T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARASAL AKTİNOMİSETLERDE YENİ İLAÇ ADAYLARININ KİMYASAL VE GENOMİK OLARAK TARANMASI

Ekrem KUM

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Ocak 2019

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ekrem Kum tarafından yapılan "Karasal Aktinomistlerde Yeni İlaç Adaylarının Kimyasal ve Genomik Olarak Taranması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Ebru İnce BOSTANCI

Üye : Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Üye : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 18/01/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tecrübesini, her anlamda yardımını, ilgisini, bilgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve tecrübesini esirgemeden yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli arkadaşım Dr. Süleyman ÖZAKIN'a teşekkür ederim

Deneysel çalışmalarım sırasında laboratuvar desteği konusunda yardımlarını esirgemeyen Biyoorganik Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her daim yardım ve desteğini esirgemeyen değerli dostlarım Hayrettin DİNÇ'e ve Murat AZİZOĞLU'na teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Merve YAVUZ ve Bülent BALİ'ye teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Gülten KARAKAŞ'a çok teşekkür ederim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeden her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sevgi ve saygıyla en içten şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP proje no : FEN.17.016) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……		I
İÇİNDEKİLER……....		II
ÖZET……		IV
ABSTRACT…….		V
ÇİZELGE LİSTESİ……		VI
ŞEKİL LİSTESİ……..		VII
KISALTMALAR VE SİMGELER…….....		VIII
1.	**GİRİŞ**……	1
1.1.	Doğal Ürünler……	1
1.1.1.	Mikrobiyal Doğal Ürünler…….....	2
1.2.	Aktinomisetlerin Genel Özellikleri……...	3
1.2.1.	*Streptomyces* Cinsinin Genel Özellikleri……..	5
1.3.	Doğal Ürün Tarama Yöntemleri……	8
1.3.1.	Doğal Ürün Tarama Stratejilerinde Genomik Yaklaşımlar……...	11
1.3.2.	Doğal Ürün Tarama Stratejilerinde Metabolomik Yaklaşımlar……	13
1.3.3.	Kütle Spektrometre Temelli Genom Tarama Yöntemi…….	14
1.3.4.	Network Analizi……	16
1.4.	Yeni Nesil DNA Dizilimi……..	17
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**……...	19
3.	**MATERYAL VE METOT**…….	27
3.1.	Materyal……	27
3.1.1.	Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları……	27
3.1.2.	Kullanılan Besiyerleri……	27
3.1.3.	Ektraktsiyon İçin Kullanılan Kimyasallar…….	29
3.1.4.	LC-MS/MS Analizlerinde Pozitif Kontrol olarak Kullanılan Antibiyotikler…...	29
3.1.5.	Kullanılan Cihazlar……	29
3.2.	Metot…….	30
3.2.1.	*Streptomyces* İzolatlarının Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Sekonder Metabolitlerinin Ekstraktsiyonu……	30
3.2.2.	Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini……...	30
3.2.3.	Sekonder Metabolitlerin LC/MS/MS Analizleri……...	31
3.2.4.	GNPS Network ve Dereplikasyon Analizleri……	31

3.2.5. Genomik DNA Ekstraktsiyonu……. 31
3.2.6. Genom Dizileme ve Biyoinformatik Analizler……. 32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……... 33
4.1. Bulgular……. 33
4.1.1. *Streptomyces* İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri…… 33
4.1.2. *Streptomyces* sp. BA2 İzolatının Genom Özellikleri…… 40
4.1.2.1. *Steptomyces* sp. BA2 İzolatının Biyosentetik Gen Kümelerinin Analizi……. 41
4.1.3. *Streptomyces* İzolatlarının Dereplikasyon ve Nework Analizleri……. 44
4.1.3.1. GNPS Dereplikasyon Analiz……. 45
4.1.3.2. GNPS Network analizi…….. 47
4.1.3.3. Streptomyces sp. BA2 İzolatına Ait GNPS Network Analizi……... 49
4.1.4. Glikogenomik Çalışmalar……. 51
4.2. Tartışma……. 58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 65
6. KAYNAKLAR……. 67
ÖZGEÇMİŞ…… 77

ÖZET

KARASAL AKTİNOMİSETLERDE YENİ İLAÇ ADAYLARINIIN KİMYASAL VE GENOMİK OLARAK TARANMASI

DOKTORA TEZİ

Ekrem KUM

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Karasal aktinomisetler yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için önemli kaynaklardan biridir. Bu çalışmada, izolasyonu ve teşhisi daha önce yapılmış olan lokal *Strepromyces* izolatlarının biyoaktif doğal ürün üretme kapasitelerini bulmak için genomik ve metabolomik yaklaşımlar kullanıldı. 6 *Streptomyces* izolatı (AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29) modifiye edilen üç farklı besiyerinde üretildi ve metabolitler farklı çözücüler kullanılarak ekstrakte edildi. Bu metabolitlerin patojen bakteriler ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri saptandı. Mikrobiyal organik ekstraktların denenen tüm test organizmalarına karşı yüksek oranda antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Geniş spektrum ve yüksek zon çapı açısından en iyi aktiviteye GYM besiyerinde üretilen izolatların ekstraktlarında rastlandı. *Streptomyces*'ların ürettikleri metabolitlerin analizi için sıvı kromatografisi-ikili kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) kullanıldı. İzolatların üretmiş oldukları metabolitlerin kimyasal özellikleri ve ilişkili oldukları metabolik yolakların tespit edilmesiyle, bu metabolitlerin dereplikasyonu ve kesin olmayan identifikasyonları değerlendirildi. Dereplikasyon analizleri sonucunda; lyngbyatoxin A, aktinomycin D, enterocin, alteramide B, malyngamide K ve bouillonamide B gibi önemli biyoaktif doğal ürünlerin varlığı ortaya kondu. Genom analizi ile *Streptomyces* sp. BA2 genomunda; poliketid sentaz (PKS), ribosomal olmayan peptid sentetaz (NRPS), terpen, ektoin, indol, lantibiyotik ve sideroforlar gibi farklı doğal ürünleri sentezleyebilme potansiyeline sahip ve kaydadeğer çeşitlilikte biyosentetik gen kümeleri tespit edildi. Daha da önemlisi, glikogenomik stratejisi kullanılarak, *Streptomyces* sp. BA2'nin kültür ortamında yeni bir glikolize bileşiğe ve bu bileşiğin sentezinden sorumlu olduğu düşünülen PKS-II bütirilakton gen kümesine ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Aktinomisetler, *Streptomyces,* Doğal ürünler, Kütle spektrometresi, Mrtabolomik, GNPS, Sekonder Metabolitler, Genomik, Genom Madenciliği.

ABSTRACT

SCREENING OF NOVEL DRUG CANDIDATES IN TERESTRIAL ACTINOMYCETES BY USING CHEMICAL AND GENOMIC TOOLS

PhD THESIS

Ekrem KUM

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

2019

Terrestrial actinomycetes are an important source to discovery novel bioactive compounds. In this study, the previously isolated and identified rhizosphere *Streptomyces* strains were screened to explore the bioactive natural product capacity by using genomics and metabolomics approaches. The six *Streptomyces* strains (AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 and CAH29) were cultivated in three modified culture media and metabolites were extracted by using different organic solvents. The antimicrobial activity was determined against to pathogen bacteria and *C. albicans*. The microbial organic extracts had high antibacterial activities against to all tested microbes. The highest antimicrobial activity in terms of high zone diameter and wide spectrum was obtained from culture extracts of GYM medium for all organisms. Metabolic profiling was performed by a non-targeted LC-MS/MS approach. Dereplication and tentative identification of natural products were evaluated for common chemical properties and their associated pathways. Significant bioactive natural products such as lyngbyatoxin A, actinomycin D, enterocin, alteramide B, malyngamide K and bouillonamide B were determined. The genome of *Streptomyces* sp. BA2 was prospected in search of biosynthetic gene clusters including polyketide synthase (PKS), nonribosomal peptide synthetase (NPRS), terpene, ectoin, indole, lantibiotics, and siderophores. It has been determined the considerable diversity of natural product biosynthetic gene clusters in its genome. More importantly, according to the glycogenomics study, an unknown glycosylated compound associated with a PKS-II butyrolactone gene cluster was established through chemical and genomic analyses.

Keywords: Actinomycetes, *Streptomyces*, Natural Products, Mass Spectrometry, Metabolomics, GNPS, Secondary Metabolites, Genomics, Genome mining.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Farklı Aktinomisetler tarafından üretilen antibiyotiklerin yıllara göre sayısı	3
Çizelge 1.2.	*Streptomyces* cinsi tarafından üretilen bazı doğal ürünler	8
Çizelge 4.1.	AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besiyerinde üretilmiş ve etil asetat ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri	34
Çizelge 4.2.	AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besiyerinde üretilmiş ve diklorometan ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikroiyal aktiviteleri	36
Çizelge 4.3.	AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besiyerinde üretilmiş ve metanol ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikroiyal aktiviteleri	39
Çizelge 4.4.	*Streptomyces* sp. BA2 izolatının genom dizilimi	40
Çizelge 4.5.	*Streptomyces* sp. BA2 izolatının genom özellikleri	40
Çizelge 4.6.	Streptomyces sp. BA2'nin genomunda sekonder metabolit biyosentetik gen kümelerinin antiSMASH programı ile tanımlanması	42
Çizelge 4.7.	Streptomyces izolatlarına ait dereplikasyon analizi (D: Diklorometan E: etilasetat, M: Metanol)	46
Çizelge 4.8.	LC-MS/MS analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan bileşikler.	52
Çizelge 4.9.	Eritromisine ait 719.477 Da moleküler iyonunda tespit edilen B ve Y şeker iyonlarına karşılık gelen şekerler ve onların biyosentezinden sorumlu genler	54
Çizelge 4.10	BA2 ve kanamisin ile ortak olarak üretilen 324. 142 moleküler iyonunun içerme ihtimali olan şekerler ve bunların biyosentezinden sorumlu genler	55
Çizelge 4.11.	460.268 moleküler iyonunda tespit edilen şeker ve onların biyosentezinden sorumlu genler	57
Çizelge 4.12.	438.135 moleküler iyonunda tespit edilen şeker ve onların biyosentezinden sorumlu genler	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	*Streptomyces* cinsine ait üyelerin hayat döngüsü	5
Şekil 1.2.	*S. lividans'*a ait koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü	6
Şekil 1.3	Doğal ürün araştırmalarında kullanılan iki yaklaşımın karşılaştırılması	10
Şekil 1.4.	Doğal ürün keşfinde 'omik' teknolojileri	11
Şekil 1.5.	Genom madenciliğinin şematik sunumu	13
Şekil 1.6.	Metabolomik bir çalışmanın iş akışına genel bakış	14
Şekil 1.7.	Moleküler Network Analizi	17
Şekil 3.1.	Genom dizileme ve biyoinformatik analizlerin şematik olarak gösterilmesi	34
Şekil 4.1.	Farklı izolatlara ait etil asetat ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri	35
Şekil 4.2.	Farklı izolatlara ait diklorometan ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri	37
Şekil 4.3.	Farklı izolatlara ait metanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri	38
Şekil 4.4.	antiSMASH programı ile kontig 1'de biyosentetik gen kümelerinin analizi	41
Şekil 4.5.	antiSMASH programı ile kontig 2'de biyosentetik gen kümelerinin analizi	41
Şekil 4.6.	Tüm izolatlardan elde edilen Network'e genel bir bakış	48
Şekil 4.7.	Bütün gruplar tarafından üretilen kutucukların oransal dağılımı	49
Şekil 4.8.	*Streptomyces* sp. BA2 izolatına ait network analizi	50
Şekil 4.9.	Eritromisine ait 719.477 moleküler iyonun MS/MS spektrumu	53
Şekil 4.10.	324.142 moleküler iyonun bulunduğu network kümesi	55
Şekil 4.11.	(a) BA2 genomunda kontig 2 de yer alan 5 no'lu gen kümesi (b) En yakın benzerlik gösterdiği Auricin ve Lactonamycin gen kümeleri.	56

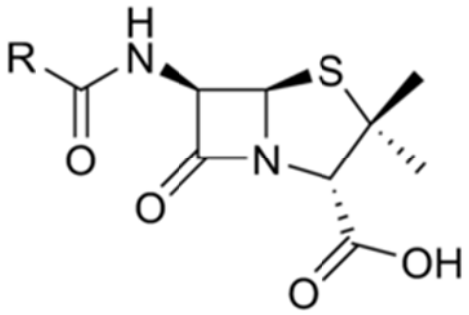
KISALTMA VE SİMGELER

antiSMASH : Antibiotics and secondary metabolite analysis shell
C : Sitozin
Da : Dalton
DNA : Deoksiribonükleik asit
EI : Elektron iyonizasyonu
ESI : Elekrosprey iyonizasyonu
G : Guanin
GC/MS : Gaz kromatografisi / kütle spektrometresi
GNPS : Global Natural Product Social Molecular Networking
LC/MS : Sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi
MALDI : Matriks ilişkili lazer desorpsiyon iyonizasyonu
MS : Kütle spektrometresi
MS/MS : Sıralı kütle spektrometresi
NGS : Next generation genome sequencing
NMR : Nüklear magnetik rezonans
NRPS : Ribozomal olmayan peptid sentezi
PKS : Poliketid pebtid sentezi
RNA : Ribonükleik asit
TOF : Time of flight

1. GİRİŞ

1.1 Doğal Ürünler

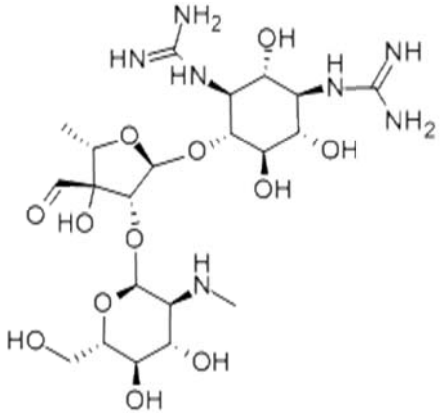
Doğal ürünler; mikroorganizmalar, bitkiler ve omurgasızlar tarafından üretilen küçük organik moleküllerdir. Aynı zamanda sekonder metabolit olarak adlandırılan doğal ürünler çeşitli ve olağandışı kimyasal yapılara ve küçük moleküler kütlelere sahiptirler (Jensen 2016, Solecka ve ark. 2012). Sekonder metabolitler, makromoleküller gibi canlılık faaliyetleri için birinci dereceden metabolik işlemlerde ve büyümede gerekli olmayan, organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlayan moleküllerdir (Katz ve Baltz 2016). Mikrobiyal sekonder metabolitler, antibiyotikleri, pigmentleri, toksinleri, enzim inhibitörlerini, bağışıklık düzenleyici ajanları, reseptör antagonistleri ve agonistlerini, pestisitleri ve antitümör ajanları içerirler (Demain 1998). Organizmaların hayatta kalmak için sentezlediği bu moleküller, çevresel koşullardan kaynaklanan stresi azaltmak ve istilacı organizmalara karşı rekabet etmek açısından avantaj sağlamaktadır. Dolayısıyla, bu metabolitlerin çoğu rakiplere karşı birer silah olarak kullanılmaktadır. Bitkiler istilacı patojenlere karşı antifungal ya da antibakteriyal maddeler üretirler. Buna karşın mikroorganizmalar kendilerine karşı oluşabilecek tehditleri yok etmek için çeşitli toksik metabolitler üretirler. Bu metabolitler aynı zamanda sık sık terapötik ajan olarak da kullanılmaktadırlar. Penisilin [1] terapötik ajan olarak kullanılan ilk antibiyotiktir (Mori 2015).



[1]

1.1.1.Mikrobiyal Doğal Ürünler

Mikrobiyal doğal ürünler, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen biyoaktif bileşiklerin en zengin kaynaklarıdır. Organizmalar tarafından çeşitli mekanizmalarla sentezlenen bu ürünler ilaç geliştirme çalışmalarına önemli kaynak teşkil etmektedirler. Mikrobiyal fermentasyonla üretilenler veya bunların kimyasal modifikasyonları, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde, tarım ve çiftçilikte güncel olarak kullanılmaktadır. Penisilinin Fleming tarafından tesadüfen keşfedilmesi (1928) sağlık alanında yeni bir dönemi başlatmıştır. Bu dönem antibiyotik araştırmalarının altın çağı olarak da nitelendirilmiştir. Streptomisinin [2] Waksman (1943) tarafından keşfedilmesinden sonra birçok sağlık kuruluşunun yanı sıra araştırma laboratuvarlarının da doğal ürün araştırmalarına ilgisi artmaya başlamış ve özellikle mikroorganizmalar üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bunu takip eden dönemde klinikte kullanılmak üzere birçok antibiyotik sınıfı keşfedilmiştir. Çizelge 1.1'de aktinomisetler tarafından üretilen antibiyotiklerin keşfinin yıllara göre dağılımı görülmektedir. Klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğu ya doğal ürünlerdir ya da doğal ürünlerin yarı sentetik türevleridirler. Bunlardan azitromisin ya da klaritromisin, makrolid bir antibiyotik olan eritromisinin, doksisiklin tetrasiklinin, sefaleksin ise sefalosporin C'in bir türevidir. Yine bir makrolid antibiyotik olan tilosin ve onun yarı sentetik türevi tilmikosin hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılmaktadır. Vankomisin ve teikoplanin gibi doğal glikopeptit antibiyotikler Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır. Bir siklik peptit olan daptomisin ise Gram negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır. Tobramisin gibi aminoglikozitler de Gram negatiflere karşı etkili olan bir antibiyotiktir. Antibakteriyel antibiyotiklerin yanı sıra önemli antifungal doğal antibiotikler de mevcuttur. Birer poliyen makrolit olan amfoterisin B ve nistatin antifungal antibiyotiklerdir. Birçok doğal ürün ve türevleri antitümor olarak da kullanılmaktadır. Bunlara mitomisin C, bleomisin, aktinomisin daunorubisin ve romidepsin örnek olarak verilebilir (Katz ve Baltz 2016). Yukarıda bahsedildiği gibi mikroorganizmalar yapısal olarak birbirinden farklı biyoaktif metabolitlerin önemli üreticileridir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal doğal ürünlerin çoğu farmasötik endüstrisinde oldukça önemlidirler.



[2]

Çizelge 1.1. Farklı Aktinomisetler tarafından üretilen antibiyotiklerin yıllara göre sayısı (Subramani ve Aalbersberg 2013)

Cins	1974	1980	1984	1988	2005
Streptomyces	1934	2784	3477	4876	6550
Rare Actinomycetes	125	361	745	1276	2250
Micromonospora	41	129	269	398	740
Nocardia	45	74	107	262	357
Actinomadura	0	16	51	164	345
Actinoplanes	6	40	95	146	248
Streptoverticillium	19	41	64	138	258
Streptosporangium	7	20	26	39	79
Microbispora	4	6	6	10	54
Datcylosporangium	0	4	19	31	58
Saccharopolyspora	0	4	33	44	131
Actinosynnema	0	0	25	14	51
Streptoalloteichus	0	3	14	12	48
Actinomyces	0	14	17	-	-
Pseudonocardia	0	3	8	-	27
Micropolyspora	2	4	7	-	13
Thermomonospora	1	3	4	-	19
Kitasatosporia	0	0	0	11	37
Kibdelosporangium	0	0	0	7	34

1.2. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri

Aktinomisetler Gram pozitif bakteriler olup yüksek guanin ve sitozin oranına sahip olmalarıyla dikkat çekmektedirler. Kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan aktinomisetler katı ortamda çimlenmeye başlayan bir spor veya birden fazla hif üreterek büyümektedir. Büyüyen hifler dallanarak miselleri oluşturmaktadır. Kompleks bir misel

ağı ile sonuçlanan üstel büyüme, uç büyüme ve dallanma kombinasyonuyla elde edilir. Bu aşamada vejetatif hifler ara sıra çapraz duvarlar oluşturur. Daha sonra koloniler geliştikçe havaya dikilen hidrofobik misel ile nemli yüzeyden kopan hava miseli üretilir. Bu durum besin tükenmesi ve sonuçta mobilizasyon ihtiyacına cevap olarak başlatılan üreme evresinin başlangıcıdır. Aktinomisetlerin topraktaki sayı ve çeşitliliğini kontrol eden önemli faktörlerin, organik maddenin bolluğu ve niteliği, tuzluluk, bağıl nem içeriği, sıcaklık ve toprağın bitki örtüsünün olduğu öne sürülmektedir. Çoğu toprak aktinomisetleri pH 5.0 ile 9.0 aralığında ürerler. Bununla birlikte asidofilik aktinomisetler pH 3.5-6.5 aralığına sahip asidik topraklarda geniş yayılım göstermektedirler. Aktinomisetler genelde düşük nem içeriğine sahip topraklarda bulunmaktadır. Bu durum onların yarı kuru koşullardan büyük ölçüde etkilenmediklerini göstermektedir. Aktinomisetler organik maddece zengin topraklarda yaşarlar (Lee and Hwang 2002). Doğal polimerleri parçalama yeteneklerinden ötürü toprak ekolojisinde büyük bir öneme sahiptirler. Mezofilik ve termofilik aktinomisetler parçalayabilecekleri selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi bitki polimerlerinin bulunduğu bölgelerde oldukça aktiflerdir. Topraktaki diğer yararlı aktiviteleri ise fungal patojenlere karşı aktivitelerinin olmasından kaynaklanır. Kök çevresinde bulunan aktinomisetlerin gerek kalitatif gerekse kantitatif olarak önemli olduğu ve bitki köklerini patojenlerin istilasına karşı koruduğu bildirilmiştir (Crawford ve ark. 1993).

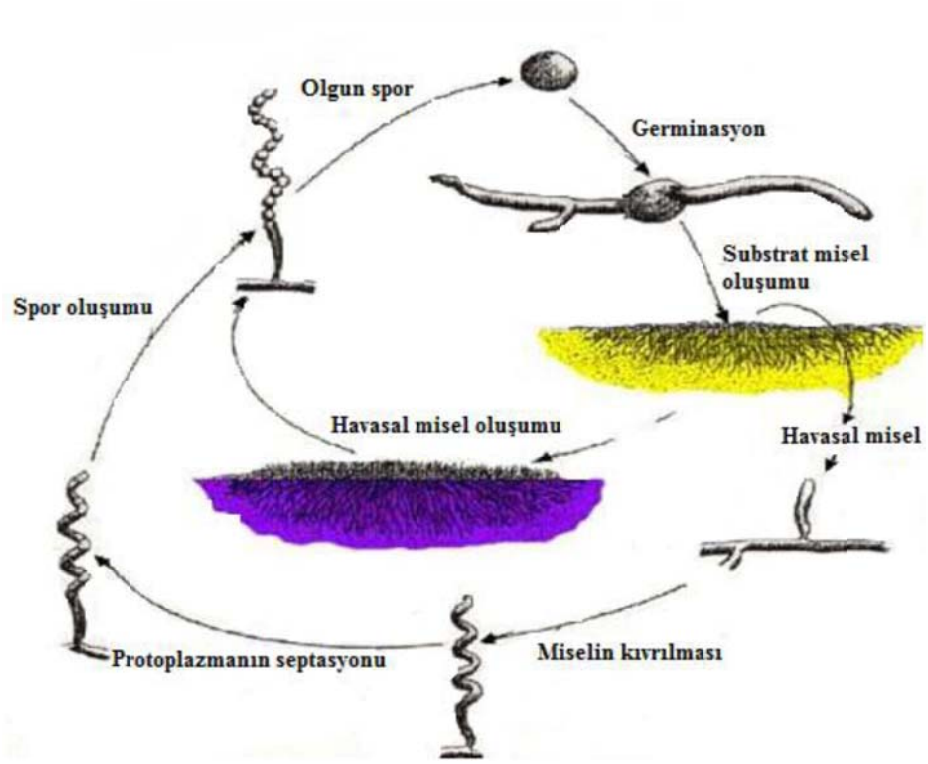
Aktinomisetler iyi doğal ürün üreticisi olarak bilindikleri için, ekonomik açıdan büyük bir öneme sahiptirler. Şimdiye kadar mikroorganizma kaynaklı yaklaşık 10000 antibiyotik keşfedilmiştir. Keşfedilen bu antibiyotiklerin yaklaşık 2/3'ü aktinomisetlerden izole edilmiştir (Anzai ve ark. 2008). Aktinomisetler farklı kimyasal sınıf ve biyolojik aktiviteye sahip bileşikleri üretme kapasitesine sahiptirler. Bunlar arasında antibiyotikler, antikanser bileşikler, antidiyabetikler, immünbaskılayıcılar, pigmentler, enzimler ve enzim inhibitörleri önemli yer tutmaktadır (Crevelin ve ark. 2014).

