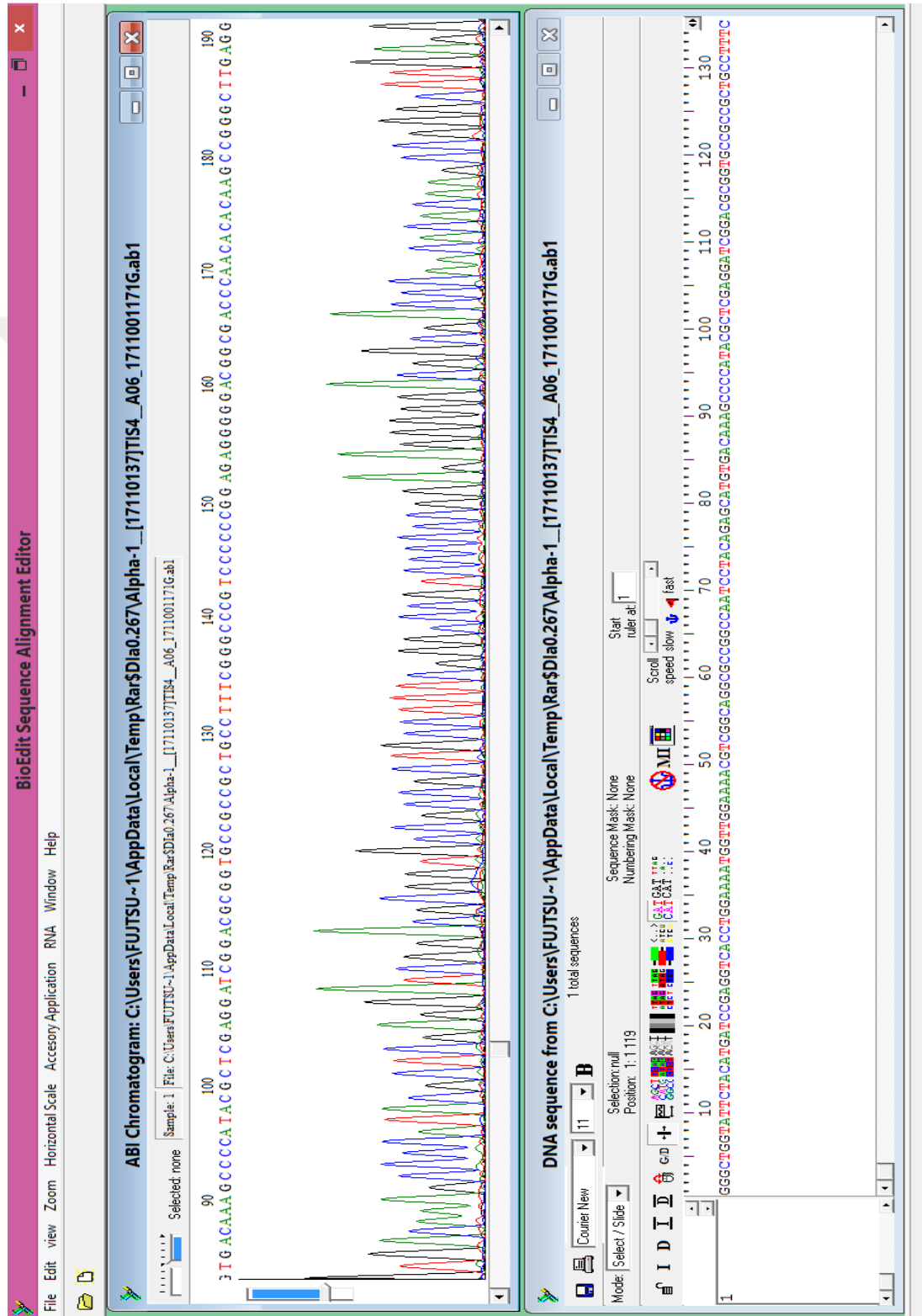
- Qi, J., Wu J., Somkuti G.A., Watson J.T., 2001. Determination of the disulfide structure of sillucin, a highly knotted, cysteine-rich peptide, by cyanylation/cleavage mass mapping. *Biochemistry* 40, 4531-4538.
- Qin, Z., Yang X., Yang L., Jiang J., Ou Y., Molin S., Qu D., 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Journal of medical microbiology* 56, 83-93.
- Rao, A.G., Zhong L., 1997. Synthetic antimicrobial peptides. Google Patents.
- Rebuffat, S., Goulard C., Bodo B., 1995. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1849-1855.
- Reffuveille, F., 2015. Antibiofilm Peptide Development for Clinical and Industrial Applications. *Postdoc Journal* 3, 25-35.
- Reffuveille, F., Josse J., Vallé Q., Mongaret C., Gangloff S.C., 2017. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field, The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. 12-28.
- Robinson, W.E., McDougall B., Tran D., Selsted M.E., 1998. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 63, 94-100.
- Ruppen, C., Sendi P., 2015. Time kill assays for *Streptococcus agalactiae* and synergy testing. *Protoc Exch.* doi 10.
- Samson, R.A., 2010. Food and indoor fungi. Cbs-Knaw Fungal Biodiversity Centre.
- Samson, R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.-B., Hubka V., Klaassen C.H., Perrone G., Seifert K.A., Susca A., Tanney J.B., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology* 78, 141-173.
- Schägger, H., 2006. Tricine-sds-page. *Nature protocols* 1, 16.
- Schillaci, D., Cusimano M., Russo D., Arizza V., 2014. Antimicrobial peptides from echinoderms as antibiofilm agents: a natural strategy to combat bacterial infections. *Italian Journal of Zoology* 81, 312-321.
- Schitteck, B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology* 2, 1133.
- Schneider, T., Kruse T., Wimmer R., Wiedemann I., Sass V., Pag U., Jansen A., Nielsen A.K., Mygind P.H., Raventós D.S., 2010. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* 328, 1168-1172.
- Schroeder, K., Jularic M., Horsburgh S.M., Hirschhausen N., Neumann C., Bertling A., Schulte A., Foster S., Kehrel B.E., Peters G., 2009. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PloS one* 4, e7567.
- Seebah, S., Suresh A., Zhuo S., Choong Y.H., Chua H., Chuon D., Beuerman R., Verma C., 2006. Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research* 35, D265-D268.
- Seip, E., Woloshuk C., Payne G., Curtis S., 1990. Isolation and sequence analysis of a beta-tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. *Applied and environmental microbiology* 56, 3686-3692.
- Seshadri, Sundararajan V., Gabere M.N., Pretorius A., Adam S., Christoffels A., Lehväslaiho M., Archer J.A., Bajic V.B., 2011. Dampd: a manually curated antimicrobial peptide database. *Nucleic acids research* 40, D1108-D1112.
- Sharma, A., Gupta P., Kumar R., Bhardwaj A., 2016. dpabbs: a novel in silico approach for predicting and designing anti-biofilm peptides. *Scientific reports* 6, 21839.