Aktinomisetler, Actinomycetales takımının bir üyesidir. Actinomycetales takımı 14 alt takım 49 aile ve 140'tan fazla cinse sahiptir. Bu alt takımlar; Actinomycineae, Actinopolysporineae, Catenulisporineae, Corynebacterineae, Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Kineosporineae, Micrococineae, Micromonosporineae,

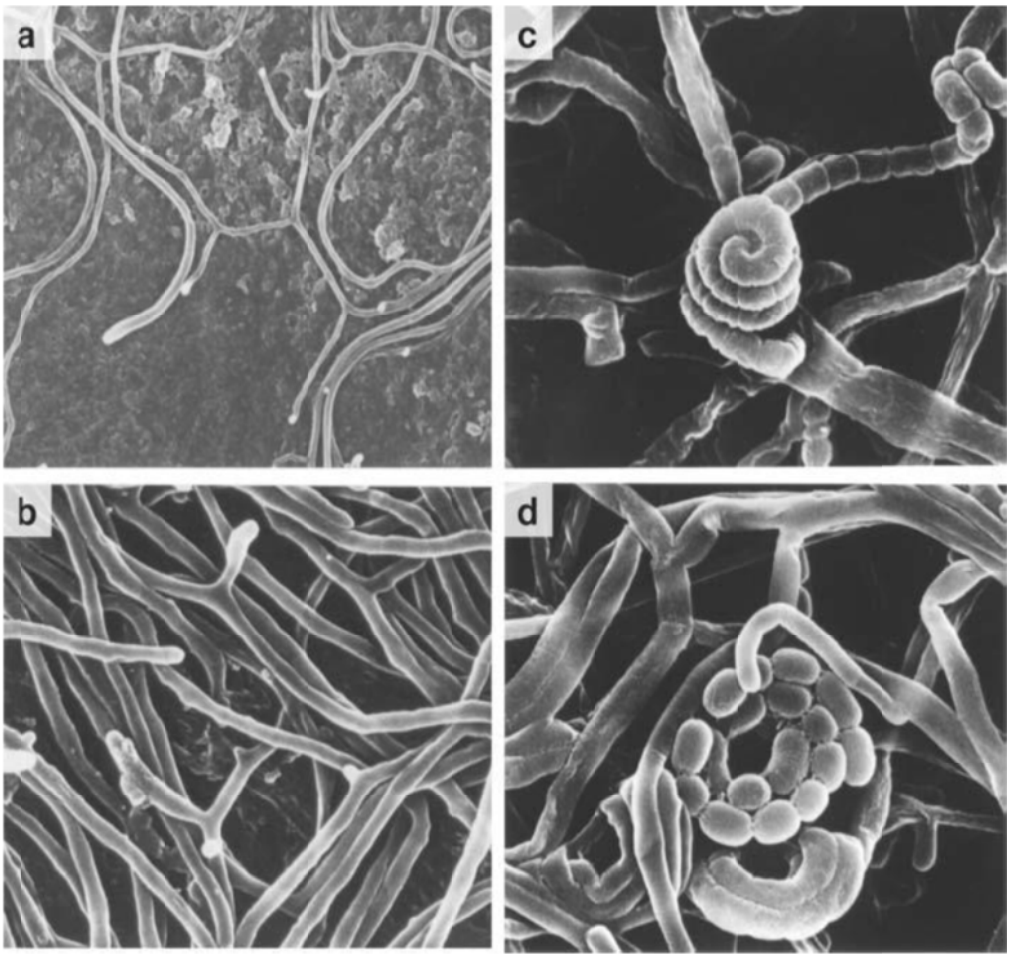
Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae ve Streptosporangineae'dir (Adegboye ve Babalola 2012).

1.2.1. *Streptomyces* Cinsinin Genel Özellikleri

Streptomyces'lar, Actinobacteria sınıfı içinde Actinomycetales ordusuna ait Gram pozitif ve aerobik bakterilerdir. Gelişimsel hayat döngülerinde kompleks morfolojik ve fizyolojik değişimler sergilerler. Şekil 1.1 ve şekil 1.2'de görüldüğü gibi uygun koşullar sağlandığında vejetatif olarak büyürler. Büyüme fazı boyunca dallanarak uzayan miseller besi ortamındaki substrata nüfuz ederek salgıladığı hidrolitik enzimlerle besinleri parçalar. Misellerin büyümesi ağırlıklı olarak sıkı dokunmuş hifler şeklinde meydana gelir (Desanti 2000). Kolonilerin büyümesiyle ise hava miselleri üretilmektedir. Hava misellerinin gelişiminden sonra spor zincirleri ve serbest sporlar oluşmaktadır (Anderson ve Wellington 2001).



Şekil 1.1. *Streptomyces* cinsine ait üyelerin hayat döngüsü (Acer 2011).



Şekil 1.2. *S.lividans'*a ait koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü A) Koloni etrafındaki vejetatif hücereler, B) Vejetatif misellerin hava misellerine dönüşmesi, C) Hava misellerinden septaların oluşumu, D) Olgun spor zincirlerinin oluşumu (Hopwood 2006).

Gram pozitif bakteriler olan streptomisetlerin DNA'ları % 68-70 oranında G+C içermektedir (Anderson ve Wellington 2001). Kromozomları doğrusal yapıda ve genomları yaklaşık 8-10 Mb büyüklüğündedir. Genler kromozomun merkezi ve uç bölgelerinde dağılım gösterirler. Bu genler hayat döngüsünün farklı fazları boyunca ifade edilirler. Merkezi bölge yaklaşık 6.5 Mb büyüklüğündedir. Buradaki genler; hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon gibi primer metabolizma sonucu oluşan olaylardan sorumludurlar. Buna karşın telomerik bölgelerde sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu gen veya gen kümeleri bulunmaktadır (Kallio 2008). Model olarak kullanılan *Streptomyces coelicolor'*un genomunda sekonder

metabolitlerden sorumlu 23 gen kümesi tespit edilmiştir. Bu gen kümelerinin toplam genomun %5'ine karşılık geldiği ifade edilmektedir (Weber ve ark. 2003).

Genellikle toprakta geniş dağılım gösteren *Streptomyces*'lar su ve diğer doğal çevrelerde de yaşayabilmektedir. Toprak bakterilerinin % 40'ını *Streptomyces*'lar oluştururlar. Topraktaki ve sudaki dağılımları daha çok besin stresi, sıcaklık, pH, nem, tuzluluk, toprak özelliği ve iklime bağlıdır (Hasani ve ark. 2014).

Streptomyces'lar olağanüstü çeşitlilikte medikal ve tarımsal amaçla kullanılabilecek bileşikleri üretme yetenekleriyle tanınırlar (Jones ve Eliot 2011). Yapılan bir araştırmada şimdiye kadar mikroorganizmalar tarafından 23000 biyoaktif sekonder metabolit üretilmiştir. Bu metabolitlerden 10000 tanesi aktinomisetlerden elde edilmiştir. Aktinomisetler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin 7600'ü ise *Streptomyces* cinsi tarafından üretilmektedir (Sharma ve ark. 2014). Ürettikleri çeşitli sekonder metabolitler özellikle insan sağlığı için antimikrobiyal, antitümör veya immün baskılayıcı ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar (Çizelge 1.2). *Streptomyces*'ler tarafından üretilen farklı sekonder metabolitler diğer toprak organizmalarını öldürmek için kimyasal silah olarak kullanılmalarının yanı sıra, aynı zamanda iletişim için sinyal molekül olarak işlev görmektedirler. Bu bakteriler doğada bağımsız koloniler oluşturduğu gibi bitki ve omurgasız gibi organizmalarla da simbiyotik bir ilişki kurabilmektedirler. *Streptomyces*'lar diğer çoğu antibiyotik üreticisi mikroorganizma gibi ürettikleri antibiyotiklere karşı kendilerini koruyan bir direnç mekanizmasına da sahiptirler. *Steptomyces*'lar aynı zamanda nitrik okside (NO) karşı da direnç gösterirler. Doğal bir antibakteriyel olan nitrik oksidin, istilacı mikroorganizmaları öldürmek için insan bağışıklık sistemi tarafından da üretildiği iddia edilmektedir (Seipke ve ark. 2012).

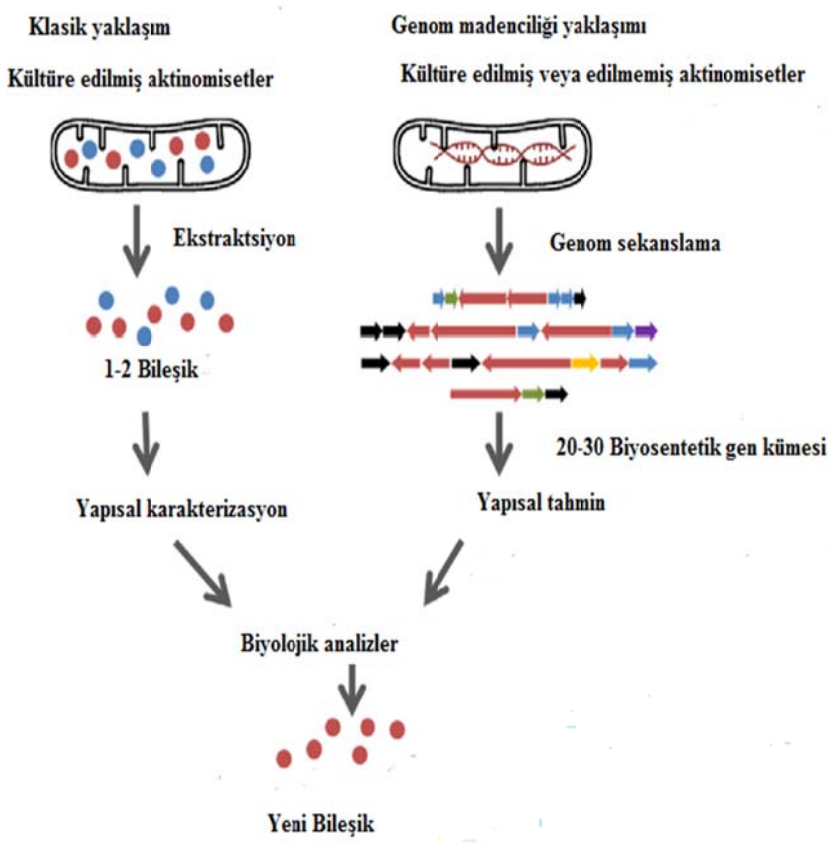
Çizelge 1.2. *Streptomyces* cinsi tarafından üretilen bazı doğal ürünler (Hasani ve ark. 2014).

Organizma	**Doğal ürün**	**Organizma**	**Doğal ürün**
S. orchidaccus	Sikloserin	*S.erythraeus*	Eritromisin
S.oriantalis	Vankomisin	*S.vensuella*	Kloramfenikol
S.fradiae	Neomisin, Aktinomisin, Fosfomisin, Dekamisin	*S.aureofaciens*	Klortetrasiklin, Dimetilklor, Tetrasiklin
S.nodosus	Amfoterisin B	*S.ambofaciens*	Spiramisin
S.noursei	Nistatin	*S.avermitilis*	Avermisin
S.mediterranei	Rifampin	*S.alboniger*	Puromisin
S.griseus	Streptomisin	*S.niveus*	Novobisin
S.knanamyceticus	Kanamisin	*S.platensis*	Platenmisin
S.tenebrarius	Tobramisin	*S.roseosporus*	Daptomisin
S.spectabilis	Spektinomisin	*S.ribosidificus*	Ribostamisin
S.viridifaciens	Tetrasiklin	*S.garyphalus*	sikloserin
S.lincolensis	Linkomisin, Klindamisin	*S.vinaceus*	Viomisin
S.rimosus	Oksitetrasiklin	*S.clavuligerus*	Sefalosporin

1.3. Doğal Ürün Tarama Yöntemleri

Doğal ürünler, geniş yelpazede kimyasal çeşitlilik ve biyolojik aktiviteye sahip yeni ilaç ya da ilaç öncüsü bileşikler için verimli bir kaynak oluşturmaktadırlar. Doğal ürünlerin altın çağı olarak bilinen 1950-1960 yılları arasında geleneksel metotlar kullanılarak doğal ürün araştırmaları yapılmaktaydı. Geleneksel metotlar kullanılarak, genellikle, mikrobiyal özütlerin kimyasal olarak taranmasıyla yeni bileşikler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemle pek çok bileşik keşfedilmiş olmakla beraber, zamanla daha önce keşfedilmiş bileşiklerin tekrar bulunma olasılığı artmıştır. Bu da doğal ürün çalışmalarının sekteye uğratılmasına sebep olmuştur. Bu durumun aşılması için her geçen gün yeni tarama stratejileri ortaya çıkmaktadır. DNA dizileme teknolojisi ve biyoinformatik yaklaşımlar sayesinde, araştırmacılar, mikroorganizmaların biyosentetik kapasitelerinin farkına varmış oldular. Dolayısıyla, yeni doğal ürünleri keşfetme stratejileri içerisinde klasik kültür koşullarında ifade edilmeyen ve sessiz olarak nitelendirilen biyosentetik gen kümelerini biyoinformatik araçlar kullanarak tanımlamaya başladılar (Ren ve ark. 2017). Doğal ürünlerin, biyosentez, regülasyon ve/veya direncinden sorumlu olan genler mikrobiyal genomlarda biyosentetik gen kümeleri şeklinde organize olmuşlardır. Bu gen kümeleri yeni ilaçların keşfi için hazine değerindedir (Li ve ark. 2017).

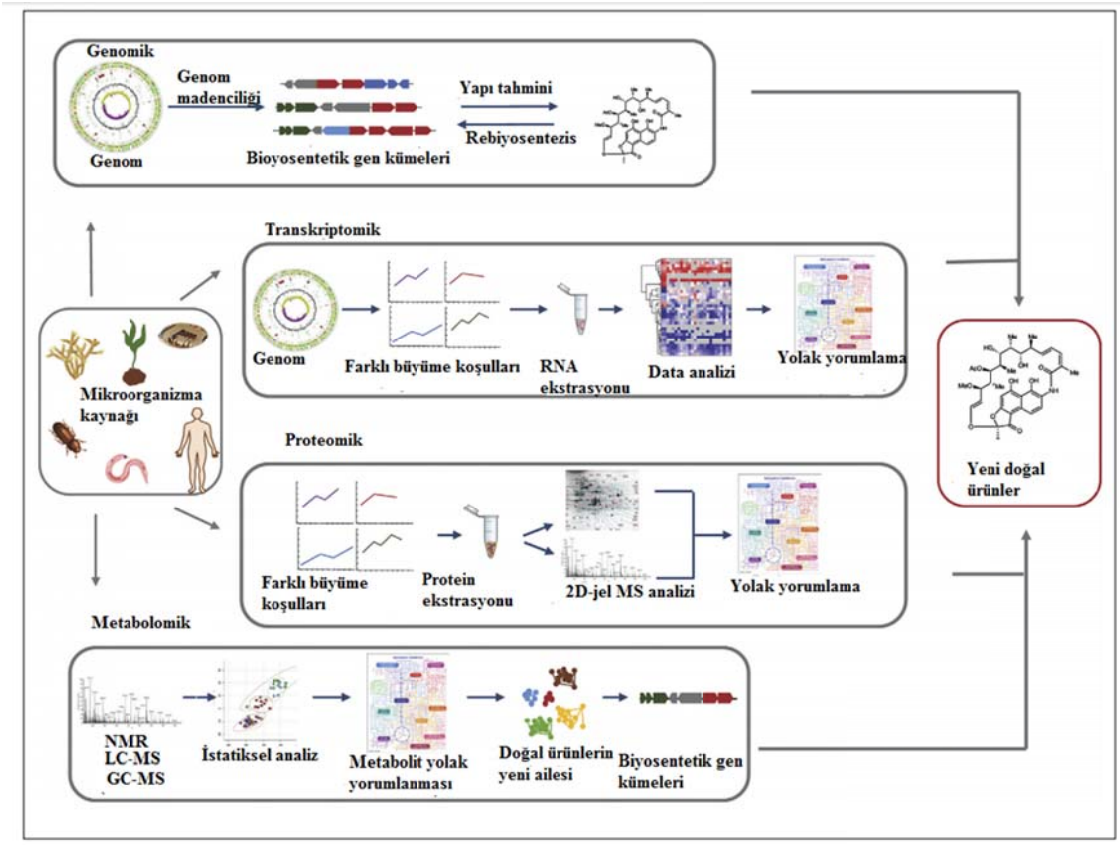
Doğal ürünler farmasötik endüstrisinde kullanılan ilaçların önemli kaynaklarından biridir. Doğal ürün araştırmalarında bu kaynaklardan yararlanmak için çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Luo ve ark. 2014 doğal ürün keşfi için uygulanan yaklaşımları yukarıdan aşağıya doğru ve aşağıdan yukarıya doğru uygulanan yaklaşımlar olmak üzere iki şekilde sınıflandırmışlar. Yukarıdan aşağıya doğru uygulanan yaklaşımın benimsenmesiyle yapılan doğal ürün araştırmalarında herhangi bir genom dizisine ya da genetik manipülasyona ihtiyaç duyulmamakla birlikte, farklı habitatlardan mikroorganizmaların izole edilmesi ve laboratuvarda çeşitli kültür yöntemlerinin kullanılması benimsenmektedir. Bu alanda daha önce yeni biyoaktif moleküllerin araştırılmasında kullanılan yaklaşımlar potansiyel üreticilerin ekstraktlarının bileşik temelli ya da biyoaktivite temelli taranmasına dayanıyordu. Bununla birlikte, biyoaktivite temelli yaklaşım gibi yöntemlerle yeni biyoaktif bileşiklerin keşfedilmesinde zamanla azalmalar olmuştur. Çünkü daha önce bilinen bileşiklerin yeniden izolasyonu bu alandaki çalışmaların sekteye uğratılmasına sebep olmuştur (Aigle ve ark. 2013). Geleneksel yukarıdan aşağıya yaklaşımları birçok biyoaktif doğal ürünün tanımlanmasında başarılı iken, yeni yaklaşımlarla anlaşılmıştır ki mikroorganizmaların mevcut biyosentetik potansiyel ve metabolik kapasitelerini tam olarak ortaya çıkaramamaktadır. Bu durum genom madenciliği (genome mining) gibi yeni yaklaşımlarla aşılmaya çalışılmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Doğal ürün araştırmalarında kullanılan iki yaklaşımın karşılaştırılması (Choi ve ark. 2015).

'Omik' teknolojileri, bir organizmayı oluşturan bütün moleküller arasındaki ilişkiyi anlamamıza yardımcı olduğu gibi bu molekülleri nitelik ve nicelik olarak analiz etmeye olanak sağlamaktadır (Şekil 1.4). Son yıllarda hızla gelişen omik teknolojileri- genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik- binlerce genin, proteinin ve metabolitin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. 'Omik' teknolojisi şimdilerde toksikoloji, çevresel sağlık, biyobelirteç keşfi, kanser tanısı ve gıda güvenirliği gibi birçok biyolojik alanda önemli bir role sahiptir. Genomik, genlerin geniş kapsamlı çalışılmasına ve bunların birbirleriyle nasıl bir etkileşimde bulunduğuna odaklanmaktadır. Bu teknoloji insan genom projesinin yapılmasına olanak sağlamıştır. Transkriptomik, kısaca mRNA'nın çalışılmasını ifade etmektedir. Bu moleküllerin tanımlanması ve nicelleştirilmesi gen ekspresyonunun daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Proteomik, bir organizmadaki mevcut proteinlerin geniş kapsamlı bir şekilde çalışılmasına olanak sağlamaktadır (Gloaguen 2017). Metabolomik ise 'omik'

teknolojilerinin en günceli olarak biyolojik sistemlerde bulunan bütün küçük moleküler bileşikler olan metabolitlerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesiyle ilgilenmektedir.



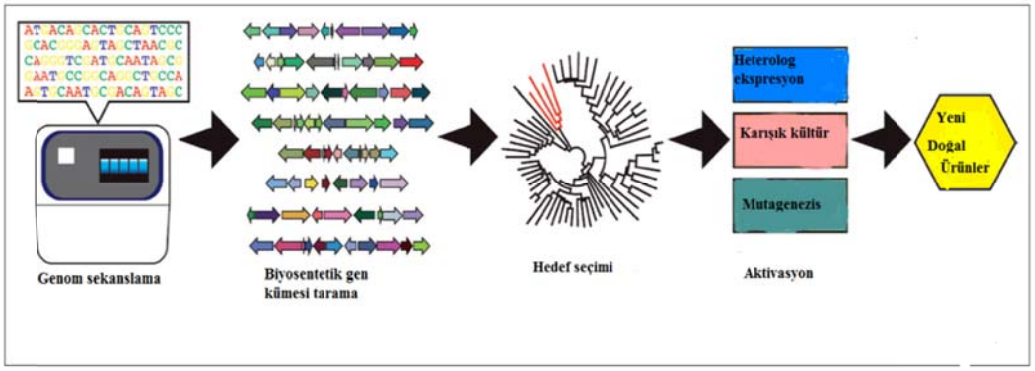
Şekil 1.4. Doğal ürün keşfinde 'omik' teknolojileri (Palazzotto ve Weber 2018).

1.3.1. Doğal Ürün Tarama Stratejilerinde Genomik Yaklaşımlar

Son yirmi yılda genomik çağın ortaya çıkmasıyla mikrobiyal doğal ürünlerden yola çıkılarak yapılan ilaç keşfinde yeni bir artış ortaya çıkmıştır. Genomik temelli yaklaşımlar, daha önce standart fermentasyon koşulları altında keşfedilemeyen yeni doğal ürünlerin açığa çıkarılması için geliştirilmektedir. Bu stratejiler; doğal gen kümelerini tanımlamak veya yeni konaklarda aktive etmek için güçlü işlevsel genomik ve biyoinformatik araçlarını geliştirmektedirler (Şekil 1.5). Şimdiye kadar sekanslanan mikrobiyal genomlar, doğal ürünlerin biyosentezinden sorumlu birçok biyosentetik gen kümesinin ifade edilmediği için ürününün hala bilinmediğini ortaya çıkarmıştır. Bu kümeler kriptik gen kümeleri olarak ifade edilmektedir. Kriptik gen kümeleri birçok faydalı bileşiğin hazinesi konumdadır. Bu hazineye ulaşmak için araştırmacıların geliştirdikleri yöntemlerle yeni doğal ürünleri keşfetmek ve bunların biyosentez

yolaklarını belirlemek olası hale gelmektedir. Yeni genomların keşfedilmesi neticesinde çoğu mikroorganizmanın şimdiye kadar üretmiş olduğu doğal ürünlerden daha fazlasını üretme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır. Zira bu mikroorganizmalar standart laboratuvar koşullarında kültüre edildiklerinde doğal ürünleri sentezleyen biyosentetik gen kümeleri ya aktifleşememekte veyahut çok düşük seviyelerde ifade olabilmektedirler. Kriptik gen veya gen kümeleri aktifleşmek için kimyasal ya da çevresel uyarıcılara ihtiyaç duymaktadır (Chiang ve ark. 2011).

Mikrobiyal genomlarla ilgili çalışmalar yüksek organizmaların anlaşılması için önemli başlangıç noktaları oluşturmaktadır. Mikrobiyal genomların analizi tek protein veya gen filogenilerinin ötesinde mikrobiyal evrim ve çeşitlilik hakkında bilgi sağlar. Pratikte de tüm mikrobiyal genomların analizi, biyoteknolojideki yeni uygulamaların ve patojenik organizmaların tedavisine ve kontrolüne dair yeni yaklaşımların belirlenmesinde güçlü bir araçtır. Hızlı ve pahalı olmayan yeni nesil DNA dizileme teknolojisi sayesinde birçok organizmanın genomu dizilenmiştir. Dizilenen bu genomlar sonucunda yeni doğal ürünlerin keşfedilmesi, genom madenciliği vasıtasıyla ise bunların biyosentetik yolaklarına ulaşılması hedeflenmektedir. Genom madenciliği bir organizmanın genomunda bulunan gen kümesinin metabolik ürününe erişmek için biyoinformatik, moleküler genetik ve doğal ürün analitik kimyasının kullanılmasıdır (Escribano ve Bibb 2014). Yeni nesil genom dizileme tekniklerinin geliştirilmesi doğal ürün araştırmalarına yeniden ivme kazandırmıştır. Gerek maliyetinin düşürülmesi gerek kısa sürede gerçekleşmesi birçok mikroorganizma genomunun sekanslamasına olanak sağlamıştır. Genom sekansları tamamlanan mikroorganizmaların genom analizleri organizmaların sanıldığından daha fazla biyoaktif doğal ürün sentezleme kapasitesine sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır. Bu sayede birçok doğal ürün keşfedilerek aynı zamanda mevcut potansiyelleri artırılmıştır (Wu ve ark. 2017).



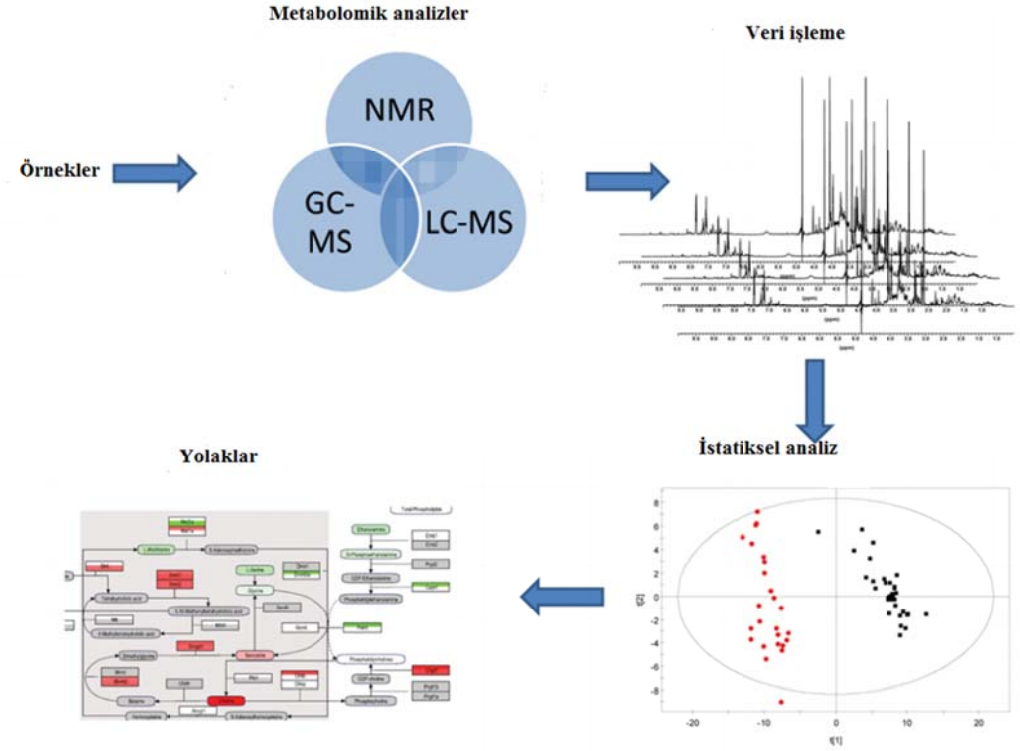
Şekil 1.5. Genom madenciliğinin şematik sunumu (Choi ve ark. 2018)

1.3.2. Doğal Ürün Tarama Stratejilerinde Metabolomik Yaklaşımlar

Metabolitler hayatın en önemli bileşenlerindendir. Hücresel ve fizyolojik enerji, yapı ve iletişime katkılarından dolayı biyolojide önemli bir role sahiptirler. Metabolitler organizmaların yaşamsal faaliyetlerini de dizayn ederler. Bu tip metabolitler sekonder metabolit olarak adlandırılırlar. Primer metabolitler temel metabolizma ve enerji depolamada rol alırken, sekonder metabolitler hücreler arası iletişim, diğer organizmalara karşı antibiyotik aktivitesi gösterme ve oksidatif stresi düşürme gibi faaliyetlerde rol almaktadır. Metabolitleri tanımlama ve onların fonksiyonlarını araştırmak için birçok metot bulunmaktadır. Bunlardan geleneksel metotlar metabolit analizinde çok fazla zaman, enerji ve maliyete ihtiyaç duyduğu gibi bu metabolitlerin genlerle, proteinlerle ve diğer metabolitlerle olan bağlantısını doğrudan verememektedir (Vinayavekhin 2012).

Metabolomik, 'omik' teknolojilerinin nispeten yeni bir üyesidir. Metabolomik daha çok biyolojik bir sistemde bulunan bütün küçük moleküler bileşiklerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesiyle ilgilenmektedir. Yeni bir teknoloji olmasına rağmen gün geçtikçe kapsam alanı genişlemektedir. Metabolomikteki bu gelişme nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrometresi (MS) gibi tekniklerin kullanılmasıyla daha da artmaktadır. Bunların yanı sıra mevcut verilerin bilgisayar ortamında çeşitli biyoinformatik programlarla işlenmesi bu alana yeni bir ivme kazandırmaktadır. Metabolomik klinik kimya, ilaç toksisite taraması ve besinsel araştırmalar gibi birçok alanda önemli bir araştırma yaklaşımı olarak ön plana çıkmaktadır (Xia 2011).

Metabolomik çalışmaları; çalışma dizaynı, örnek toplama ve depolama, örnek hazırlanması ve analizi, veri işlenmesi ve analizi son olarak biyokimyasal yolak analizi ve yorumlanması gibi kısımlardan oluşmaktadır (Şekil 1.6). Genel olarak metabolomik deneyleri hedefe odaklı analizler ve herhangi bir hedefe odaklanmayan analizler olmak üzere ikiye ayrılır. Hedefe odaklı metabolomik, ilgili metabolik yolaklarda kesin miktar tayini yapılmış metabolitleri içerirken herhangi bir hedefe odaklanmayan metabolomik ön yargısız bir şekilde birçok metabolitin ölçümünde kullanılan bir yaklaşımdır (Ni 2014). Genel olarak kütle spektrometre (MS) temelli metabolomik yeni metabolitlerin tanımlanmasında daha kullanışlıdır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) temelli metabolomik ise genellikle diagnostik ya da toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Arita 2009).



Şekil 1.6. Metabolomik bir çalışmanın iş akışına genel bakış (Brennan 2013).

1.3.3. Kütle Spektrometresi Temelli Genom Tarama Yöntemi

Kütle spektrometresi, bir molekülün yapısında bulunan parçacıkların spektrumunu oluşturur. Kütle spektrometresinin çalışma prensibi iyonize bileşiklerin kütle/yük oranlarına göre ayrı ayrı tespit edilip gruplandırılmasına dayandırılmaktadır.

Bir kütle spektrometre cihazı; iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri sistemi olmak üzere dört bölümden oluşur. Kütle spektrometresinde birkaç çeşit iyonizasyon metodu mevcuttur. Bunlardan en önemlileri elektron iyonizasyonu (EI), elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve matriks ilişkili lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI)'dur. Cihazın ilk kısmında yer alan iyon kaynağında bileşiklerin iyonizasyonu gerçekleştirilmektedir. Farklı özellikteki iyonlar analizör kısmında ayrıştırılmaktadır. Time of flight (TOF) ve quadrupol (Q) gibi farklı analizör tipine sahip MS cihazlarının yanı sıra iki farklı analizörün birlikte bulunduğu hibrit MS sistemlerinin kullanıldığı cihazlar da mevcuttur. Son olarak ayrışan iyonlar dedektör vasıtasıyla sayılarak veriler sisteme aktarılmaktadır.

Kütle spektrometresi doğal ürün araştırmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem belli bir ekstrakt içindeki metabolitlerin tespit edilmesinde çok hassas olduğu gibi metabolitin kimyasal yapısı hakkında da fazlaca bilgi vermektedir. Kütle spektrometresi diğer tekniklerle de kombinasyon oluşturabilmektedir. Sıvı kromatografi- kütle spektrometresi (Liquid chromatography-mass spectrometry- LC-MS) iki seçici teknikten oluşan bir kombinasyondur. Bununla birlikte son yıllarda doğal ürün araştırmalarında sıkça kullanılan nükleer manyetik rezonans (MS/NMR), gaz kromatografisi (Gas chromatography-GC/MS) gibi analitik yöntemler ile kombine olma özelliğine sahiptir. Tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ise en az iki aşamada kütle analizini gerçekleştiren genel bir yaklaşımdır.

MS sahip olduğu özellikler ile geniş kapsamlı bir skalayı baz alarak analiz yapabildiği için doğal ürün araştırmacıları için cazip bir yöntemdir. Hassas olduğu gibi sonuca da daha hızlı ulaşılır. Bununla birlikte diğer biyoinformatik araçlarla kombine olma özelliğine sahiptir (Demirov ve ark. 2008). Kütle spektrometresinin diğer bir güçlü yanı çok az numuneye gereksinim duymasıdır. Doğal ürünlerin biyosentetik mekanizmalarının anlaşılması ilerledikçe, MS verilerini genomik bilgilerin biyosentetik mekanizmasına bağlamak mümkün hale gelmektedir. Genetik analiz ve MS verisinin kombinasyonu molekülün yapısı hakkında önemli detayları ortaya çıkarabilir. Kütle spektrometresini kullanarak doğal ürünleri karakterize etmek önemli ve cazip bir araştırma alanı olmaktadır (Bouslimani ve ark. 2014).

Tarım ve sağlık alanında kullanılan birçok antibiyotik ve insektisit mikroorganizmalar tarafından üretilen glikozile doğal ürünlerden meydana geldiği için, bu önemli ürünlerin keşfi için bazı yeni yöntemler geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden biri de glikogenomiktir. Bu yöntem ile glikozillenmiş doğal ürünlerin MS verilerinden yola çıkarak tahmini glikolizasyon fragmentleri ile mikrobiyal genomlarındaki glikolizasyon genleri arasında bir ilişki kurulmaktadır. Böylece MS/MS analizleriyle elde edilen kimyasal verinin genetik veriyle birleştirilmesiyle sonuca daha hızlı bir şekilde ulaşılması hedeflenmektedir (Kersten ve ark. 2013).

Peptidogenomik yaklaşımının amacı ise ribozomal ve ribozomal olmayan peptidil doğal ürünleri daha hızlı karakterize etmek ve genomu sekanslanan organizmalardan bu doğal ürünlerin biyosentezinden sorumlu biyosentetik gen kümelerine ulaşmaktır. MS/MS analizleri sonucu parçalanan peptitlerin yapısında bulunan her bir aminoasite ait spesifik kütle kayma değerleri bulunmaktadır. Bu kütle kayma değerlerinden yola çıkarak peptitlerin yapısındaki aminoasitler belirlenmektedir. Biyoinformatik programlar kullanılarak MS/MS spektrumlarından elde edilen kütle kayma değerlerinin ait olduğu aminoasitlerin yapıya eklenmesini sağlayan genlerin bulunduğu gen kümesine erişilebilmektedir (Kersten ve ark. 2011).

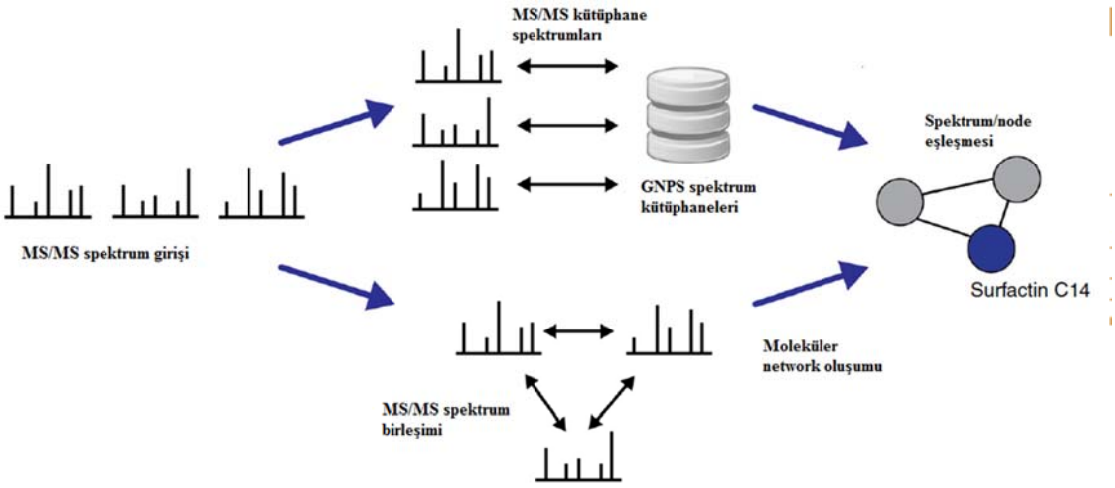
1.3.4. Network Analizi

'Moleküler networking', ikili kütle spektrometrisine (MS/MS) dayalı bir yaklaşımdır. Bu yöntemle yeni bir bileşik keşfedilebileceği gibi daha önce bilinen bileşiklerin tespiti de kolay olmaktadır. Daha da fazlası, MS/MS temelli moleküler networking, bilinen bileşiklerin analoglarının tespitinde de önemli bir role sahiptir (Bertin ve ark. 2014).

Moleküler networking, yapısal olarak benzer moleküllerin benzer MS/MS spektrumları oluşturmasından yola çıkarak bunları gruplamakta, organize etmekte ve sonuç olarak MS analizlerine ait kimyasal verilere görsel bir alan kazandırmaktadır. Bu amaç için çeşitli veri tabanları kullanılmaktadır. GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) yoğun olarak kullanılan veri tabanlarından biridir (www.gnps.ucsd.edu). Bu veri tabanı, doğal ürün araştırmalarında dereplikasyon analizleri için kullanıldığı gibi yeni bileşiklerin tespitinde de önemli bir role sahiptir.

GNPS, moleküler networking oluşturulmasında spektrumların herhangi bir bilinen bileşik ile eşleşmediği durumlarda bile, ilgili moleküllerden spektrum setlerini tespit edebilen bir spektral korelasyon ve görselleştirme yaklaşımı için kullanılabilir. Şu anda herkesin faydalanacağı şekilde moleküler networking sağlayan alt yapının sadece GNPS olduğu iddia edilmektedir. GNPS'deki moleküler networking'in görselleştirilmesi, her spektrumun bir düğüm (node) ve spektrum-spektrum hizalamalarını düğümler arasındaki kenarlar (edge) olarak gösterir.

Şekil 1.7'de görüldüğü gibi MS/MS analizi sonucu oluşan benzer spektrumlar network içinde birlikte gruplandırılmaktadır. Bu gruplandırma MS/MS spektrumlarının vermiş olduğu piklerin vektörel büyüklüğüne (cosine değeri) bağlı olarak program tarafından hesaplanmaktadır.



Şekil 1.7. Moleküler network analizi (Wang ve ark. 2016).

1.4. Yeni Nesil DNA Dizilimi

Son yıllarda geliştirilen DNA dizileme teknikleriyle birçok organizma DNA'sının son derece hızlı ve yüksek doğrulukta dizilimi mümkün hale gelmiştir. 2000'li yılların sonlarından bu yana yüksek ve doğru okuma kapasitesine sahip ve aynı zamanda düşük maliyetli yeni DNA dizileme teknolojileri piyasaya sürülmektedir. Bu teknolojiler için yeni nesil dizileme (NGS) terimi kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilmiş olan yeni nesil DNA dizileme sistemlerine, PacBio (Pacific Biosciences), İllumina ve İon Torrent (Thermo Fisher) örnek olarak verilebilir (Liu ve ark. 2012, Shendure ve Ji 2008).

Bu teknikler özellikle doğal ürün araştırmalarında çığır açıcı niteliktedirler. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisinin gelişmesiyle doğal ürün araştırmalarında yapılan DNA dizilemelerinin hem maliyeti düşmüş hem de kısa sürede tamamlanma olanağı sağlanmıştır (Cacho ve ark. 2015). 1990'lı yılların sonlarında *S. coelicolor* genomunun sekanslanmasıyla aktinomisetlerin doğal ürün üretme potansiyellerinin laboratuvar koşullarında ürettiklerinden çok daha fazla olduğu ortaya çıktı. Genom madenciliği tekniklerinin kullanılmasıyla organizmaların genomlarında bulunan biyosentetik potansiyellerinin tam olarak ortaya çıkarılabileceği anlaşılmıştır. Son dönemlerde geliştirilen antiSMASH (antibiotics and secondary metabolite analysis shell) ve benzeri biyoinformatik programlarım kullanılması genom madenciliği ile doğal ürünlerin biyosentetik yolaklarının açığa çıkarılması açısından büyük bir önem arz etmektedir (Escribano ve ark. 2016).

KAYNAK ÖZETLERİ

Karasal mikroorginazmalar biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin önemli kaynaklarındandır (Donadio ve ark. 2002). Karasal mikroorganizmalar içerisinde de aktinomisetler biyoaktif sekonder metabolitlerin en önemli üreticilerinden olup, ürettikleri metabolitler ilaç keşfi çalışmaları için önemli kaynaklardır (Weber ve ark. 2003). Mikrobiyal sekonder bileşikler içerisinde, antibiyotikler, en büyük paya sahiptir. Yapılan araştırmalara göre izole edilen doğal antibiyotiklerin üçte ikisi aktinomisetlerin üretmiş olduğu sekonder metabolitlerden elde edilmiştir. Aktinomisetlerden elde edilen doğal antibiyotiklerin %75'i ise *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından üretilmektedir (Boudjella ve ark. 2007). Son yıllarda tarım ve tıp alanında kullanılan antibiyotiklerin çoğu *Streptomyces*'lardan elde edilmiştir. Antikanser bileşikler olan Moromycin A ve B (Abdelfattah ve ark. 2008), Antimycin A (Shiomi ve ark. 2005) ve frigocyclinone (Bruntner ve ark. 2005) aktinomisetlerden elde edilen önemli bileşiklerdendir.

Doğal ürün araştırmalarında önemli sorunlardan biri izolasyonu yapılan bir bileşiğin tekrar bulunması durumudur. Bu durum doğal ürün araştırmalarında bir tıkanıklığa sebep olmuştur. Araştırmacılar bu tıkanıklığı aşmak için çeşitli yöntemler geliştirmeye çalışmaktadır. Bu yöntemlerden biri organizmalardan elde edilen ekstraktların LC-MS/MS fragmentlerinin doğal ürün veri tabanlarında analiz edilmesidir. Bu yöntem kullanılarak 146 *Salinospora* ve *Streptomyces* türüne ait fragmentler incelenip 15 farklı doğal ürün ailesi ve onların analoglarının tespit edildiği bildirilmiştir (Crüsemann ve ark. 2016).

Doğal ürün araştırmalarında hem deriplikasyon olayının üstesinden gelmek hem de çalışmaların daha hızlı sonuçlanması için moleküler MS/MS networking yaklaşımın kullanılabileceği bildirilmiştir (Yang ve ark. 2013). Doğal ürün araştırmalarında MS kullanılarak elde edilen veriler gün geçtikçe artmaktadır. Bu verilerin otomatik olmayan bir şekilde analiz edilmesi için çok fazla zamana ihtiyaç vardır. Dahası mevcut araçlarla bu verilerin değerlendirilerek istenilen düzeyde verim elde edilmesi neredeyse olanaksızdır. Bunun için yeni ve hızlı teknolojik araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alandaki boşluğu doldurabilecek veri tabanlarından birinin de GNPS olduğu belirtilmektedir. GNPS veri tabanını kullanılarak oluşturulan moleküler networking yaklaşımı ile MS'den elde edilen veriler daha iyi organize edilerek hem yeni doğal ürün

keşfinde hem de bilinen bileşiklerin ve analoglarının tespitinde büyük kolaylıklar sağladığı iddia edilmektedir (Wang ve ark. 2016).

Bir siklik dipeptit olan FR00359 bileşiğinin tıbbi amaçlı kullanılan *Ardisia crenata* bitkisinden elde edildiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada GNPS'in uygulanmasıyla FR'nin diğer üreticilerinin de keşfedilebileceği iddia edilmiştir. Bununla birlikte FR'in doğadaki dağılımının bilinenden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Moleküler network'a dayalı yapılan bu çalışmada FR'in bilinen iki analoğunun tekrar tespit edilmesiyle birlikte iki yeni analoğu da keşfedilmiştir (Reher ve ark 2018).

Son birkaç yıldan beri MS ve genomik orijinli verilerin yeni biyoaktif doğal ürünlerin keşfi için analiz edildiği biyoinformatik programlarının sayısında artış gözlenmektedir. Bu amaç için geliştirilen 'NRPquest' mikroorganizmaların genom dizilimi ve organik ekstraktlarından elde edilen MS/MS network verisinin birlikte analiz edilmesiyle siklik peptidlerin hızlı bir şekilde tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Genom dizilimi bilinen *S. roseosporous* ve *B. subtilis*'in 'NRPquest' analizleri sonucunda daptomycin, arylomycin, plipastin, surfactin gibi siklik peptidleri açığa çıkarılmıştır (Mohimani ve ark. 2014).

Genom sekans analizleri ile birlikte doğal ürün üreticilerinden özellikle bakterilerin doğal ürün üretme potansiyelleri daha iyi anlaşılmıştır. Ortaya çıkan bu potansiyelden maksimum derecede faydalanmak için kullanılan yeni yöntemlerden moleküler networking ile birden fazla organizmayı aynı anda kullanarak bunların üretmiş olduğu sekonder metabolitlerin kolayca tanımlanabileceği ifade edilmektedir. Yapılan bir çalışmada 35 *Salinospora* izolatı kullanılarak bunların üretmiş olduğu sekonder metabolitler ile bu metabolitlerin sentezinden sorumlu biyosentetik gen kümeleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Moleküler networking ve genom madenciliğinin birlikte kullanıldığı bu çalışmada retimycin A bileşiğinin karekterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Duncan ve ark. 2015).