- Shukla, S.K., Rao T.S., 2017. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. *bioRxiv*, 100214, 23-34.
- Silva, F., Lourenço O., Queiroz J.A., Domingues F.C., 2011. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *The Journal of antibiotics* 64, 321.
- Simões, M., Simoes L.C., Vieira M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43, 573-583.
- Souza-Motta, C.M.d., Cavalcanti M.A.d.Q., Fernandes M.J.d.S., Lima D.M.M., Nascimento J.P., Laranjeira D., 2003. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 273-280.
- Su, H.-N., Chen Z.-H., Song X.-Y., Chen X.-L., Shi M., Zhou B.-C., Zhao X., Zhang Y.-Z., 2012. Antimicrobial peptide trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 7, e45818.
- Teixeira, M.L., Dalla Rosa A., Brandelli A., 2013. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis* subsp. *spizezinii* showing inhibitory activity towards *Haemophilus parasuis*. *Microbiology* 159, 980-988.
- Tejesvi, M., Segura D., Schnorr K., Sandvang D., Mattila S., Olsen P., Neve S., Kruse T., Kristensen H., Pirttilä A., 2013. An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* 60, 153-159.
- Tucker, A.T., Leonard S.P., DuBois C.D., Knauf G.A., Cunningham A.L., Wilke C.O., Trent M.S., Davies B.W., 2018. Discovery of Next-Generation Antimicrobials through Bacterial Self-Screening of Surface-Displayed Peptide Libraries. *Cell* 89-102.
- Umerska, A., Cassisa, V., Bastiat, G., Matougui, N., Nehme, H., Manero, F., ... & Saulnier, P. (2017). Synergistic interactions between antimicrobial peptides derived from plectasin and lipid nanocapsules containing monolaurin as a cosurfactant against *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*, 12, 5687-5699.
- Waghu, F.H., Barai R.S., Gurung P., Idicula-Thomas S., 2015. Campr3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research* 44, D1094-D1097.
- Wang, G., 2017. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. *Cabi*.118-120.
- Wang, G., Li X., Wang Z., 2015a. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research* 44, D1087-D1093.
- Wang, J., Wang F., Shang J., Chen B., 2011. An efficient method for extraction of secreted proteins of a filamentous fungus, *Cryphonectria parasitica*. *J Proteomics Bioinform* 4, 125-128.
- Wang, Z., de la Fuente-Núñez C., Shen Y., Haapasalo M., Hancock R.E., 2015b. Treatment of oral multispecies biofilms by an anti-biofilm peptide. *PloS one* 10, 0132512.
- Whitmore, L., Wallace B., 2004. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research* 32, D593-D594.