Mikrobiyal genom madenciliği doğal ürün araştırmalarında yeni sekonder metabolitlerin keşfi için oldukça hızlı gelişen bir yaklaşımdır. Aktinomiset genomlarının sekanslanmasıyla birlikte doğal ürünlerin biyosentezinden sorumlu bazı genlerin normal laboratuvar koşullarında ifade edilmediği ortaya çıkmıştır. Genom

sekansı yapılan *Streptomyces chattanoogensis'*in sessiz bir angusiklin biyosentetik gen kümesine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu gen kümesinin aktive edilmesiyle iki yeni antibiyotik olan chattamycin A ve B'nin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Zhou ve ark. 2015).

Termotolerant bir bakteri olan *Streptomyces cyaneogriseus ssp. noncyanogenus*, ticari olarak önemli bir antibiyotik olan nemadectinin üreticisi olarak bilinir. Yapılan bir çalışmada *Streptomyces cyaneogriseus ssp. noncyanogenus'*un genomu sekanslanarak hem nemadectinin biyosentezinin anlaşılmasına katkı sağladığı hem de onun biyosentetik olarak potansiyelinin anlaşılmasını sağladığı rapor edilmiştir (Wang ve ark. 2015).

Mikrobiyal sekonder metabolitler yıllardır antibiyotik kaynağı olarak bilinirler. Mikrobiyal kültür şartlarının değiştirilmesi çeşitli biyoaktif sekonder metabolitin üretimini tetikleyebilir. Yapılan bir çalışmada farklı kültür ortamlarının uygulanmasıyla LC/MS kullanılarak bir *Streptomyces* türünün sentezlemiş olduğu sekonder metabolitlerden hormaomycins B ve C bileşikleri izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin çeşitli patojenik Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Bae ve ark. 2015).

Doğal ürün araştırmalarında yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için değişik yöntemlerin kullanılması ilgi çekici ve zaman, enerji ve ekonomik olarak daha avantajlı olabilir. Ultra performans sıvı kromatografi-kütle spektrometri (UPLC-MS) tekniği kullanılan bir çalışmada *Streptomyces parvus* eksraktlarından yeni bir lipopeptid olan arylomcin A6 ve daha önce yapısı aydınlatılan arylomycin A5 bileşikleri izole edilmiştir (Rao ve ark. 2013).

Aktinomisetlerde, genom sekanslama ve biyoinformatik analizler sayesinde sekonder metabolitleri kodlayan birçok gen kümesi ortaya çıkarılmıştır (Rebets ve ark. 2013). *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517 izolatının genomundan elde edilen kosmid kütüphanelerin taranması sonucunda antibakteriyel etkiye sahip pyridomycin biyosentetik gen kümesi tanımlanıp karakterize etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda gen kümesinin 42,5 kb büyüklüğünde olduğu 26 ORF bölgesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Tingting Huang ve ark. 2011).

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

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

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

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

Bitkilerle endofitik olarak yaşayan bir *Streptomyces* türünün biyoaktif sekonder metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmada *Celastraceae* familyasına ait bir bitkiden *Streptomyces* MaB-QuH8 türü izole edilmiştir. Bu izolattan TLC ve kolon kromatografisi tekniklerine dayalı yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda Gram (+) organizmalara karşı etkili celastramisin Ave B olarak isimlendirilen antibiyotikler izole edilmiştir (Pullen ve ark. 2002).

Streptomyces türleri tarafından üretilen doğal ürünlerin izolasyonu ve yapılarının aydınlatılmasında LC-NMR, LC-MS/MS tekniklerinin kombine olarak kullanılması daha hızlı ve avantajlı olabilir. Bu teknikleri kullanarak yapılan bir çalışmada *Streptomyces violaceoruber* TÜ 22'nin üretmiş olduğu sekonder metabolitlerden yeni olan granitcin C, metanaticin A, B, C ve daha önce yapıları aydınlatılan granaticin A, granatomycin E, daidzein ve genistein bileşikleri elde edilmiştir (Pham ve ark. 2005).

Bir toprak izolatı olan *Streptomyces hygroscopicus* kültür filtratı etil asetat ekstratlarından üç yeni amidin izolasyonu yapılmıştır. NMR ve MS spektrumu verileri kullanılarak yapıları aydınlatılan bu bileşiklerin hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilere karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hossain ve ark. 2004).

Benzer bir çalışmada değişik analitik saflaştırma ve spekstroskopik analiz yöntemleri kullanılarak *Streptomyces sp.* B7064 izolatının sentezlemiş olduğu makrolid yapısındaki yeni bir antibiyotik olan chalcomicin B elde edilmiştir. Bu antibiyotiğin *B. subtilis* ve *C. albicans'a* karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Asolkar ve ark. 2002).

Yeni nesil genom dizileme tekniklerinin geliştirilmesi doğal ürün araştırmalarına yeniden ivme kazandırmıştır. Gerek maliyetinin düşürülmesi gerek kısa sürede gerçekleşmesi birçok mikroorganizma genomunun sekanslamasına olanak sağlamıştır. Bu sayede ya birçok doğal ürün keşfedilmiş ya da var olan potansiyelleri artırılmıştır. Bu alanda yapılan bir çalışmada norvancomycin üreticisi olan *Amycolatopsis orientalis* CPCC200066' nın tüm genomu sekanslanarak hem norvancomycin üretimi geliştirilmiş hem de yeni doğal ürün keşfetme potansiyeli artırılmıştır (Lei ve ark. 2017).

Genom tarama yaklaşımları bir organizmanın doğal ürünlerden sorumlu bilinen gen ya da gen kümelerini detaylıca anlamamıza olanak sağladığı gibi keşfedilmeye aday yeni doğal ürün sentezleme potansiyeline sahip gen veya gen kümelerini ortaya çıkarmaktadır. Tüm genomu sekanslanan *S. ambofaciens* üzerinde yapılan analizlerde seconder metabolit üretme potansiyeline sahip birçok yeni gen kümesinin olduğu anlaşılmıştır (Thibessard ve ark. 2015).

Streptomyces türleri biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin en önemli kaynaklarındandır. Genom projeleri ile birlikte bunların tahmin edilenden daha fazla biyosentetik gen kümesine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. *Streptomyces collinus* Tü 365'in tüm genomu sekanslanıp analiz edildiğinde daha önce sadece kirromycin üreticisi olduğu bilinirken genom analizi sonucunda farklı sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu 32 gen kümesinin daha olduğu anlaşılmıştır (Iftime ve ark. 2016).

Streptomyces avermitilis antiparazitik bir ajan olan avermektinin üreticisi olarak bilinmektedir. Tüm genomu sekanslandığında sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu 30 gen kümesinin olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu gen kümelerinin tüm genomun % 6,6'sına denk geldiği ifade edilmektedir (İkeda ve ark. 2003).

Streptomyces Tü 6176 sitotoksik benzoxazole nataxazole üreticisi olarak bilinmektedir. *Streptomyces* Tü 6176'nın genomunun biyoinformatik analizleri yapıldığında sekonder metabolit biyosentezinden sorumlu 38 gen kümesine sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu gen kümelerinden bazılarının AJI9561 ve onun türevi olan nataxazole, hygromycin B, ionophores enterobactin ve coelibactin'in biyosentezinden sorumlu oldukları iddia edilmektedir (Prieto ve ark. 2015).

Doğal ürün araştırmalarında yeni bileşiklerin yapısal olarak aydınlatılması genellikle NMR kullanılarak yapılmaktadır. Ancak günümüzde kütle spektrometresinin geliştirilerek daha fazla kullanılmasıyla elde edilen MS verilerinin MS-FINDER gibi çeşitli algoritmik programların kullanılmasıyla hem daha önce keşfedilmiş bileşiklerin tespiti daha hızlı ve daha kolay gerçekleşmesi hem de yeni bileşiklerin aydınlatılmasında daha fazla avantaj sağlandığı iddia edilmektedir (Kind ve Fiehn 2017).

Mikrobiyal hastalıklar gün geçtikte artmaktadır. İnsanlara geçen mikroorganizma kaynaklı 200'den fazla hastalık bilinmektedir. Bu hastalıkları kontrol altında tutmak için yeni antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada 106 aktinomiset türü izole edilip bunların üretmiş olduğu metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Bunlardan 44 tanesinin farklı patojenik mikroplara karşı antimikribiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Ganesan ve ark. 2016).

Benzer bir çalışmada karasal aktinomisetlerin antimikrobiyal potansiyellerini ortaya çıkarmak için yapılan bir çalışmada morfolojik olarak birbirinden farklı 121 aktinomiset türü izole edilmiştir. Bu aktinomisetlerin çoğunda elde edilen metabolitlerin *Staphylococcus aureus* ve *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte elde edilen ekstraktların çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak bileşiklerin karakterizasyonu sonucu bulunan aktinomisin C1,

C2 ve C3'ün *S. aureus* ve *M. tuberculosis*'e karşı önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Shah ve ark. 2017).

1. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Biyolojik materyal olarak İç Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren lokal endemik bitkilerin kök çevresi topraklarından izole edilen ve moleküler teşhisi yapılan aktinomisetlerden *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. AS41, *Streptomyces* sp. BA2, *Streptomyces* sp. BS40, *Streptomyces* sp. CA17 ve *Streptomyces* sp. CAH29 kullanıldı (Yılmaz ve ark. 2008).

3.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları

Disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinin araştırılması için *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis (*ATCC 11774*)* , *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) test organizmaları kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

M2

10 g malt özütü (Merck), 4 g maya özütü (Oxoid), 3 g glukoz (Merck), 15 g agar (Merck) tartılarak çeşme suyu ile 1 L'ye tamamlanıp 121°C'de 20 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

Nutrient Agar (NA)

8 g nutrient broth (Merck), 15 g agar (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp121°C'de 20 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

Nutrient Sıvı Besiyeri (NB)

8 g nutrient broth (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp121°C'de 20 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

Tryptik Soya Besiyeri (TSB)

30 g Triptik Soya Broth (Oxoid) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp 121°C'de 20 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

TAS

1 g K_2HPO_4 (Codex), 0,5 g potasyum nitrat (Merck), 0,1 g $CaCl_2.H_2O$ (Merck), 0,2 g $MgSO_4.2H_2O$ (Merck), 0,1 g sodyum klorür (Sigma), 10 g asparajin (Merck), 10 g sükroz (Molecula) tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanıp (pH=7,4) 121°C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi. $FeCI_3$ (Riedel-de haen), 0,22 µm şırınga filtreden (İsolab) geçirilerek litrede 0,01 gr olacak şekilde besiyerine eklendi.

TKN

1 g K_2HPO_4 (Codex), 10 g potasyum nitrat (Merck), 0,1 g $CaCl_2.H_2O$ (Merck), 0,2 g $MgSO_4.2H_2O$ (Merck), 0,1 g sodyum klorür (Sigma), 0,5 g asparajin (Merck), 10 g sükroz (Molecula) tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanıp (pH=7,4) 121°C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi. $FeCI_3$ (Riedel-de haen), 0,22 µm şırınga filtreden (İsolab) geçirilerek litrede 0,01 gr olacak şekilde besiyerine eklendi.

GYM

4 g glukoz (Merck), 4 g yeast extract (Oxoid), 10 g malt extract (Merck), 0,2 g $MgSO_4.2H_2O$ (Merck), 0,1 g $CaCl_2.H_2O$ (Merck), tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanıp (pH=7,4)) 121°C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi. $FeSO_4.7H_2O$ (Merck), 0,22 µm şırınga filtreden (İsolab) geçirilerek litrede 0,01 gr olacak şekilde besiyerine eklendi.

Sabourand Dekstroz Besiyeri (SDB)

30 g SDB (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp 121°C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

Sabourand Dekstroz Agar (SDA)

65 g SDA (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp 121°C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

YEME

340 g sükroz (Molecula), 10 g glukoz (Merck), 5 g pepton (Oxoid), 3 g malt özütü (Merck) ve 3 g maya özütü (Oxoid) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp 121 °C'de 20 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

3.1.3. Ekstraktsiyon İçin Kullanılan Kimyasallar

Organik çözücü olarak etil asetat (Merck), diklorometan (DCM, Sigma) ve metanol (Merck) kullanıldı.

3.1.4. LC-MS/MS Analizlerinde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Antibiyotikler

Vankomisin (Sigma), kanamisin (Sigma), eritromisin (Sigma), nalidiksik asit (Sigma), klortetrasiklin hidroklorür (Sigma), amfoterisin B (Sigma) ve daunorubisin hidroklorür (Sigma).

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Laminar kabin (Telstar AV-100)

Etüv (Binder)

Çalkalayıcı orbital inkübatör (Zehrincheng Zhwy-200B)

-20 derin dondurucu (Sanyo)

UV-Vis Spectrofotometre (Varian)

Soğutmalı santrifüj (Sigma)

pH meter (Mettler-Toledo)

Otoklav (Hirayama-HV-502)

Evaporatör (Heidolph)

Hassas tartı (GEC Avery)

Magnetik karıştırıcı (Stuart)

Vorteks (VWR)

+4 °C mini buzdolabı (Sanyo)

28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)

Isıtıcı (Heildoph).

Jel görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)

Mini santrifüj (ES-6)

Su Banyosu (Grant LTD 6G)

Mikropipet (Eppendorf)

Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad)

Güç kaynağı (Bio-Rad)

Elektroforez (Bio-Rad)

3.2. Metot

3.2.1. *Streptomyces* İzolatlarının Farklı Besiyerilerinde Üretilmesi ve Sekonder Metabolitlerinin Ekstraksiyonu

M2 agarda üretilmiş *Streptomyces* izolatları 250 ml erlenlerde hazırlanmış 50 ml TSB besiyerlerine ekildi. 28 °C'de 230 rpm'de 72 saat ön inkübasyondan sonra TAS, TKN ve GYM besiyerlerine %5 olacak şekilde inokülasyon yapıldı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, miseller ve süpernatantı ayırmak için kültür santrüfüj edildi. Süpernatant, çözücüler ile 1:1 oranında ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Ekstrakt Na_2SO_4 ile kurutularak evapore edildi.

3.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini

Antimikrobiyal aktivite, disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı (Elleuch ve ark. 2010). Disk difüzyon testinde antimikrobiyal etki incelemek için NA ve SDA

kullanıldı. Bir gece üretilmiş bakteri ve *Candida* kolonileri 25 ml NB ve SDB'ye inoküle edildi. 37^{o}C ve 150 rpm'e ayarlanan orbital çalkalayıcıda bulanıklık 0.5 McFarland standartına (1x10^{8} CFU/mL) ulaşıncaya kadar 3-6 saat inkübe edildi. Hazırlanan final inokulümlerden 100 µL alınarak her bir katı besiyerine yayma yapıldı. Besiyerleri 10 dakika bekletildikten sonra üzerine 6 mm çapındaki diskler yerleştirildi. Bu disklere 20 µL ham ekstrakt emdirildi. Etüvde 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında inhibisyon zonları ölçüldü.

3.2.3. Sekonder Metabolitlerin LC/MS/MS Analizleri

Elde edilen ham ekstraktlar final konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde metanolde çözüldükten sonra filtre edilerek (0,22 µm) LC-MS/MS analizlerine tabi tutuldu. Bu analizler için Agilent Extend-C18 RP UPLC kolonun (2.1×100 mm, 1.8 µm) akış hızı 0,3 mL/dk olacak şekilde bağlı olduğu Agilent 1260 LC ve Agilent 6545 Q-TOF LC/MS sistemleri kullanıldı. Her bir ekstrakttan sisteme 20 µl enjekte edildi. Ekstraktların analizi için%10 asetonitril (ACN) (%0.1 su, 0–3 dk), %10–100 ACN (%0.1 su)/%0.1 su (3–23 dk), %100 ACN (%0.1 su, 23–25 dk), %10 ACN (%0.1 su, 25–30 dk) LC gradiyenti kullanıldı. Ardından MS/MS analizi için pozitif modda, 100-1600 m/z aralığındaki metabolitler tarandı. Buna ek olarak VCap değeri 3000, çarpışma enerjisi 20 eV, gaz sıcaklığı ise 300 ºC olacak şekilde ayarlandı.

Analizler Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı tarafından gerçekleştirildi.

3.2.4. GNPS Network ve Dereplikasyon Analizleri

LC/MS/MS analizleri sonucunda elde edilen ham MS/MS veri dosyaları network analizleri için 'Trans Proteomic Pipeline' programı ile mzXML dosya formatına çevrildi.

Network ve dereplikasyon analizleri için GNPS programı kullanıldı. (www.gnps.ucsd.edu). Tüm network analizlerinde verilerin spektral benzerliklerinin vektörel ölçüsü olan cosine değeri 0,7 olarak seçildi. Spektral analiz sonuçlarının görüntülenmesinde 'Cytoscape 3.4.0' (www.cytoscape.org) programı kullanıldı.

3.2.5. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Streptomyces sp. BA2 izolatına ait katı kültürden bir miktar alınarak %5 maltoz eklenmiş TSB besiyerine aktarılıp 230 rpm ve 28 ^{0}C'de orbital çalkalamalı inkübatörde

48 saat üretildikten sonra üreyen kültürden 5 ml alınıp 2/3 oranında hazırlanan TSB-YEME besiyerine ekleyip aynı koşularda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kültürler santrifüjlenerek Qiagen (DNeasy Blood and Tissue Kit) kiti kullanılarak kromozomal DNA'lar izole edildi.

3.2.6 Genom Dizileme ve Biyoinformatik Analizler

Streptomyces sp. BA2'nin genom dizilemesi PacBio ve Illumina teknolojileri kullanılarak hibrid bir yaklaşım ile Macrogen (Güney Kore) firmasına yaptırıldı. Kütüphaneler 2 farklı şekilde (PacBio 20 kb SMRT ve Illumina Truseq shotgun) hazırlandı. Sonrasında SMRT (PacBio) ve Hiseq2500 100bp paired-end ve 150 bp mate-pair (Illumina) dizileme yapıldı. PacBio ile *de novo* birleştirmeler (assembling) yapıldı. Illumina hata düzeltme özelliği ile hatalar düzeltildi (error correction). Elde edilen dizilimlerin kalitesini arttırmak için aynı zamanda Illumina ile birleştirmeler yapılarak PacBio ile boşluklar kapatıldı. Uniprot, GO, InterPro, Pfam, CDD, TIGRFAM ve EggNOG programları kullanılarak gen tahminleri ve genlerin fonksiyonları belirlendi (annotation). Şekil 3.1' de genel hatları ile dizileme ve analiz şeması görülmektedir.



Şekil 3.1. Genom dizileme ve biyoinformatik analizlerin şematik olarak gösterilmesi.

Streptomyces sp. BA2 genomunda sekonder metabolit/doğal ürün gen kümelerinin analizi antiSMASH 4.2.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

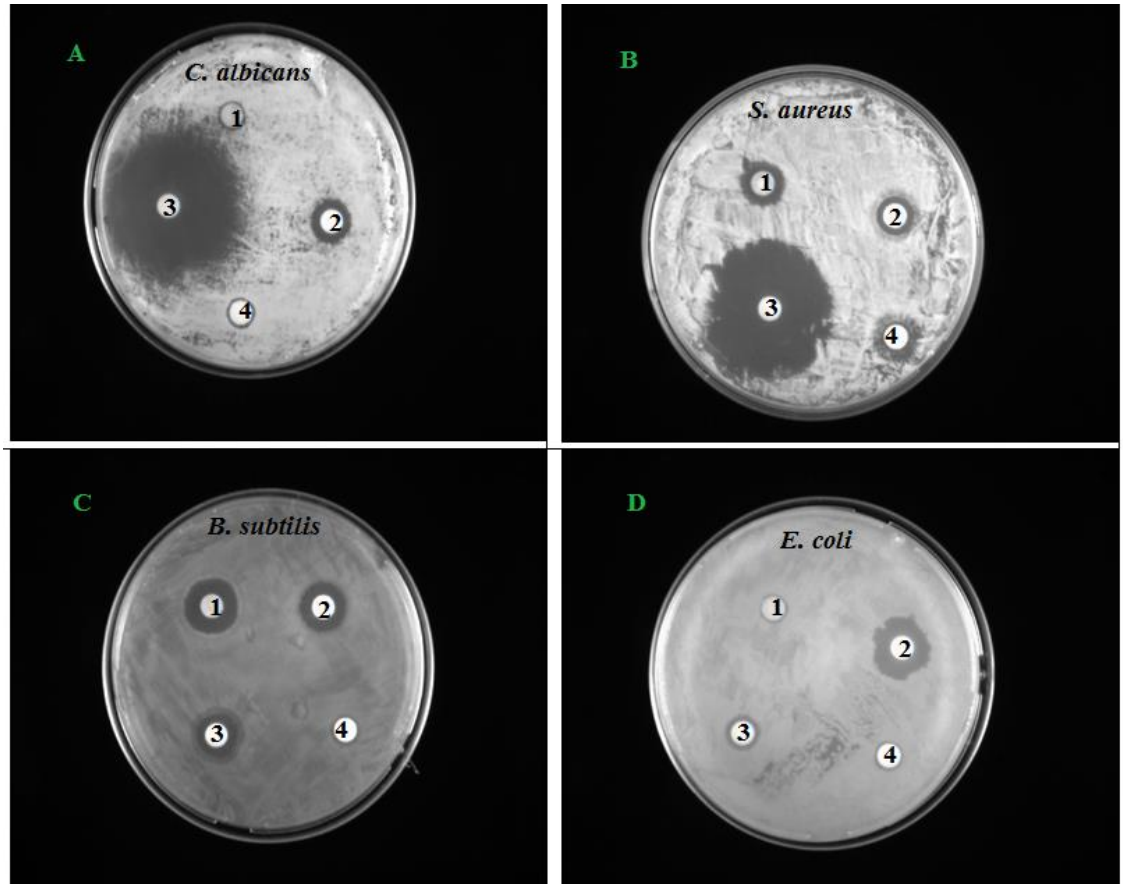
4.1. Bulgular

4.1.1. *Streptomyces* İzolatalarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Araştırma grubumuz tarafından daha önce moleküler teşhisi yapılmış *Streptomyces* izolatları bu çalışma kapsamında kullanıldı (Yılmaz ve ark. 2008). Bunların içerisinde gerek kimyasal gerekse genetik tarama çalışmaları ile biyosentetik potansiyelinin yüksek olduğu ortaya konulan 6 izolat *(Streptomyces* spp. AS41, BA2, AA50, CAH29, BS40 ve CA17) modifiye edilen 3 farklı besi yerinde üretildi. Filtratların etil asetat çözücüsü kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite bulguları Çizelge 4.1'de verilmektedir. Yüksek zon çapı ve geniş spektrum açısından en iyi antimikrobiyal aktivite tüm organizmalarda GYM besi yerinden elde edilen ekstraktlarda görüldü. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatının *C. albicans* ve *S. aureus* üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi (>30) özellikle dikkat çekmektedir (Şekil 4.1A ve B). BS40 ve CAH29 izolatlarının ekstraktlarının denenen tüm test organizmalarına karşı geniş spektrumda inhibisyon etkilerinin olduğu tespit edildi. Bununla birlikte CAH29 izolatının TAS ve TKN besiyerlerine ait ekstraktların *S. aureus'a* karşı sırasıyla 23 ve 18 mm'lik inhibisyon çapına sahip olduğu belirlendi. Bir diğer izolatımız olan CA17'nin TKN besi yerinden elde edilen ekstraktının hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı geniş yelpazede antimikrobiyal aktvite gösterdiği bulundu. BA2 izolatının üretildiği her üç kültürden elde edilen ekstraktların, gram pozitif bakteriler olan *S. aureus*'a ve *B. subtilis*'e (Şekil 4.1C) karşı inhibisyon etkisi gösterdiği buna ilaveten sadece GYM besiyerinde üretilenlerin *C. albicans*' a karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlendi. BS40 izolatının GYM (Şekil 4.1D), CA17'nin ise TKN besiyerlerinde üretildiğinde Gram negatif test organizmaları olan *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon etkisi gözlendi. TAS ve TKN besiyerlerinde üretilen AA50, AS41 ve BS40 izolatlarında antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi.

Çizelge 4.1. AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besi yerinde üretilmiş ve etil asetat ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri

İzolatlar	**Besiyeri**	**İnhibisyon zon çapları (mm)**				
		S. aureus (ATCC 25923)	***B. subtilis*** *(*ATCC 11774*)*	***E. coli*** (ATCC 25922)	***P. aeruginosa*** (ATCC 27853)	***C. albicans*** (ATCC 10231)
AA50	GYM	20	20	10	-	10
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
AS41	GYM	12	10	8	-	12
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
BA2	GYM	12	18	-	-	10
	TAS	18	20	-	-	-
	TKN	15	18	-	-	-
BS40	GYM	18	16	14	12	14
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
CA17	GYM	18	8	8	-	16
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	10	10	10	10	
CAH29	GYM	>30	14	10	8	>30
	TAS	23	-	-	-	-
	TKN	18	-	-	-	-

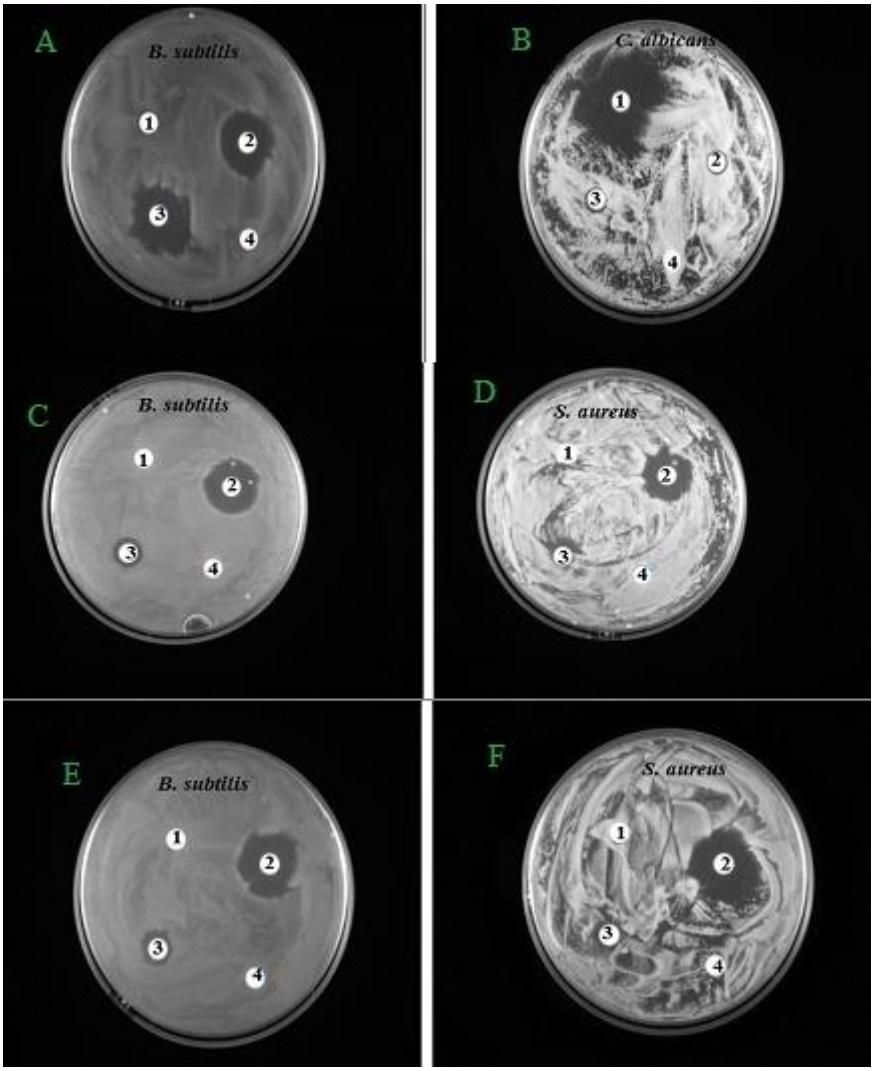


Şekil4.1. Farklı izolatlara ait etil asetat ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri A) 3; *Streptomyces* sp. CAH29'un GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Etilasetat). B) 3; *Streptomyces* sp. CAH29'un GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Etilasetat). C) 1; *Streptomyces* sp. BA2'nin GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 2; *Streptomyces* sp. BS40'ın GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 3; *Streptomyces* sp. CAH29'un GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Etilasetat). D) 2; *Streptomyces* sp. BS40'ın GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Etilasetat)

Filtratların diklorometan çözücüsü kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktiviteleri bulguları Çizelge 4.2'de verilmektedir. Kullanılan izolatlar içerisinde BA2'nin geniş spektrumda antimikrobiyal aktivitesinin bulunduğu tespit edildi. CAH29 izolatının ise *S. aureus* ve *C. albicans*'a (Şekil 4.2B) karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulundu. GYM besiyerinde üretilen AA50 (Şekil 4.2A), TAS ve TKN'de üretilen BA2 izolatlarının *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.2 C, D, E, F). Diğer izolatlarımız olan AS41, BS40 ve CA17'nin DCM ekstraktlarında denenen test organizmalarına karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edilememiştir.

Çizelge 4.2. AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besi yerinde üretilmiş ve diklorometan ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri

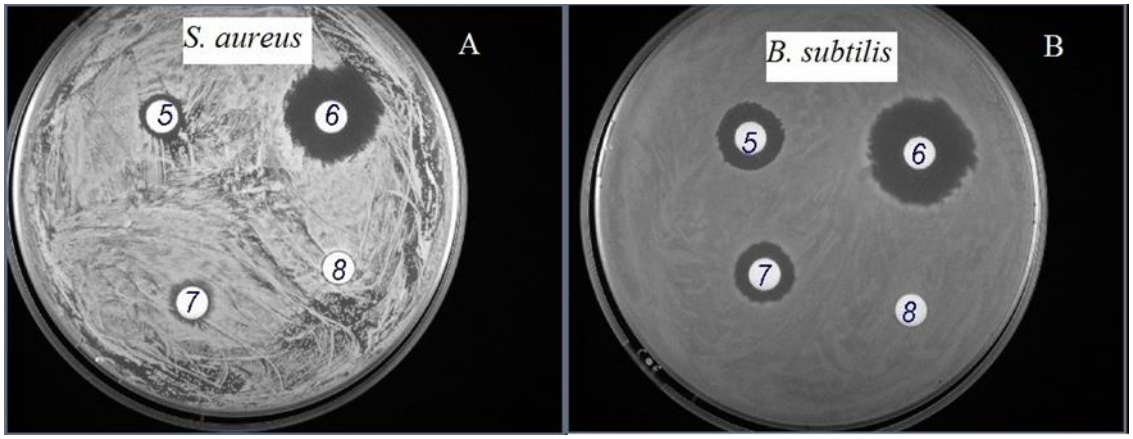
İzolatlar	**Besiyeri**	**İnhibisyon zon çapları (mm)**				
		S. aursus (ATCC 25923)	***B. subtilis*** *(*ATCC 11774*)*	***E. coli*** (ATCC 25922)	***P.aeruginosa*** (ATCC 27853)	***C. albicans*** (ATCC 10231)
AA50	GYM	18	24	-	-	-
	TAS	-	10	-	-	-
	TKN	-	10	-	-	-
AS41	GYM	-	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	
	TKN	-	-	-	-	-
BA2	GYM	20	20	8	-	10
	TAS	18	18	-	-	-
	TKN	20	18	-	-	-
BS40	GYM	-	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
CA17	GYM	-	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
CAH29	GYM	26	-	-	-	>30
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	10	-	-	-



Şekil 4.2. Farklı izolatlara ait diklorometan ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri A) 2; *Streptomyces* sp. AA50'nin GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 3; *Streptomyces* sp. BA2'nin GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan). B) 1; *Streptomyces* sp. CAH29'un GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan). C) 2; *Streptomyces* sp. BA2'nin TAS kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan). D) *Streptomyces* sp. BA2'nin TAS kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan). E) BA2'nin TKN kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan). F) BA2'nin TKN kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 4; Negatif kontrol (Diklorometan)

Diğer bir çözücümüz olan metanol ile elde edilen ekstraktların antimikrobyal aktiviteleri Çizelge 4.3'de görülmektedir. Bu çözücü ile hazırlanan ekstraktların Gram negatif bakteriler *E. coli* ve *P. aeruginosa'*ya karşı antibakteriyel ve *C. albicans'*a karşı antifungal aktivitesinin olmadığı tespit edildi. GYM ve TAS besiyerlerinde elde edilen

ekstraktlarda en iyi aktiviteyi BA2 izolatının *S. aureus* (Şekil 4.3 A) ve *B. subtilis'*e (Şekil 4.3B) karşı gösterdiği gözlemlendi. TKN besi yerinde elde edilen ekstraktlarda ise sadece CAH29 izolatının *B. subtilis'*e karşı inhibisyon zon oluşturduğu gözlendi.



Şekil 4.3. Farklı izolatlara ait metanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş antimikrobiyal aktiviteleri A) 6; *Streptomyces* sp. BA2'nin GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 8; Negatif kontrol (Metanol). B) 6; *Streptomyces* sp. BA2'nin GYM kültürlerinde görülen inhibisyon zonu, 8; Negatif kontrol (Metanol).

Çizelge 4.3. AA50, AS41, BA2, BS40, CA17 ve CAH29 izolatlarının 3 farklı besi yerinde üretilmiş ve metanol ile ektraksiyonu yapılmış bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri

İzolatlar	**Besiyeri**	**İnhibisyon zon çapları (mm)**				
		S. aursus (ATCC 25923)	***B. subtilis*** (ATCC 11774)	***E. coli*** (ATCC 25922)	***P. aeruginosa*** (ATCC 27853)	***C. albicans*** (ATCC 10231)
AA50	GYM	-	14	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
AS41	GYM	-	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
BA2	GYM	20	22		-	-
	TAS	-	16	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
BS40	GYM	14	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
CA17	GYM	8	16	-	-	-
	TAS	-	8	-	-	-
	TKN	-	-	-	-	-
CAH29	GYM	18	-	-	-	-
	TAS	-	-	-	-	-
	TKN	-	10	-	-	-

4.1.2. *Streptomyces* sp. BA2 İzolatının Genom Özellikleri

PacBio ve Illumina yeni nesil dizileme stratejileri bir arada kullanılarak BA2 izolatının tüm genom dizilemesi yapıldı. PacBio uzun okumalar yaptığı için doğru okuma ve okunanları bir araya getirip birleştirme açısından avantaj sağlamaktadır. Illumina'nın hata düzeltme fonksiyonu ise kayıp dizilerin düzeltilmesini sağlamaktadır. İki teknolojinin beraber kullanılması kontig sayısını düşürmüş ve aynı zamanda GC (Guanin ve Sitozin) oranı yüksek olan aktinomisetlerde elde edilmesi zor olan dizileme doğruluğunu/kalitesini arttırmıştır.

Tüm genom dizileme ve yeni baştan birleştirme (de novo assembling) sonucunda tüm genom dizilimi 2 kontig olarak elde edildi. Kontiglerin özellikleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Streptomyces* sp. BA2 izolatının genom dizilimi

Kontig Adı	**Uzunluğu (bp)**	**GC (%)**
Kontig1	9,441,140	70.1
Kontig2	602.338	67.4
Total	10.043.478	69.92

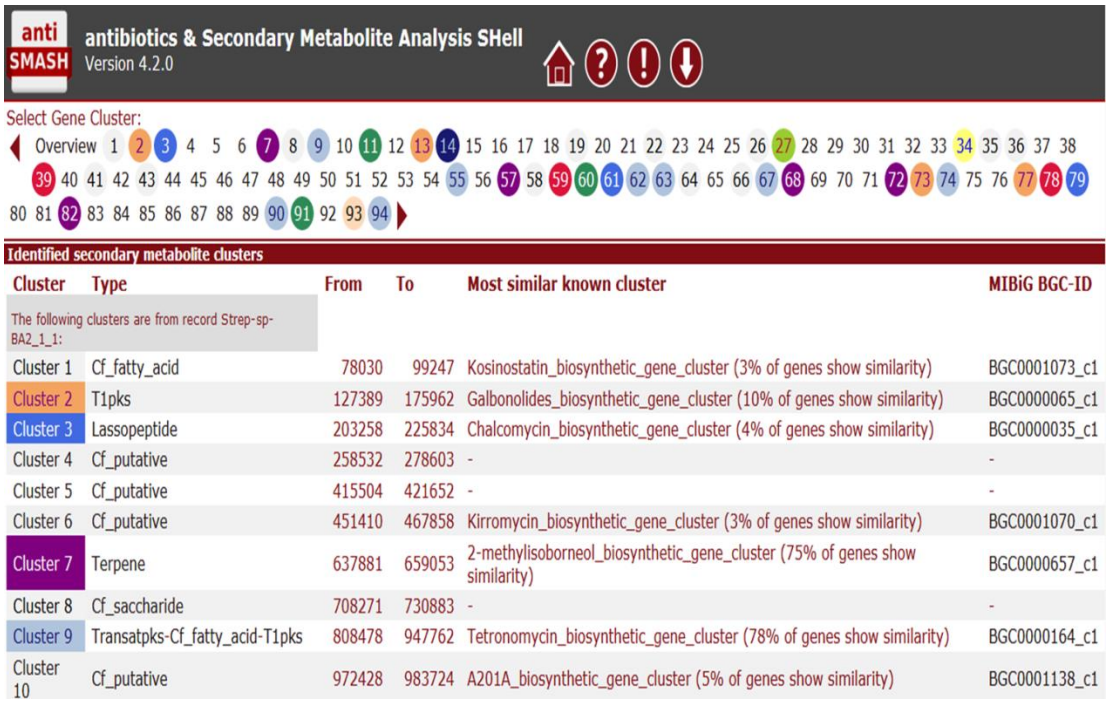
Biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen *Streptomyces* sp. BA2 izolatının genom özellikleri Çizelge 4.5'de görülmektedir. Yaklaşık 10 Mb uzunluğuna sahip genomda total olarak 9.056 gen olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.5. *Streptomyces* sp. BA2 izolatının genom özellikleri

Kontig Adı	**Uzunluğu (bp)**	**Kodlanan bölge sayısı (CDS)**	**tRNA genleri**	**rRNA genleri**
Kontig1	9.441.140	8.491	84	18
Kontig2	602.338	565	4	0
Total	10.043.478	9.056	88	18

4.1.2.1. *Streptomyces* sp. BA2 izolatının Biyosentetik Gen Kümelerinin Analizi

antiSMASH programı ile yapılan analizler sonucunda *Streptomyces* sp. BA2 izolatının 99 adet biyosentetik gen kümesi içerdiği tespit edildi. Bu gen kümelerinin sayısı, iki kontig olarak elde edilen genomun 1. kontiginde 94 (Şekil 4.4), 2. kontiginde ise 5 (Şekil 4.5) olarak belirlendi.



Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record Strep-sp-BA2_1_1:					
Cluster 1	Cf_fatty_acid	78030	99247	Kosinostatin_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)	BGC0001073_c1
Cluster 2	T1pks	127389	175962	Galbonolides_biosynthetic_gene_cluster (10% of genes show similarity)	BGC0000065_c1
Cluster 3	Lassopeptide	203258	225834	Chalcomycin_biosynthetic_gene_cluster (4% of genes show similarity)	BGC0000035_c1
Cluster 4	Cf_putative	258532	278603	-	-
Cluster 5	Cf_putative	415504	421652	-	-
Cluster 6	Cf_putative	451410	467858	Kirromycin_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)	BGC0001070_c1
Cluster 7	Terpene	637881	659053	2-methylisoborneol_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)	BGC0000657_c1
Cluster 8	Cf_saccharide	708271	730883	-	-
Cluster 9	Transatpks-Cf_fatty_acid-T1pks	808478	947762	Tetronomycin_biosynthetic_gene_cluster (78% of genes show similarity)	BGC0000164_c1
Cluster 10	Cf_putative	972428	983724	A201A_biosynthetic_gene_cluster (5% of genes show similarity)	BGC0001138_c1

Şekil 4.4. antiSMASH programı ile kontig 1'de biyosentetik gen kümelerinin şematik gösterimi.



Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record Strep-sp-BA2_2_1:					
Cluster 1	Cf_putative	183155	204619	Elaiophylin_biosynthetic_gene_cluster (20% of genes show similarity)	BGC0000053_c1
Cluster 2	Cf_saccharide	274521	336024	-	-
Cluster 3	Ectoine	422213	432599	Distamycin_biosynthetic_gene_cluster (9% of genes show similarity)	BGC0001147_c1
Cluster 4	T3pks-Nrps-Cf_fatty_acid-Butyrolactone-Phenazine	429705	517123	Merochlorin_biosynthetic_gene_cluster (53% of genes show similarity)	BGC0001083_c1
Cluster 5	T2pks-Butyrolactone	527072	585862	Auricin_biosynthetic_gene_cluster (44% of genes show similarity)	BGC0000201_c1

Şekil 4.5. antiSMASH programı ile kontig 2'de biyosentetik gen kümelerinin şematik gösterimi.

BA2 izolatının genomundaki sekonder metabolizma gen kümeleri incelendiğinde bunların birbirinden oldukça farklı metabolik yolaklar tarafından sentezlendiği dikkat çekmektedir (Çizelge 4.6). Bu gen kümeleri içinde poliketid sentaz, ribosomal olmayan peptid sentetaz, PKS/NRPS hibrit, lantibiyotik, terpen, ektoin, indol, siderofor vs. gibi birçok bileşik sınıfına ait ve farklı doğal ürünleri sentezleyen gen kümeleri bulundu. Biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının biyosentezinden sorumlu PKS-I, NRPS ve terpen yolaklarına ait 15 farklı gen kümesi belirlendi. Bunlar içerisinde, aktinomisin, diazepinomisin ve resistomisin gibi önemli antikanser bileşiklerini üreten gen kümeleri mevcuttur. Bununla birlikte tetronomisin, aurisin, komplestatin ve alboflavenon gibi birbirinden farklı antibiyotiklerin sentezinden sorumlu gen kümelerinin varlığı tespit edildi. Tespit edilen gen kümelerinin çoğu diğer aktinomiset genomlarında bulunan gen kümeleri ile oldukça düşük bir homoloji vermekte ve ürünleri bilinmemektedir.

Çizelge 4.6. *Streptomyces* sp. BA2'nin genomunda sekonder metabolit biyosentetik gen kümelerinin antiSMASH programı ile tanımlanması

Biyosentetik gen kümesi türü	**Sayısı**	**Küme numarası**	**Ürünü bilinen en yakın biyosentetik gen kümesi**	**Benzerlik (%)**
PKS-I	5	2 13 9 63 73	Galbonolide Tiacumicin B Tetronomycin Arsenopolyketide Rifamycin	10 6 78 20 3
PKS-II	1	5*(Butyrolactone)	Auricin	44
PKS-III	2	77 90 (Lassopeptide-PKSIII)	BE-14106 Herboxidiene	17 2
NRPS	5	11 60 67 (Terpen -NRPS) 74 (Ectoine-NRPS) 91	Complestatin Enduracidin Griseobactin Kosinostatin Actinomycin	93 10 52 14 89
PKS-I/NRPS Hibrit	1	94	Daptomycin	7
PKS-II/NRPS Hibrit	1	62	Resistomycin	55
PKS-III/NRPS Hibrit	1	4*(Butyrolactone-Phenazine)	Merochlorin	53
Terpen	5	7 57 68 72 82	2-methylisoborneol Albaflavenone Eşleşme yok Hopene Meridamycin	75 100 - 92 5
Lantipeptid	1	34	AmfS	80
Siderofor	3	39 59	Desferrioxamine_B Eşleşme yok	83 -

		78	Scabichelin	20
Melanin	1	55	Istamycin	5
Ectoine	2	27	Ectoine	100
		3*	Distamycin	9
Bacteriocin	2	61	Eşleşme yok	-
		79	Eşleşme yok	-
Indole	1	93	7-prenylisatin	40
Lassopeptide	1	3	Chalcomycin	4
Other	1	14	Diazepinomicin	67
Cf_saccharide	8	8	Eşleşme yok	-
		19	Nocathiacin	4
		22	Eşleşme yok	-
		26	Eşleşme yok	-
		36	SCO-2138	42
		41	Eşleşme yok	-
		58	Nanchangmycin	6
		2*	Eşleşme yok	-
Cf_fatty_acid	5	1	Kosinostatin	3
		35	A54145	3
		43	Eşleşme yok	-
		64	Goadsporin	12
		66	Eşleşme yok	-
Cf_putative	53	4	Eşleşme yok	-
		5	Eşleşme yok	-
		6	Kirromycin	3
		10	A201A	5
		12	Herboxidiene	3
		15	Eşleşme yok	-
		16	Sch47554	7
		17	Kanamycin	1
		18	Eşleşme yok	-
		20	Meilingmycin	3
		21	Eşleşme yok	-
		23	Streptomycin	10
		24	Eşleşme yok	-
		25	Eşleşme yok	-
		28	Eşleşme yok	-
		29	Paromomycin	5
		30	Eşleşme yok	-
		31	Eşleşme yok	-
		32	Eşleşme yok	-
		33	Platencin	6
		37	Eşleşme yok	-
		38	Eşleşme yok	-
		40	Eşleşme yok	-
		42	Eşleşme yok	-
		44	Eşleşme yok	-
		45	Eşleşme yok	-
		46	Eşleşme yok	-
		47	Eşleşme yok	-
		48	Eşleşme yok	-
		49	Eşleşme yok	-
		50	Eşleşme yok	-
		51	Eşleşme yok	-
		52	Chrysomycin	5
		53	Eşleşme yok	-
		54	Eşleşme yok	-

		56	Eşleşme yok	-
		65	Kanamycin	53
		69	Eşleşme yok	-
		70	GE81112	10
		71	Pyrrolomycin	5
		75	Neocarzinostatin	6
		76	Sch47554	5
		80	Cosmomycin_D	5
		81	Ansamitocin	4
		83	Kanamycin	1
		84	Eşleşme yok	-
		85	Eşleşme yok	-
		86	Endophenazines	13
		87	Nanchangmycin	6
		88	A54145	3
		89	Lactonamycin	3
		92	Fredericamycin	6
		1*	Elaiophylin	20

*Kontig 2

antiSMASH programının bu çalışmada da kullanılan son sürümü olan 4.2.0 versiyonuna, gen kümesi tahminleri için "ClusterFinder (Cf)" adında ve özellikle bakteriyel gen kümelerinin sınırlarını ortaya koyan yeni bir algoritma eklendi (Weber ve ark., 2015; Blin ve ark., 2017). "ClusterFinder" tarafından tespit edilen ve bilinen herhangi bir yolak içerisinde kategorize edilemeyen fakat bir gen kümesi olma potansiyeli taşıyan pütatif gen kümeleri, Cimermancic ve arkadaşları (2014) tarafından tanımlanan sınıflandırma kurallarına göre 3 biyosentetik tipte kategorize edildi. Bunlar; sakkarit (Cf_saccharide), yağ asidi (Cf_fatty-acid) ve pütatif (Cf_putative) olarak adlandırılan gen kümeleridir. BA2'nin genomunda bu gen kümelerinden sırasıyla 8, 5 ve 53 olmak üzere toplamda 66 adet bulunmaktadır. Putative sakkarit biyosentetik gen kümeleri; hücreye bağlı, lipopolisakkarit, polisakkarit A veya kapsüler polisakkarit üretirler. Mikrop-konak veya mikrop-mikrop etkileşimlerinde önem arz eden bu polisakkaritlerin difüzlenebilenleri antibakteriyel etkiye sahiptir. Yağ asidi olarak sınıflandırılan kategori (Cf_fatty-acid) fenazin gen kümelerini tespit etmektedir ki bu bileşikler güçlü biyoaktiviteye sahip ve redoks-aktif sekonder metabolitlerdir.