- Wiegand, I., Hilpert K., Hancock R.E., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3, 163.
- Wu, X., Wang Z., Li X., Fan Y., He G., Wan Y., Yu C., Tang J., Li M., Zhang X., 2014. In Vitro and In Vivo Activity of Antimicrobial Peptides Developed Using an Amino Acid-Based Activity Prediction Method. *Antimicrobial agents and chemotherapy, Aac.* 02823-02814.
- Yüksekdağ, Z.N., Baltacı N., 2013. Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 433, 77-83.
- Zasloff ,M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415-389.
- Zhang, L.-j., Gallo R.L., 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology* 26, 14-19.
- Zhao, X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q., 2013. Lamp: a database linking antimicrobial peptides. *PLoS One* 8, 66-78.
- Zhu, S., Gao B., Harvey P.J., Craik D.J., 2012. Dermatophytic defensin with antiinfective potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8495-8500.
- Zjawiony, J.K., 2004. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *Journal of natural products* 67, 300-310.

EKLER

EK-1 ITS Sekans Analizi



EK-2 β -tubulin Sekans Analizi

The screenshot displays the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The main window shows a DNA sequence alignment for the file `ABI Chromatogram: C:\Users\FUJTSU~1\AppData\Local\Temp\Rar$Dla0.069\alpha-1-B-TUBULIN-A1_[17100583]B-tubulin-r-br_B11_1710002823G.ab1`. The sequence is displayed in a multi-colored font (A: blue, C: green, G: red, T: black) and is aligned with a reference sequence. Below the sequence, a chromatogram shows the signal intensity for each base call. The sequence is numbered from 20 to 220. The top menu bar includes File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, and Help.

The bottom window shows the DNA sequence from `C:\Users\FUJTSU~1\AppData\Local\Temp\Rar$Dla0.069\alpha-1-B-TUBULIN-A1_[17100583]B-tubulin-r-br_B11_1710002823G.ab1`. The sequence is displayed in a multi-colored font and is numbered from 1 to 130. The bottom window also includes a menu bar with File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, and Help. The bottom window also includes a toolbar with various icons for sequence manipulation and a status bar showing the current position (87) and the number of total sequences (1).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ayşenur Yazıcı
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 06.02.1989 / Kula
Medeni Hali : Evli
Telefon : +90 533 450 90 17
e-mail : aysenurozdemir@erzurum.edu.tr

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Erzurum Teknik Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2011
Yandal (Lisans)	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü İstanbul Üniversitesi, Felsefe Bölümü	2011
Lise	İbrahim Bodur Lisesi	2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi (2013-...)

Yayınlar (SCI, SCI-Expanded)

1. Antioxidant and anticancer activities of extract of Inula helenium (L.) in humanU-87 MG glioblastoma cell line, SCI-Expanded, KUBRA KOC, OZLEM OZDEMİR, AYSENUR OZDEMİR, UNSAL DOGRU, HASAN TURKEZ, Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2016.
2. Evaluation of Waste Loquat Kernels as Substrate for Lipid Production by Rhodotorula glutinis SO28 , SCI-Expanded, ÖRTÜCÜ SERKAN, ÖZDEMİR AYŞENUR, TAŞKIN MESUT, ÇEBİ KADİR, Waste and Biomass Valorization, 2016.

Hakemli Dergiler

1. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Polystyrene Polymers Doped with Boron and Coumarin Derivatives, Advanced Science Index, AKMAN FERİDE, ÇELİKEZEN FATİH ÇAĞLAR, ÖZDEMİR AYŞENUR, TÜRKEZ HASAN, Natural Science and Discovery, 2016.

Uluslararası Kongre Sunum

1. Uluslararası, Özet bildiri, Evaluation of Antibiofilm Activities of Nicotine, YAZICI AYŞENUR, ÖRTÜCÜ SERKAN, 1st International Eurasia Mycology Congress, İngilizce, 2017.
2. Uluslararası, Özet bildiri, The Isolation and Molecular Characterization of Uv-Protectant Pigment Producing Fungi for Using in Commercial Formulations of Fungal Biopreparats, YENİLMEZ AYŞE, YAZICI AYŞENUR, TAŞKIN MESUT, ÖRTÜCÜ SERKAN, 1st International Eurasia Mycology Congress, İngilizce, 2017.
3. Uluslararası, Özet bildiri, Isolation of Beauveria bassiana Secondary Metabolites and Evaluation of Their Antibacterial and Antibiofilm Activities, YAZICI AYŞENUR, ÖRTÜCÜ SERKAN, KARALTI İSKENDER, 1st International Eurasia Mycology, İngilizce, 2017.
4. Uluslararası, Özet bildiri, The Effects of the Pigments of Sporobolomyces roseus on Biofilm structure, YAZICI AYŞENUR, ÖRTÜCÜ SERKAN, TAŞKIN MESUT, 1st International Eurasia Mycology Congress, İngilizce, 2017.
5. Uluslararası, Özet bildiri, Isolation Characterization and Selection of Non Toxic Penicilium roqueforti strains from Civil Cheese, ÖRTÜCÜ SERKAN, ARSLAN MEHMET ENES, ÖZDEMİR AYŞENUR, Milano, İngilizce, 2016.
6. Uluslararası, Özet bildiri, The New Promising Oleaginous Yeast For Biodiesel Production, ÖRTÜCÜ SERKAN, TAŞKIN MESUT, ÖZDEMİR AYŞENUR, İtalya, İngilizce, 2016.
7. Uluslararası, Özet bildiri, Evaluation Of Carvacrol Derivatives on Treatment of Glioblastoma Multiforme, ÖZDEMİR AYŞENUR, FORNASARI ERİKA, TÜRKEZ HASAN, CACCIATORE IVANA, Sırbistan, İngilizce, 2015.