4.1.3. *Streptomyces* İzolatlarının Dereplikasyon ve Network Analizleri

Tüm *Streptomyces* izolatlarına ait GYM, TAS ve TKN sıvı kültürlerinin, etilasetat, diklorometan ve metanol ile ekstrakte edilen metabolitlerinin LC-MS/MS analizleri yapıldı. Yapılan analizlerden elde edilen MS/MS spektumlarının ilgili veri tabanlarında incelenmesinin neticesinde izolatların, bileşik kütüphanelerinde şimdiye

kadar bulunmuş bileşikler ile benzerliği (dereplikasyon analizleri) ve yeni olmaya aday bileşikleri tespit için network kuruldu.

4.1.3.1. 'GNPS' Dereplikasyon Analizi

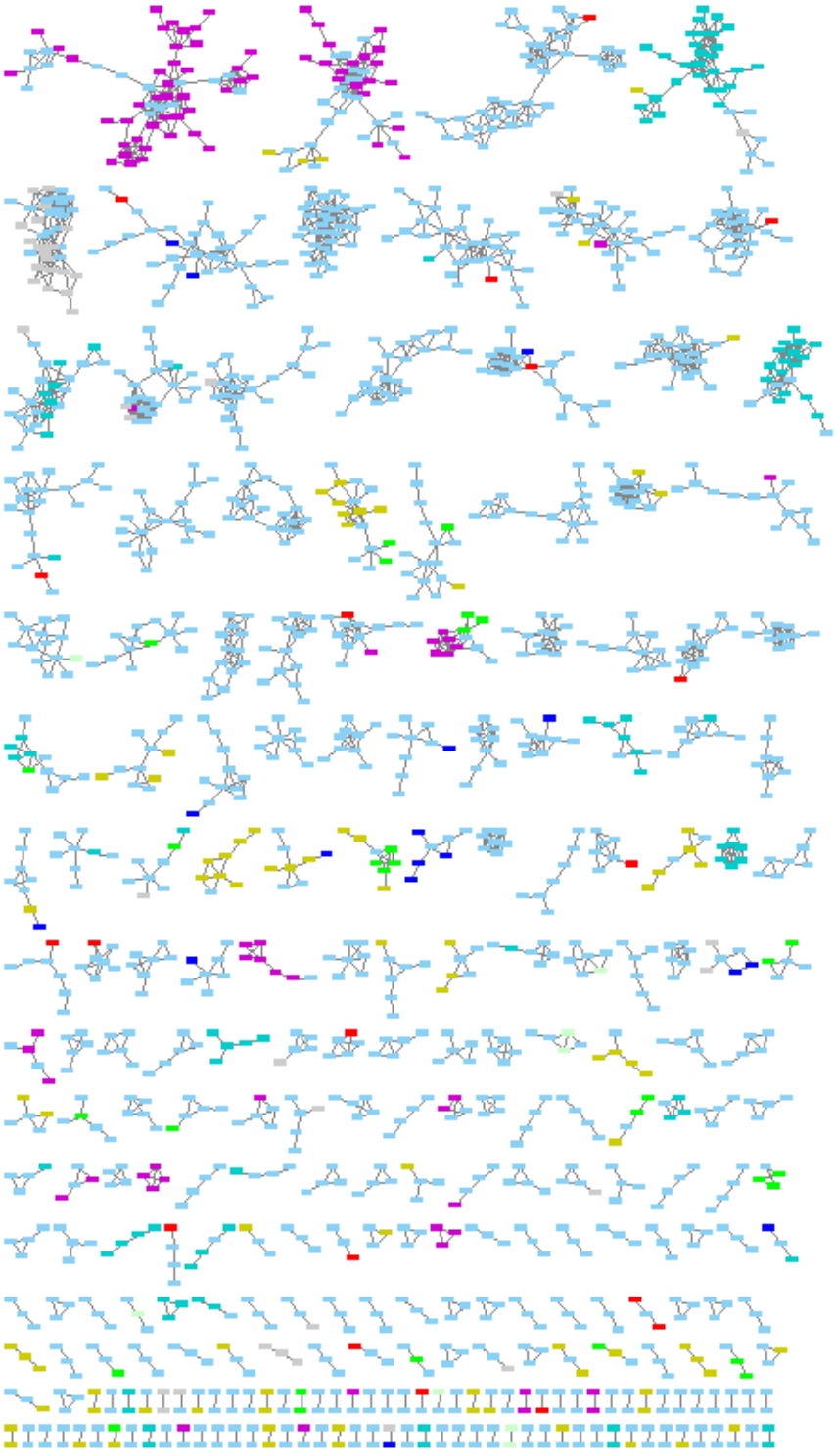
Yapılan analizler sonucunda *Streptomyces* izolatlarına ait MS/MS spektrumlarının GNPS kütüphanesindeki mevcut biyoaktif sekonder metabolitler içerisinde 12 tanesi ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.7). Besiyerlerinin minimal ya da içerik olarak zengin olmasına bağlı olarak *Streptomyces* izolatlarının farklı biyoaktif doğal ürünler ürettiği gözlendi. Bununla birlikte çözücülerin polaritesine bağlı olarak da farklı doğal ürünlerin elde edildiği görülmektedir. Bu bileşiklerden sırasıyla; tümör promotoru ve antitümör aktivitelerine sahip Lyngbyatoxin A ve Aktinomisin D'nin birden fazla izolat tarafından farklı besiyerlerinde üretildiği tespit edildi. CA17 izolatına ait GYM kültürü etilasetat ile ekstrakte edildiğinde Enterocin, diklorometan ile ekstraksiyonunda Alteramide B bileşiğinin elde edildiği görülmektedir. Dikkat çeken analiz sonuçlarından biri de BA2 izolatının TAS besiyeri ile diklorometan çözücüsü kullanıldığında Malyngamide K, TKN besiyeri ve diklorometan çözücüsü kullanıldığında Bouillonamide B bileşiklerini ürettiği gözlenmektedir. Bir diğer önemli bulgu ise her iki bileşik de deniz siyanobakterileri tarafından sentezlendiği bilinen doğal ürünlerdir. Aktinomisetlerden ilk defa rapor edilmiştir. Yine diğer izolatlarımızdan AA50 TKN besiyeri diklorometan çözücü sistemiyle Lymphostin, CAH29 TAS besiyeri diklorometan çözücü sistemiyle Enterocin, BS40 GYM besiyeri etilasetat çözücü sistemiyle Kimbeamide A-C ve AS41 izolatının TKN besiyeri diklorometan çözücü sistemiyle Hectochlorin bileşiğini ürettiği tespit edildi. Kimbeamide A-C ve Hectochlorin de deniz syanobakterileri tarafından üretilen doğal ürünlerdir.

Çizelge 4.7. *Streptomyces* izolatlarına ait dereplikasyon analizi (D: Diklorometan, E: etilasetat, M: Metanol)

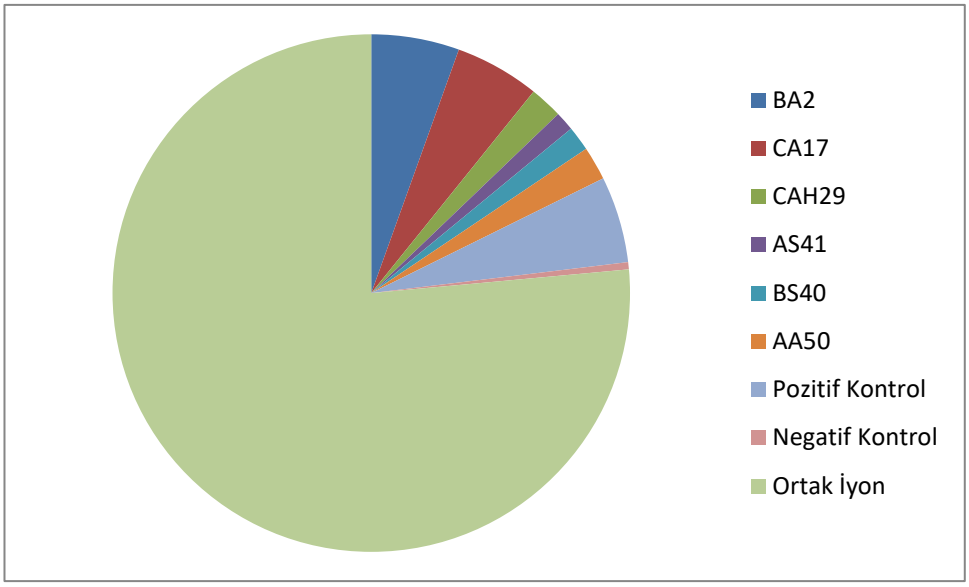
	GYM	**TAS**	**TKN**
AA50	Lyngbyatoxin A (D,M) Actinomycin D (M, E) Euphodendroidin F (E)	Euphodendroidin A (D)	Lyngbyatoxin A (M) Lymphostin (D) Euphodendroidin F(E)
AS41	Actinomycin D (M) Euphodendroidin A (E) Euphodendroidin F (E)	Actinomycin D (D)	Actinomycin D (D) Hectochlorin (D) Euphodendroidin A (E)
BA2	Actinomycin D (D,M,E)	Actinomycin D (D,M,E) Malyngamide K (D) Euphodendroidin A (D) euphodendroidin F (E)	Actinomycin D (D,E) Bouillonamide B (D) Euphodendroidin A (E)
BS40	Lyngbyatoxin A (M) Kimbeamide_A-C (E) Euphodendroidin A (E)	Euphodendroidin F (M) Euphodendroidin A (E)	Euphodendroidin F (D) Actinomycin D (M) Euphodendroidin A (E)
CA17	Lyngbyatoxin A (D,ME) Alteramide B (D) Euphodendroidin A (D,E) Actinomycin D (M) Enterocin (E)	Actinomycin D (D,M) Stypoltrione (D) Lyngbyatoxin A (M,E) Euphodendroidin F (E) euphodendroidin A (E)	Lyngbyatoxin A (D) Euphodendroidin F (D)
CAH29	Lyngbyatoxin A (D,M) Actinomycin D (D) Euphodendroidin A (E)	Lyngbyatoxin A (D) Enterocin (D) Euphodendroidin F (E)	Lyngbyatoxin A (D) Actinomycin D (D) Euphodendroidin F (E) Euphodendroidin A (E)

4.1.3.2. ‘GNPS’ Network Analizi

6 izolat tarafından üretilen tüm bileşiklerin birbirleriyle ve aynı zamanda bileşik kütüphanelerinde bulunan diğer bileşiklerle spektral benzerliğini tespit ederek bileşiklerin identifikasyonunu sağlamak amacıyla network analizleri yapıldı**.** Şekil 4.6’de; ekstraktların LC-MS/MS analizleri neticesinde elde edilen tüm spektrumların yer aldığı network analizi görülmektedir. Moleküler network analizleri sonucunda networkun 2001 kutucuk (node) ve 3199 kenardan (edge) oluştuğu tespit edildi. Bu kutucuklardan 110 tanesi (% 5) BA2, 106 tanesi (% 5) CA17, 41 tanesi (% 2) CAH29, 24 tanesi (% 1) AS41, 31 tanesi (% 2) BS40, 42 tanesi (% 2) AA50, 9 tanesi negatif kontrol ve 108 tanesinin (% 5) pozitif kontrollere ait olduğu bulundu. Geriye kalan 1530 sinyal (% 76) ise tüm gruplar tarafından ortak olarak üretilmiştir (Şekil 4.7). Networktaki her bir kutucuk izolatın ürettiği herhangi bir bileşiğe ait MS/MS spektrumunu temsil etmektedir. Kenarlar ise birbiri ile ilişkili olan spekrumların – dolayısıyla bileşiklerin- arasındaki benzerliğin vektörel ölçüsünü belirtmektedir. Network oluşturulurken, 6 izolatın üretildiği kültürlerin ekstraktları, pozitif kontroller (7 farklı antibiyotik) ve negatif kontroller (izoatların üretildiği besiyerleri) kendi aralarında gruplandırılmıştır. Pozitif kontrol olarak vankomisin, kanamisin, eritromisin, nalidiksik asit, klortetrasiklin hidroklorür, amfoterisin B ve daunorubisin hidroklorür antibiyotikleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise GYM, TAS ve TKN besi yerleri kullanılmıştır. Her bir gruba ait özgün kutucuklar farklı renkler ile gösterilmektedir. Bunların dışında oluşan ortak yani birden fazla izolat ve pozitif kontroller tarafından üretilen bileşiklerin spektrumları program tarafından ayrı bir renk ile gösterilmektedir. Network, benzerlik oranına bağlı olarak tekli ya da birbiri ile kenarlarla ilintili kutucuklardan meydana gelmektedir. Birbiriyle benzer kutucuklar bir araya gelerek kümeleri meydana getirirler. Elde edilen network içerisinde birbiri ile benzerlik göstermeyen ama kendi içinde MS/MS spektrumlarının benzerlik göstermesinden dolayı 100’den fazla küme mevcuttur.



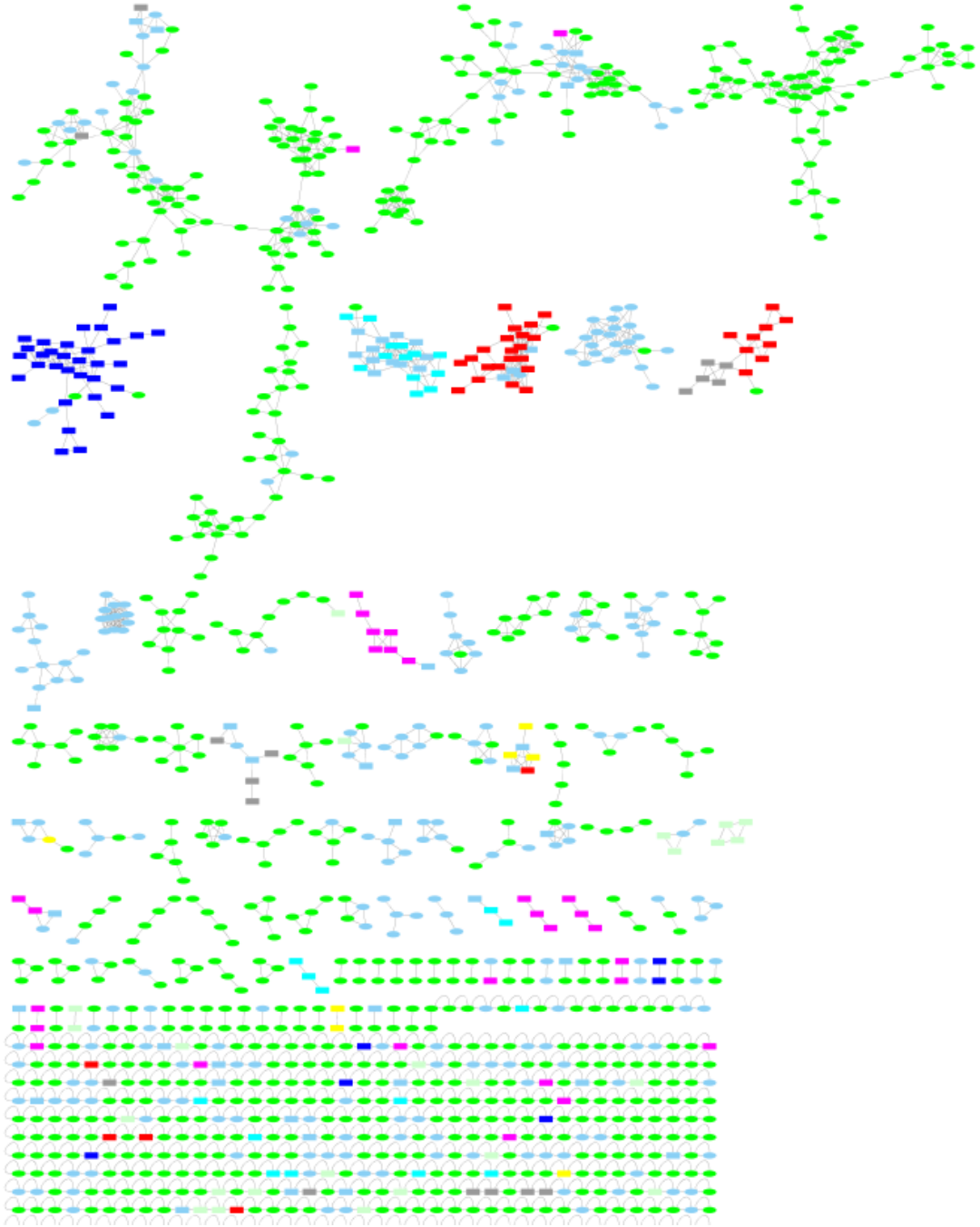
Şekil 4.6. Tüm izolatlardan elde edilen Network'e genel bir bakış: AA50- Gri, AS41-Koyu mavi, BA2-Pembe, BS40-Kırmızı, CA17- Sarı, CAH29-Yeşil, Pozitif kontroller -Turkuaz, Negatif kontroller -Açık yeşil, Ortak sinyaller- Mavi



Şekil 4.7. Bütün gruplar tarafından üretilen kutucukların oransal dağılımı

4.1.3.3. *Streptomyces* sp. BA2 izolatına Ait 'GNPS' Network Analizi

Streptomyces sp. BA2 izolatının üretmiş olduğu metabolitlerin hem bileşik kütüphaneleriyle hem de pozitif kontrollerimizle (vankomisin, kanamisin, eritromisin, nalidiksik asit, klortetrasiklin hidroklorür, amfoterisin B ve daunorubisin hidroklorür) olan spektral benzerliğinin incelenmesi için moleküler network analizi gerçekleştirildi. Şekil 4.8' de görülen moleküler network analizi 1418 kutucuk (node) ve 1977 kenardan (edge) oluşmaktadır. Moleküler network analizinde BA2 izolatının ve pozitif kontrollere ait kutucuklar farklı renklerle belirtilmektedir.

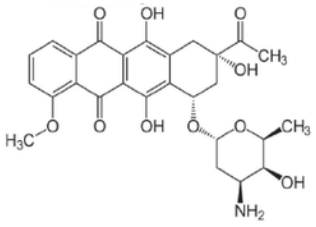
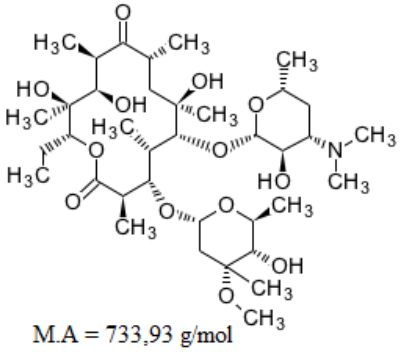
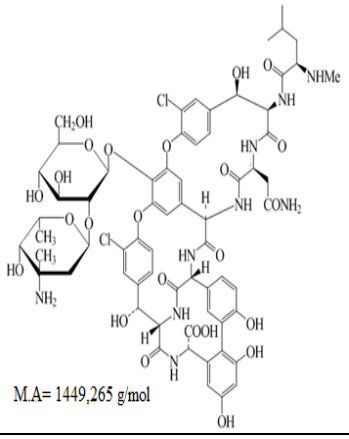
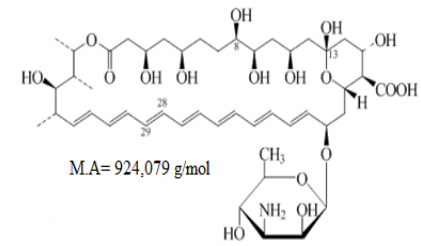
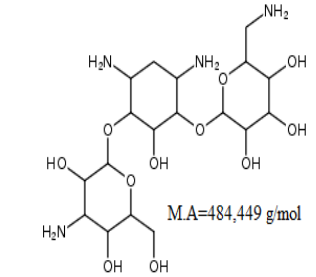


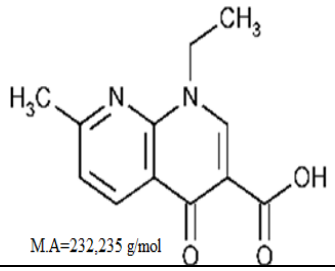
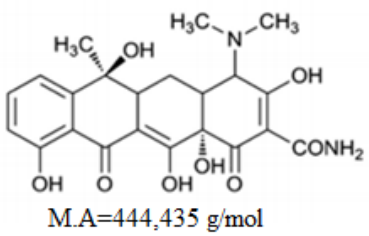
Şekil 4.8. *Streptomyces* sp. BA2 izolatına ait network analizi; BA2- Yeşil, Kanamisin-Gri, Klortetrasiklin hidroklorür-Turkuaz, Daunorubisin hidroklorür-Koyu mavi, Nalidiksik asit- Pembe, Eritromisin-Kırmızı, Vankomisin-Sarı, Amfoterisin B-Açık yeşil, Ortak sinyaller-Mavi

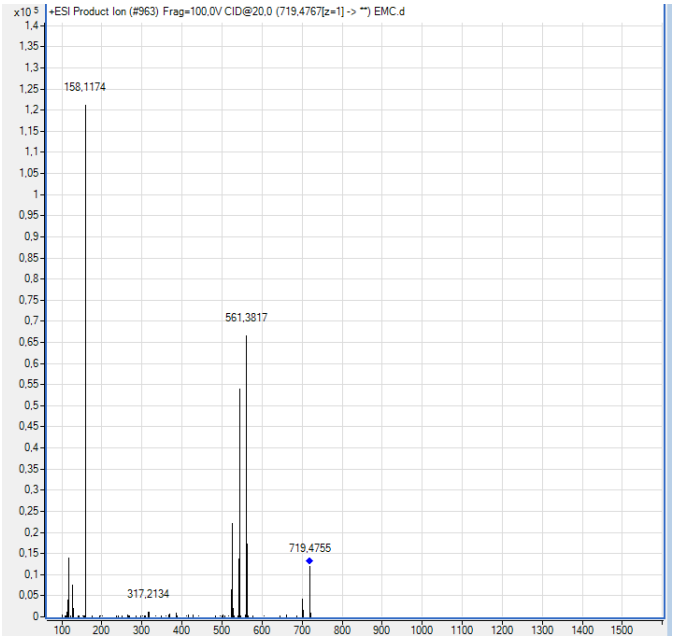
4.1.4. Glikogenomik çalışmalar

Bir doğal ürünün MS/MS ile elde edilen spesifik kütle fragmentasyon verileri incelenerek içerdiği muhtemel şeker ünitelerinin tespiti ve bu şekerlerin biyosentezinden sorumlu genlerin genomda bulunması temeline dayanan glikogenomik yaklaşım ile BA2 metabolitleri incelendi. Bazı spesifik iyonlar aynı şekerleri işaret edebilir. Bu durumda moleküler networking verileri önemli olmakta ve moleküllerin diğer kısımları olan aglikon bölgelerin arasındaki spektral benzerlik önem kazanmaktadır. Çalışmada kullanılan pozitif kontroller, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları ve aynı zamanda içerdikleri şeker üniteleri çizelge 4.8' de verilmiştir. Glikogenomik stratejisinin glikolize doğal ürün tespitinde çalıştığını test etmek için pozitif kontrollerimizden eritromisine ait 719.477 Da moleküler iyonu şeker sinyalleri açısından incelendi. Yapılan inceleme sonucunda bu öncül iyonda 158 B ve 157 Y sinyallerinin varlığı belirlendi (Şekil 4.9). Bu molekül ağırlığındaki B ve Y iyonlarına karşılık gelen spesifik şekerler ve bunların biyosentezinden sorumlu genler çizelge 4.9'de belirtilmektedir. Glikolize doğal ürünlerin gen kümesindeki şeker biyosentez genleri, ortak ve spesifik olarak sınıflandırılmaktadır (Kersten ve ark., 2011). Eritromisin, PKS-I biyosentetik sistemiyle sentezlenen ve D-desosamine şekeri içeren makrolid bir antibiyotiktir. Moleküler network çalışmaları ile ilgili sinyalin eritromisine ait olduğu, spesifik şeker sinyalleri (158 B ve 157 Y iyonları) sayesinde ise içerdiği şeker ünitesi tespit edildi. Bu şekerin biyosentezinden sorumlu ortak ve spesifik genler çizlgede görülmektedir. BA2 izolatı eritromisin üreticisi olmadığı için bu genler genomda herhangi bir gen kümesinde beraber bulunmamaktadır.

Çizelge 4.8. LC-MS/MS analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan bileşikler.

İsim	Şeker	Tip	Yapı
Daunorubisin	L-Daunosamine	Tip II PKS	 M.A=527,52 g/mol
Eritromisin	D- Desosamine Mycarose	Tip I PKS	 M.A = 733,93 g/mol
Vankomisin	Vancosamine	Tip III PKS	 M.A= 1449,265 g/mol
Amfoterisin B	Mycosamine	Tip I PKS	 M.A= 924,079 g/mol
Kanamisin	Paromamine Neamine		 M.A=484,449 g/mol

Nalidiksik asit	Şeker içermez	Kinolon	
Tetrasiklin	Şeker içermez	Tetrasiklin	



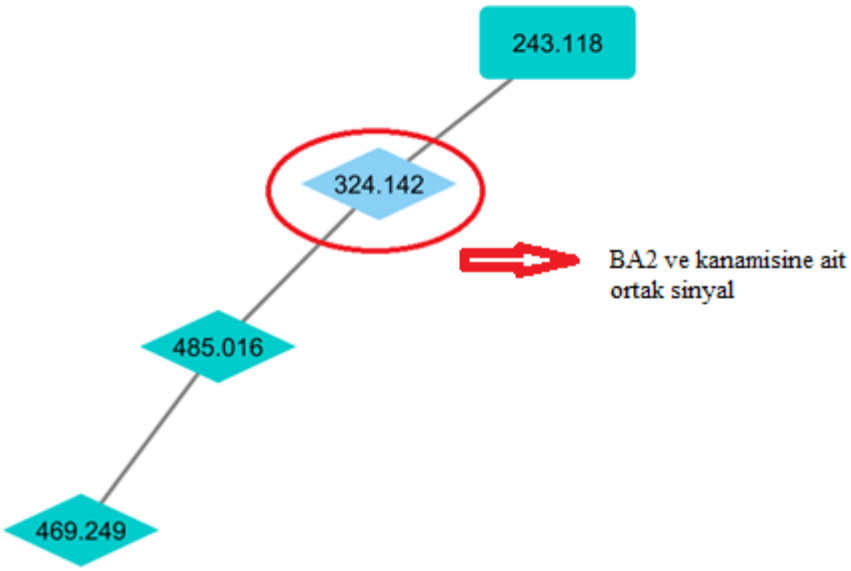
Şekil 4.9. Eritromisine ait 719.477 moleküler iyonun MS/MS spektrumu

Çizelge 4.9. Eritromisine ait 719.477 Da moleküler iyonunda tespit edilen B ve Y şeker iyonlarına karşılık gelen şeker ve bunun biyosentezinden sorumlu genler

Y iyonu (Da)	**B iyonu (Da)**	**Şeker**	**Ortak genler**	**Spesifik genler**
157	158	D-desosamine	NT, 4,6-DH	3,4-DH, 3-AmT, N,N-MT, oxDA

NT; nucleotidylyltransferase, DH; dehydratase, AmT; aminotransferase, N,N-MT; dimethyltransferase, oxDA; oxidative deaminase.

Streptomyces sp. BA2 izolatına ait moleküler networkdan alınan bir küme incelendiğinde (şekil 4.10) BA2 izolatı ve pozitif kontrol kanamisin ile ortak olarak üretilen 324.142 Da ağırlıklı moleküler iyonun MS/MS fragmentleri incelendi. Yapılan inceleme sonucunda bu iyonun 115 (B iyonu) ve 114 (Y iyonu) sinyallerine sahip olduğu belirlendi. MS/MS fragmentasyonlarında görülen spesifik B ve Y iyonlarının L-rhodinose şekerine ait olduğu bulundu. Bu şekerin biyosentezinden sorumlu genler çizelge 4.10'da detaylı olarak belirtilmiştir. İlgili genler BA2'nin genomunda tarandı. L-rhodinose şekeri bu çalışmada kullanılan pozitif kontrollerde bulunmamaktadır. Ancak hem ortak hem de spesifik biyosentez genleri 2. Kontigde 5 no'lu gen kümesinde bulunmaktadır (Şekil 4.11). Bu gen kümesindeki şeker biyosentez genleri lactonamycin şeker biyosentez genlerine çok benzerdir. BA2 genomunda bulunan 5 no'lu gen kümesi ile lactonamycin gen kümesindeki genler total olarak % 41 olup benzerlik çoğunlukla şeker biyosentez genlerinden ibarettir. Lactonamycin, L-rhodinose şekerine sahip, PKS-II/Butyrolactone biyosentetik sisteminin ürünü, antibakteriyal ve antitümör aktivitesi olan glikolize bir antibiyotiktir (Matsumato ve ark. 1999). İlgili sinyalin bu gen kümesinin ürünü olabilme ihtimali yüksektir. Bu küme, şimdiye kadar bulunan diğer gen kümeleri ile düşük benzerliğe sahip olduğu için L-rhodinose içeren yeni bir glikolize PKS-II gen kümesi olma ihtimali yüksektir.



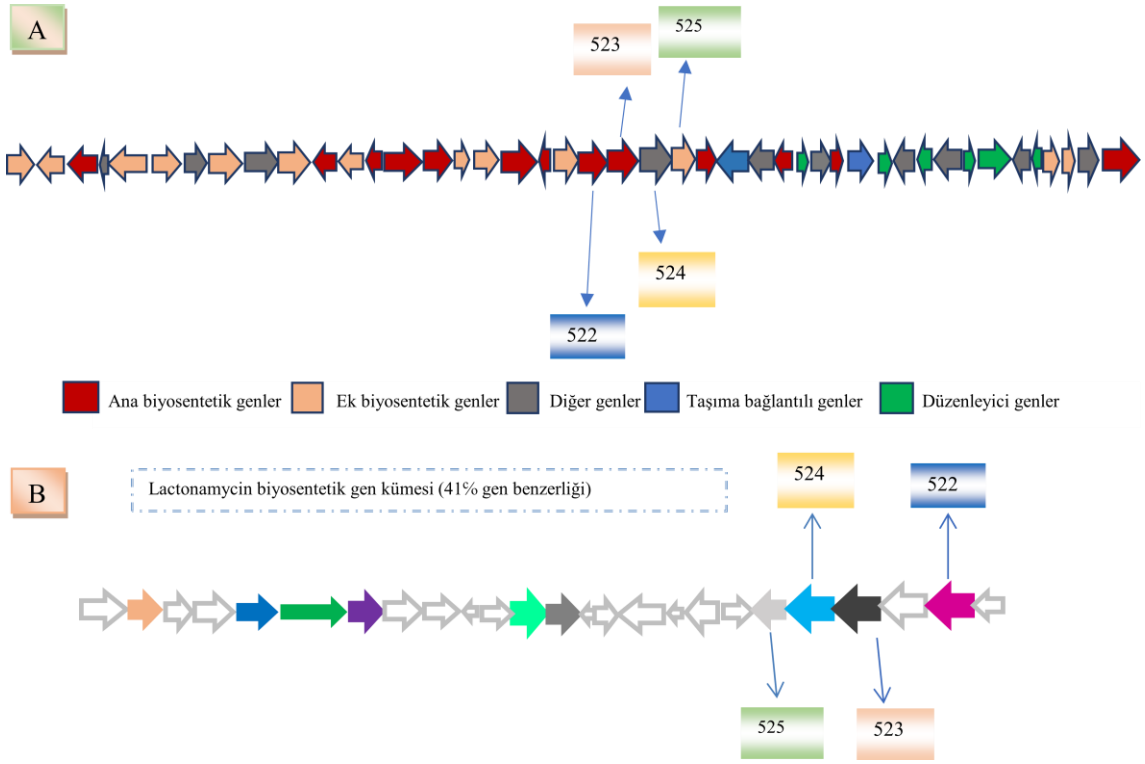
Şekil 4.10. 324.142 Da moleküler iyonun bulunduğu network kümesi

Çizelge 4.10. BA2 ve kanamisin ile ortak olarak üretilen 324. 142 moleküler iyonunun içerme ihtimali olan şeker ve bunun biyosentezinden sorumlu genler

Y iyonu (Da)	**B iyonu (Da)**	**Şeker**	**Ortak genler**	**Spesifik genler**
114	115	L-rhodinose	NT, 4,6-DH	2,3-DH, 3,4-DH, 3-KR, 4-KR, 3,5-E

NT; nucleotidylyltransferase, DH; dehydratase, KR; ketoductase, E; epimerase

Kanamisin, paromamine ve neamine şekerlerini içeren aminoglikozit bir antibiyotiktir. 324.142 Da'luk moleküler iyonun spektrumunda bu şekerlere ait B ve Y iyonu sinyallerine rastlanmamıştır. Bundan dolayı, BA2 tarafından üretilen bu metabolitin moleküler networkte kanamisin ile eşleşmesinin aglikon bölgelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Genomda kontig 1'de yer alan 65 no'lu gen kümesi kanamisin antibiyotiği ile %53 benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik incelendiğinde şeker biyosentezi dışında kalan genlerin kanamisin ile benzerlik göstermesi bu düşünceyi teyit etmektedir.



Şekil 4.11. (a) BA2 genomunda kontig 2 de yer alan 5 no'lu gen kümesi (b) En yakın benzerlik gösterdiği Lactonamycin gen kümesi. L-rhodinose şeker biyosentez genleri: 522; 4,6DH (dehyrogenase), 523; 3,4DH (dehydrogenase), 524; 2,3DH (dehydrogenase), 525; 3-KR (ketoredüktaz).

Network incelemelerimize göre BA2 metabolitleri arasında 460,268 Da'luk bir sinyalin pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotikler ile ilişkili olduğu belirlendi (Çizelge 4.11). Bu sinyalin MS/MS spektrumunda spesifik şeker sinyalleri incelendiği zaman L-daunosamine ilişkin 130 Da'luk spesifik sinyale rastlandı. Bu şeker, bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antrasiklin bir kemoterapik olan daunorubisin (daunomisin)'in yapısında yer alan bir şekerdir. Bunun biyosentezinde görev alan ortak ve spesifik genler çizelge 4.11'de görülmektedir. Daunorubisin PKS-II biyosentez mekanizmasıyla sentezlenen bir molekül olup kütlesi 527,52 g/mol'dür. Genom incelemelerimiz sonucunda henüz bu sinyale ilişkin bir gen kümesi bulamamış olmakla beraber bu konudaki taramalarımız devam etmektedir.

Çizelge 4.11. BA2 çizelgedeki pozitif kontrollerle ortak olarak üretilen 460.268 moleküler iyonunda tespit edilen şeker ve onların biyosentezinden sorumlu genler

Pozitif kontrol	**Sinyalin kütlesi (Da)**	**Y iyonu (Da)**	**B iyonu (Da)**	**Şeker**	**Ortak genler**	**Spesifik genler**
Tetrasiklin Nalidiksik Asit Vankomisin Kanamisin **Daunorubisin**	460,268	129	130	L-daunosamine	NT, 4,6-DH	2,3-DH, 4-KR, 3,5-E, 3-AmT

NT; nucleotidylyltransferase, DH; dehydratase, KR; ketoductase, E; epimerase, AmT; aminotranferase

Streptomyces sp. BA2'nin ürettiği başka bir metabolitin MS/MS sinyali 438,315 olup, bu sinyal içerisinde 157 Da Y iyonu ve 158 Da B iyonu tespit edildi (Çizelge 4.12). Bunlar, sinyalin networkte ilişki gösterdiği pozitif kontrollerimizden biri olan eritromisin antibiyotiğinin şekeri D-desosamine özgü kayma değerleridir. Eritromisin PKS-I sistemi tarafından sentezlenen bir makrolit antibiyotiktir. Genomda eritromisin gen kümesi olmadığı için diğer PKS-I biyosentetik gen kümeleri incelendi. Genomdaki PKS-I gen kümelerinden biri olan 1. Kontigteki 2 no'lu PKS-I kümesi galbonolide bileşiği ile benzerlik göstermektedir. Galbolonid de, eritromisin gibi 14 üyeli bir makrolid halkasına sahip, 5 metilmalonat, 1 asetat ve 1 propionat ünitesinin kondensasyonundan oluşmaktadır. Bu da dahil olmak üzere genomda bulunan PKS-I gen kümelerinde 2, 13, 9, 63 ve 73 ilgili şeker biyosentez genlerine rastlanmadığı için, ilgili sinyalin bu gen kümelerine ait bir bileşik olmadığı belirlendi. Dolayısıyla bu bileşiğin L-daunosamine şekeri içeren yeni bir bileşik olabileceği düşünüldü. Bu sinyalin hem aglikon bölgeler hem de şeker biyosentez genleri için genom taramaları devam etmektedir.

Çizelge 4.12. 438.135 moleküler iyonunda tespit edilen şeker ve onların biyosentezinden sorumlu genler.

Pozitif kontrol	**Sinyalin kütlesi (Da)**	**Y iyonu (Da)**	**B iyonu (Da)**	**Şeker**	**Ortak genler**	**Spesifik genler**
Kanamisin Daunorubisin **Eritromisin** Vankomisin Amfoterisin B	438,315	157	158	**D-desosamine**	NT, 4,6-DH	3,4-DH, 3-AmT, N,N-MT, oxDA

NT; nucleotidylyltransferase, DH; dehydratase, AmT; aminotransferase, N,N-MT; dimethyltransferase, oxDA; oxsidative deaminase

4.2 Tartışma

Çoklu dirençlilik gösteren patojenik bakterilerin ortaya çıkma sıklığındaki artış ilaç endüstrisinde daha rasyonel yaklaşımlar ve stratejiler için acil talep yaratmıştır. Yeni biyoaktif bileşiklerin bulunması, çeşitli patojenlerle mücadele etmek için antimikrobiyal özelliklere sahip yeni biyomoleküllere olan talebi karşılamaya çalışan ve bitmeyen bir süreçtir. Aktinomisetler, sekonder metabolitler için çok iyi kaynaklar olup biyoteknolojik olarak değerli bakterilerdir. Keşfedilen doğal antibiyotiklerin 2/3'ü aktinomisetler tarafından üretilmiştir. Çalışmamızda daha önce araştırma grubumuz tarafından moleküler teşhisi yapılmış *Streptomyces* izolatlarından en iyi biyosentetik kapasiteye sahip 6 izolat seçilmiştir. Bu izolatlar tarafımızca modifiye edilen üç farklı besiyerinde üretilip elde edilen metabolitler üç farklı çözücüde ekstrakte edilerek ilk etapta antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda 6 izolatımızın da GYM besiyeri ve etil asetat ekstraktında en iyi antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Çevresel değişimler, en önemlisi karbon, azot ve fosfat gibi besin kaynakları ve elbette iz elementlerin *Streptomyces*'larda biyoaktif metabolitlerin sentezini etkilediği bilinmektedir. Dolayısıyla çevresel (sıcaklık, pH, nem) ve besinsel (kültür ortamının bileşenleri) şartların optimal olması sekonder metabolit üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Besiyerlerinin mikroorganizmaların antimikrobiyal bileşik üretme kapasitelerinin üzerinde etkisinin olduğu bilinmektedir (Kumar ve ark. 2014). Kullandığımız GYM besi yerinin içerik olarak zengin olması ve karbon kaynağı olarak besiyerinde glukoz bulunması sekonder metabolit sentezini arttırmıştır. Benzer çalışmalarda karbon kaynağı olarak glukozun kullanılmasıyla en yüksek antimikrobiyal aktivite elde edildiği ileri sürülmüştür (Singh ve ark. 2009, Atta 2011). Buna karşın Thakur ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada maksimum büyüme ve antibiyotik üretimini karbon kaynağı olarak mannitol kullandıklarında elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Karbon kaynağı ile birlikte kullanılan azot kaynaklarının da antimikrobiyal aktivite üzerinde önemli derecede etkili olduğu bilinmektedir. Bu kaynakların basit veya kompleks yapılı olmaları ya da organik ve inorganik olma durumları antimikrobiyal aktivite üzerinde farklı etkiye sahip olabilirler. Yapılan bir çalışmada organik azot kaynaklarının inorganik kaynaklara göre daha verimli olduğu belirtilmektedir (Singh ve

ark. 2009). İzolatlarımızdan BS40 ve CAH29 GYM besiyeri ve etil asetat ekstraktlarında tüm test organizmalarına karşı geniş spektrumda antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Özellikle CAH29 izolatının GYM besiyeri ve etil asetat ekstraktlarında *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı >30 mm, TAS ve TKN besiyeri ektraklarında *S. aureus*'a karşı sırasıyla 23 ve 18 mm çapında inhibisyon etkisi göstermesi dikkat çekicidir. Bunun yanı sıra GYM besiyeri ve diklorometan ektraktlarında da *S. aureus* (26 mm) ve *C. albicans'*a (>30 mm) karşı önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. *S. lavendulocolor*'un üretmiş olduğu antimikrobiyal metabolitlerin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada izolata ait metabolitlerin *S. aureus'a* karşı 21 mm'lik bir zon oluşturduğu belirtilmektedir (Bindu ve ark. 2017). Diğer izolatlarımızdan CA17 TKN besiyeri ve etil asetat ekstraktlarında hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmalara karşı geniş spektrumda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlendi. Buna karşın BA2 izolatı her üç kültürün de etil asetat ekstraktlarında gram pozitif bakterilere karşı güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. GYM besiyeri ve diklorometan ekstraklarında ise Gram pozitif, Gram negatif ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yine AA50 izolatımınz GYM besiyeri ve diklorometan ektraktlarında *S. aureus* (18 mm) ve *B. subtilis*'e (24 mm) karşı güçlü bir şekilde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Benzer bir çalışmada *Streptomyces* izolatlarının *S. aureus* ve *B. subtilis'*e karşı sırasıyla 15 mm ve 17 mm çapında inhibisyon etkisi gösterdiği ifade edilmektedir (Viyajakumar ve ark. 2012). İzolatlarımız metanol ekstraktlarında Gram negatif bakterilere karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemişlerdir Ancak BA2 izolatımız GYM ve TAS besiyerlerinde gram pozitif bakterilere karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çözücü olarak etil asetatın kullanıldığı bazı çalışmalarda antimikrobiyal aktivitenin daha yüksek olduğu rapor edilmektedir (Awla ve ark. 2016, Vijayakumar ve ark. 2012, Ganesan ve ark. 2017). Yukarıda verilen karşılaştırmalarda görüldüğü gibi izolatlarımızın üretmiş olduğu biyoaktif metabolitlerin güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları ortaya çıkmıştır.

Antibiyotik keşif çalışmalarında uzun bir aradan sonra, 1990'lı yıllarda, doğal ürünler yeni ilaç adaylarının keşfiyle yeniden dikkatleri üzerine çekmiştir. Doğal ürün araştırmalarında yeni ilaç adaylarının bulunmasındaki düşüşün temel sebeplerinden biri dereplikasyon olayıdır. Araştırmaları önemli ölçüde sekteye uğratabilecek bu gibi

durumları aşmak için yeni metotlar geliştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan metabolomik çalışmalar bir organizmanın bütün metabolitlerini geniş kapsamlı bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Metabolom çalışmalarında kütle spektrometresi (MS) gün geçtikçe daha fazla kullanılmaktadır. Kütle spektrometresinin sıvı kromatogfi (LC), gaz kromatografi (GC) ve nüklear magnetik rezonans (NMR) gibi tekniklerle kombine olabilmesi doğal ürün araştırmalarında önemli kolaylıklar sağlamaktadır. Bununla birlikte LC-MS/MS verilerinin genom temelli yaklaşımlarla birlikte kullanılması popüleritesini daha da artırmaktadır. Yapılan tüm çalışmalarda elde edilen verilerin genom temelli biyoinformatik programlarla birlikte değerlendirmesine yönelik informatik programların geliştirilmesi bu konuda ilham verici olmuştur. Yeni geliştirilmiş ve sürekli kendini yenileyen biyoinformatik programlardan biri de GNPS veri tabanıdır. LC-MS/MS spektrumlarının kıyaslanması ve ilişkilerinin belirlenmesine dayalı GNPS veri tabanı, bilinen bileşiklerin ekstrakt halindeyken tespit edilmesi ve yeni bir bileşik olma potansiyeli taşıyan bileşikler hakkında ipucu vermesi açısından önemli bir yaklaşımdır. Yaptığımız çalışmada *Streptomyces* izolatlarına ait verilerin dereplikasyon analizleri GNPS veri tabanı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde izolatlarımıza ait veriler GNPS veri tabanındaki bilinen bileşiklerin 12 tanesiyle benzerlik gösterdi. İzolatlarımızdan *Streptomyces* sp. BA2 izolatının TAS besiyeri kullanıldığında Malyngamide K, TKN besi yeri kullanıldığında Bouillonamide B bileşiğini ürettiği tespit edildi. Bu bileşikleri bizim açımızdan önemli kılan bir diğer husus da her iki bileşiğin deniz siyanobakteriler tarafından sentezlendiği bilinen doğal ürünler olmasıdır. Malyngamidlerin birçok analoğunun bulunduğu ve bunların antikanser, antiinflamatör ve antimalaryal gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Jiang ve ve ark. 2018). Bouillonamidlerin ise sitotoksik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Tan ve ark. 2013). Yine deniz siyanobakterileri tarafından sentezlenen Kimbeamide A-C; izolatlarımızdan BS40, Hectochlorin ise AS41 tarafından üretildikleri tespit edildi. Bu metabolitler şimdiye kadar deniz siyanobakterilerinden rapor edilmiş olup, *Streptomyces* türleri tarafından üretimleri ilk kez rapor edilmiştir.

Mikroorganizmalar; özelikle *Streptomyces*'lar içerik olarak zengin besi yerlerinde sahip oldukları biyoaktif sekonder metabolit üretme potansiyellerinin tamamını veya büyük bir kısmını sergilemeyebilirler. Bu organizmalar bulundukları

ortamda herhangi bir tehdit unsuruyla karşılaşmadıkları zaman mevcut doğal ürün üretme potansiyellerini kullanma gereği duymayabilirler. Böyle üretimi yapılmayan genler kriptik olarak adlandırılmaktadır. Kriptik genlerin biyoaktif sekonder metabolit üretme potansiyelleri, farklı besiyerlerinde üretmek veya bulunduğu ortama tehdit unsuru olabilecek başka bir organizmanın eklenmesiyle açığa çıkarılabilir. Zira *Streptomyces*'lar sekonder metabolitlerini, farklılaşma, düzenleme, taşıma, haberleşme, savunma gibi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde etkin olarak kullanırlar. Nitekim çalışmamızda kullandığımız içerik olarak zengin GYM besiyeri ve minimal TAS ve TKN besiyerlerinde farklı bileşiklerin gözlenmesi bu durumu destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra farklı polariteye sahip çözücülerin kullanılması da farklı biyoaktif sekonder bileşiklerin elde edilmesiyle sonuçlanabilir. Örneğin; *Streptomyces* sp. CA17 izolatına ait GYM kültürü, etilasetat ile ekstrakte edildiğinde Enterocin, diklorometan ile ekstrakte edildiğinde Alteramide B bileşiğinin elde edilmesi bu yargıyı destekler niteliktedir.

Moleküler network analizi ile 6 izolat tarafından üretilen metabolitlerin hem birbirleriyle hem de bileşik kütüphanelerinde bulunan diğer bileşiklerle olan spektral benzerlikleri tespit edildi. Moleküler network oluşturulurken elde edilen 2001 kutucuğun (node) spesifik olarak en fazla BA2 (110) izolatı en az ise AS41 (24) izolatı tarafından üretildiği belirlendi. Geriye kalan 1530 kutucuğun ise; tüm *Streptomyces* izolatları, pozitif ve negatif kontroller tarafından ortak olarak üretildiği tespit edildi. Bu kutucukların çoğunun diğer kütüphanelerdeki mevcut bileşiklerle herhangi bir benzerliği görülmedi. İzolatlarımıza ait tanımlanmamış kutucukların fazla olması onların yeni biyoaktif sekonder metabolit üretme potansiyellerinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu konudaki GNPS moleküler network incelememiz devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada moleküler networking'in dereplikasyon stratejisi olarak kullanılması sonucunda 58 bileşiğin tespit edildiği belirtilmektedir (Yang ve ark. 2013). Başka bir çalışmada ise 35 *Salinispora* izolatına ait ekstraktların GNPS veri tabanı kullanılarak dereplikasyon analizlerinin yapılmasıyla bilinen bileşiklerin yanı sıra yeni bir bileşik olan Retimisin A bileşiğinin izolasyon ve idenfikasyounun yapıldığı belirtilmektedir (Duncan ve ark. 2015).

Yeni nesil genom sekanslama teknolojilerinin son yıllarda göstermiş olduğu gelişmelere paralel olarak doğal ürün araştırmalarının da pozitif yönde ivme kazandığı görülmektedir. Yeni teknolojik yöntemler sayesinde organizma genomlarının dizilenmesinde hem maliyet düşmüş hem de bu çalışmaların kısa sürede gerçekleşmesi araştırmacılara önemli avantajlar sağlamıştır. Bunun yanı sıra organizmaların biyoaktif doğal ürün üretme potansiyelleri açığa çıkarılmaktadır. Çalışmamızda bu teknolojilerden faydalanarak izolatlarımızdan *Streptomyces* sp. BA2'nin tüm genom projesini tamamladık. Bunun sonucunda izolatımızın genomunun 10.043.478 baz çiftinden oluştuğu ve GC (Guanin- Sitozin) oranının % 69.92 olduğu tespit edildi. Aktinomiset genomlarının GC oranlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Tüm genomu sekanslanan *S. autolyticus* genomunun 10.029.028 bp (baz çifti) den oluştuğu ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu 57 putatif gen kümesinin olduğu GC oranın ise % 71.19 olduğu rapor edilmektedir (Yin ve ark. 2017). Başka bir çalışmada tüm genomu sekanslanan *S. fulvissimus* genomunun 7.905.75 bp, GC oranının % 71.5 ve 32 putatif sekonder metabolit gen kümesine sahip olduğu belirtilmektedir (Myronovskyi ve ark. 2013). BA2 izolatının ise antiSMASH programı ile genomunun incelenmesi sonucu izolatın sekonder metabolit üretiminden sorumlu 99 putatif gen kümesine sahip olduğu belirlendi. Bu kümelerin birbirinden farklı yolaklar tarafından sentezlenmesi ve aktinomiset genomlarında bulunan diğer gen kümeleriyle düşük homoloji göstermesi yeni bileşikler sentezleme potansiyeli açısından anlamlıdır.

Glikozillenmiş doğal ürünlerin MS verilerinden yola çıkarak, tahmini şeker kayma değerleri ile mikrobiyal genomlardaki glikolizasyon genleri arasında bir ilişki kuran glikogenomik yaklaşım ile BA2 izolatının üretmiş olduğu metabolitler incelendi. BA2 izolatı ve pozitif kontrol kanamisin ile ortak olarak üretilen 324.142 Da ağırlıklı moleküler iyonun MS/MS fragmentleri incelendiğinde spesifik B ve Y iyonlarının L-rhodinose şekerine ait olduğu, bu şekerin biyosentez genlerinin 2. Kontigde 5 no'lu gen kümesinde bulunduğu ve bu genlerin lactonamycin şeker biyosentez genlerine olan benzerliği dikkat çekicidir. İlgili sinyalin bu gen kümesinin ürünü olabilme ihtimali vardır. Bu küme, şimdiye kadar bulunan diğer gen kümeleri ile düşük benzerliğe sahip olduğu için L-rhodinose içeren yeni bir glikolize PKS-II gen kümesi olduğu düşünülmektedir. Gen kümesinin ürününü kesin olarak ortaya koyabilmek için,

kümenin klonlanması, heterolog olarak ifade edilmesi ve ürettiği metabolitin yapı analizlerinin yapılması gelecek çalışmalarda planlanmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) *Streptomyces* izolatlarının farklı kültür ortamlarında üretilmesi ve ekstraktlarının farklı çözücü sistemleriyle ekstrakte edilmesi sonucunda sekonder metabolit açısından çeşitlilik gösterdiği tespit edildi.
2) Yapılan antimikrobiyal aktivite belirleme testleri sonucunda yüksek zon çapı ve geniş spektrum açısından en iyi antimikrobiyal aktivitenin tüm organizmalarda GYM besi yerinden elde edilen ekstraktlardan elde edildiği belirlendi.
3) Bu izolatlar arasında *Streptomyces* sp. CAH29 izolatının *C. albicans* ve *S. aureus* üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi (>30) gösterdiği tespit edildi.
4) *Streptomyces* izolatlarına ait MS/MS spektrumları GNPS programında incelenerek dereplikasyon analizleri yapıldı. Yapılan analizlerde *Streptomyces* izolatlarına ait MS/MS spektrumları GNPS veri tabanındaki bilinen bileşiklerin 12 tanesiyle benzerlik gösterdiği tespit edildi.
5) *Streptomyces* sp. BA2 izolatının genomunun 10.043.478 baz çiftinden oluştuğu ve GC (Guanin- Sitozin) oranının % 69.92 olduğu tespite edildi. antiSMASH programı ile genomunun incelenmesi sonucu izolatın sekonder metabolit üretiminden sorumlu 99 putatif gen kümesine sahip olduğu tespit edildi.
6) BA2 metabolitleri içerisinde L-rhodinose şekeri içeren ve genomda kontig 2'de 5 no'lu gen kümesi ile eşleşen bir gen kümesi bulundu. Şeker biyosentez genleri açısından lactonamycin genleriyle eşleşen bu gen kümesi, diğer biyosentez genleri açısından şimdiye kadar bulunmuş olan doğal ürün gen kümeleriyle düşük homolojiye sahip olup, yeni bir glikolize sekonder metabolitin varlığını işaret etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abdelfattah, M. S., Kaharel, M.K., Hitron, J. S., Baig, İ., Rohr, J. 2008. Moromycins A and B, İsolation and Structure Elucidation of C-glycosylangucycline-Type Antibiotics from *Streptomyces* sp. KY002. ***Journal of Natural Products***, 71(9): 1569-1573.

Acer, İ. 2011. Endemik Bitki Rizosferlerinden İzole Edilen Lokal Aktinomisetlerde Mikrobiyal Sekonder Metabolitlerin Sentezinden Sorumlu Genlerin Taranması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 14.

Adegboye, M.F., Babalola, O.O. 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. ***African Journal of Agricultural Research***, 7(15): 2255-2261.

Aigle, B., Lautru, S., Spiteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Pierre Leblond, P., Pernodet, J.L. 2013. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens.* ***J Ind Microbiol Biotechnol***, 41:251–263.

Anderson, A.S., Wellington, E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* related genera. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 51: 797–814.

Anzai,K., Ohno, M., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Tamura, T., Komaki, H., Miyadoh, S., Harayama, S., Ando, K. 2008. Taxonomic distribution of Streptomyces species capable of producing bioactive compounds among strains preserved at NITE/NBRC. ***Appl Microbiol Biotechnol***, 80:287–295.

Arita, M. 2009. What can metabolomics learn from genomics and proteomics. ***Current Opinion in Biotechnology***, 20:610–615.

Asolkar, R.N., Maskey, R.P., Helmke, E., Laatsch, H. 2002. Chalcomycin B, A New Macolide Antibiotic from the Marine Isolate Streptomyces sp. *B7064*, ***The Journal of Antibiotics***, 55: 893-898.

Atta, ,H. 2015. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. ***Jounal of Saudi Chemical Society***, 19, 12-22.

Awla, H.K., Kadir, J., Othman, R., Rashid, T.S., Mui-Yun Wong, M.Y. 2016. Bioactive Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Isolate UPMRS4 and Antifungal Activity against *Pyricularia oryzae.* ***American Journal of Plant Sciences***, 7, 1077-1085.

Bae, M., Chung, B., Oh, K.B., Shin, J., Oh, D.C. 2015. Hormaomycins B and C: New Antibiotic Cyclic Depsipeptides from a Marine Mudflat-Derived *Streptomyces sp*. ***Mar. Drugs***, 13: 5187-5200.

Bertin, M.J., Schwartz, S.L., Lee, J., Korobeynikov, A., Dorrestein, P.C., Gerwick, L. and Gerwick, W.H. 2014. Spongosine Production by a *Vibrio harveyi* Strain Associated with the Sponge *Tectitethya crypta*. ***Journal of Natural Products***, *78* : 493–499.

Bindu, H., Muvva, V., Munaganti, R.K., Naragani, K., Konda, S., Dorigondla, K.R. 2017. Production of Antimicrobial Metabolites by *Streptomyces lavendulocolor* VHB-9 Isolated from Granite Mines. ***Braz. Arch. Biol. Technol***, 60: 1-13.

Blin, K., Wolf, t., Chevrette, M.G., Lu, X., Schwalen, C.J., Kautsar, S.A., Duran, H.G.S., Santos, E.L.C., Kim, H.U., Nave, M., Dickschat, J.S., Douglas A. Mitchell, D.A., Shelest, E., Breitling, E., Takano, ,E., Sang Yup Lee, S.Y., Weber, T., Medema, M.H. 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. ***Nucleic Acids Research***, vol,45.

Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. 2007. Isolation and Partial Characterization of Pigment-like Antibiotics Produced by a New Strain of *Streptosporangium* İsolated from an Algerian Soil. ***Journal of Applied Microbilogy,*** 103(1):228-36.

Bouslimani, A., Sanchez, L.M., Neha Garg, N., Dorrestein, P.C. 2014. Mass spectrometry of Natural Products: Current, Emerging and Future Technologies. ***Nat Prod Rep.,*** 31(6): 718–729.

Brennan, L. 2013. Metabolomics in nutrition research: current statusand perspectives. ***Biochem. Soc. Trans***, 41: 670–673.

Bruntner, C., Binder, T., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A.T., Potterat, O., Puder, C., Hörer, S., Schmid, A., Bolek, W., Wagner, K., Mihm, G., Fiedler, H.P. 2005. Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by *Streptomyces griseus* ***Strain from Antarctica. J Antibiot***, 58(5):346-9.

Cacho, R.A., Tang, Y., Choi, Y. 2015. Next generation sequencing approach for connecting secondary metabolites to biosynthetic gene cluster in fungi. ***Frontiers in Microbiology***, 5: 1-16.

Chiang, Y.M., Chang, S.L., Oakley, B.R.,Wang, C.C. 2011. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. ***Current Opinion in Chemical Biology***, 15:137–143.

Choi, S.S., Kim, H.J., Lee, H.S., Kim, P., Kim, E.S. 2015. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening. ***Process Biochemistry***, 50:1184–1193.

Cimermancic,P., Medema,M.H., Claesen,J., Kurita,K., Wieland Brown,L.C., Mavrommatis,K., Pati,A., Godfrey,P.A., Koehrsen,M., Clardy, J., Birren, B.W., Takano, E., Sali, A., Linington, R.G., Fischbach, M.A. 2014. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. ***Cell***, 158, 412–421.

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

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. ***Biochimica et Biophysica Acta*** 1830, 3670–3695.

Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterisation of *Actinomycetes* antagonists of a fungal root pathogen. ***Applied and Enviromental Microbiology***, 59: 3899-3905.

Crevelin, E.J., Crotti, A.E.M., Tiago D. Zucchi, T.D., Itamar S. Melob, I.S., Moraesa, L.A.B. 2014. Dereplication of Streptomyces sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accuratemass electrospray tandem mass spectrometry. ***J. Mass Spectrom***, 49: 1117–1126.

Crüsemann, M., O'Neill, E., Larson, C., Melnik, A., Floros, D., Silva, R., Jensen, P., Dorrestein, P. and Moore, B. 2016. Prioritizing Natural Product Diversity in a Collection of 146 Bacterial Strains Based on Growth and Extraction Protocols. ***J. Nat. Prod.*** 80: 588−597.

Demain, A. 1998. Induction of microbial secondary metabolism**.** ***Internatl Mıcrobıol***, 1:259–264.

Demirev, P., Fenselau, C. 2008. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. ***Annu. Rev. Anal. Chem***, 1:71–93.

Desanti, C.L. 2000. The Molecular Biology Of The *Streptomyces Snp* Locus. PhD thesis, Department of Microbiology, Ohio, 1-282.

Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. and Pauglia, A.M. 2002. Microbial Technologies for Discovery of Novel Bioactive Metabolites. ***Journal of Biotechnology***, 99 :187- 198.

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

Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Rebai, I.K., Fguria, L.F.B., Shaaban, K.A., Laatsch, H.2010. Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. ***Applied Biochemistry Biotechnology***, 162, 579-593.

Escribano, J.P.G. Alt, S., Bibb, M. 2016. Next Generation Sequencing of Actinobacteria for the Discovery of Novel Natural Products. ***Marin Drug***, 14,78.

Escribano, J.P.G., Bibb, M.J. 2014. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. ***J Ind Microbiol Biotechnol***, 41:425–431.

Ganesan, P., Reegan, A.D., David, R., Gandhi, M.R., Paulraj, M.G., Al-Dhabi, N.A., Ignacimuthu, S. 2016. Antimikrobiyal activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. 2016. ***Alexandria Journal of Medicine***, 101-110.

Gloaguen, Y. 2017. Supporting Analysis, Visualısation and Biological Interpretation of Metabolomics Datasets. PhD. Thesis, Instıtute Of Infection, Immunity and Inflammation College of Medical, Veterinary and Life Scıences University of Glasgow. 1-160.

Gollmck, F., França, S.Z.C., Lohmann, S. 2002. New and Bioactive Compounds from Streptomyces Strains Residing in the Wood of Celastraceae. ***Planta***, 216: 162-167.

Hasani, A., Kariminik, A. and Issazadeh, K. 2014. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. **Int J Adv Biol Biom Res**. 2(1):63-75.

Hopwood, DA. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. ***Annu Rev Genet.,*** 40: 1–23.

Hossain, S.M., Hossain, A.M., Rahman, M.M., Mondol, M.A.M., Bhuiyan ,M.S.A. 2004. Amides from the *Streptomyces hygroscopicus* and Their Antimicrobial Activity. ***Phytochemistry***, 65: 2147-2151.

Huang, T., Wang Y., Yin J., Du Y., Tao M., Xu J., Chen W., Lin S., Deng, Z. 2011. Identification and Characterization of the Pyridomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517. ***The Journal of Biological Chemistry***, 286: 20648-20657.

Iftime, D., Kulik, A., Härtner, T., Rohrer, S., Niedermeyer, T.H.J., Evi Stegmann, E., Weber, T., Wohlleben, W. 2016. Identification and activation of novel biosynthetic gene clusters by genome mining in the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tü 365. ***J Ind Microbiol Biotechnol***, 43:277–291.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis.* ***Nat Biotechno***l.,21(5):526-31.

Jensen, P.R. 2016. Natural products and the gene cluster revolution. ***Trends Microbiol,*** 24(12): 968–977.

Jiang, W., Zhou,W., Othman,R., Uchida, H., Watanabe, R., Suzuki, T., Sakamoto, B., Hiroshi Nagai, H. 2018. A new malyngamide from the marine cyanobacterium *Moorea producens.* ***Natural Product Research***, 32, 97-104.

Kallio, P. 2008. Type II Aromatic Polyketide Biosynthetic Tailoring Enzymes: Diversity and Adaptation In *Streptomyces* Secondary Metabolism. PhD. thesis, Department of Biochemistry and Food Chemistry University of Turku, Turku. 1-57.

Katz, L., Baltz, R. 2016. Natural product discovery: past, present and future. ***J Ind Microbiol Biotechnol***, 43:155–176.

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

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

Kumar, P.S., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S. 2014. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. ***Kaohsiung Journal of Medical Sciencesi***, 30, 435-446.

Lee, J.Y., Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. ***Can. J. Microbiol***, 48: 407–417.

Lei, X., Zhanga, C., Jianga, Z., Li, X., Shia, Y., Liub, M. Xiea, Y., Wanga, L. and Bin Honga, B. 2017. Complete genome sequence of *Amycolatopsis orientalis* CPCC200066, the producer of norvancomycin. ***Journal of Biotechnology***, 247: 6–10.

Li, L., Jiang, W., Lu, Y. 2017. New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. ***Biotechnology Advances*** , 35 : 936–949.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. Comparison of next generation sequencing systems. ***Journal of Biomedicine and Biotechnology,*** 1-11.

Liu, W.T., Lamsa, A., Wong, W.R., Boudreau, P.D., Kersten, R., Peng, Y., Moree, W.J., Duggan, B.M., Bradley S. Moore, B.S., William H. Gerwick, W.H., Linington, R.G., Kit Pogliano, K., Dorrestein, P.C. 2014. MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus.* ***J Antibiot*** 67(1): 99–104.

Luo, Y., Ryan E Cobb, R.E., Zhao, H. 2014. Recent advances in natural product discovery. ***Current Opinion in Biotechnology***, 30:230–237.

Matsumatu, N., Tsuchida, T., Nakamura, H., Sawa, R., Takahashi, Y., Naganawa, H., Inuma, H., Sawa, T., Takeuchi, T. 1999. Lactonamycin, a New Antimicrobial Antibiotic Produced by Streptomyces vishiviensis MJ773-88K4. ***The Journal of Antibiotics,*** 52: 276-280.

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

Mori, S. 2015. Biosynthesis and Cellular Actions Of Bioactive Natural Products. PhD thesis, Texas A&M University, United States, 1-193.

Myronovskyi, M., B. Tokovenko, B., Manderscheid, N., Petzke, L., Luzhetskyy, A. 2013. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. ***Journal of Biotechnology*** 168 : 117– 118.

Ni, Y. 2014. Data Analysıs Workflow For Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics Studies. PhD. thesis, The University of North Carolina Departman of Bioinformatics and Computational Biology, Charlotte, 1-120.

Palazzotto, E., Weber, T. 2018. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. ***Current Opinion in Microbiology***, 45:109–116.

Pham, L.H., Vater, J., Rotard, W., Mügge, C. 2005. Identification of Secondary Metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TU¨ 22 by Means of *on-Flow* LC–NMR and LC–DAD–MS. ***Magn. Reson. Chem***., 43: 710–723.

Prieto,C.C., Salcedo, R.G., Hidalgo, M.S., Brana, A.F., Fiedler, H.P., Carmen Mendez, C., Jos¦ A. Salas, J.A., Olano, C. 2015. Genome Mining of *Streptomyces* sp. Tì 6176: Characterization of the Nataxazole Biosynthesis Pathway. ***ChemBioChem***, 16: 1461 – 1473.

Pullen, C., Schmitz, P., Daniel, K.M., Groth, I., Leister, E., Grafe, U., Rao, M., Wei, W., Ge, M., Chen, D., Sheng, X. 2013. A New Antibacterial Lipopeptide Found by UPLC-MS from an Actinomycete *Streptomyces* sp. HCCB10043. ***Natural Product Research***. Vol. 27, No. 23, 2190–219.

Rebets, Y., Brötz, E., Tokovenko, B., Luzhetskyy, A. 2013. Actninomycetes Biosynthetic Potential: How to Bridge in Silico and in Vivo. ***J Ind Microbiol Biotechnol***, 41:387-402.

Reher, R., Kuschak, M., Heycke, N., Annala, S., Kehraus, S., Dai, H.F., Müller, C.E., Kostenis, E., König, G.M., Crüsemann, M. 2018. Applying Molecular Networking for the Detection of Natural Sources and Analogues of the Selective Gq Protein Inhibitor FR900359. ***J. Nat. Prod***, *81* (7),:1628–1635.

Ren, H., Wang, B., Zhao, H. 2017. Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. ***Current Opinion in Biotechnology***, 48:21–27.

Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., Hutchings, M.I. 2012. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme. ***FEMS Microbiol Rev***, 36 : 862–876.

Shah, A. M., Rehman, S., Hussain, A., Mushtaq, S., Rather, M.A., Shah, A., Ahmad, Z., Khan, I.A., Bhat, K.A., Hassan, Q.P. 2017. Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. ***Microbial Pathogenesis***, 110 : 93-99.

Sharma, M., Dangi, P., Choudhary, M. 2014. Actinomycetes: Source, identification and their applications. ***Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci***, 3(2): 801-832.

Shendure, J., Ji, H. 2008. Next generation DNA sequencing. ***Nature biotechnology***, 26: 1135-1145.

Shiomi, K., Hatae, K., Hatano, H., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Jiang, C., Tomoda, H., Kobayashi, S., Tanaka, H. and Omura, S. 2005. A New Antibiotic, Antimycin A9, Produced by *Streptomyces sp.* K01-0031. ***The Journal of Antibiotics***, 58: 74–78.

Singh, L.S., Mazumder, S., Bora, T.C. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, Streptomyces tanashiensis strain A2D. ***Journal de Mycologie Médicale***, 19, 225—233.

Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., Rajnisz, A. 2012. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. ***Cent. Eur. J. Biol***, 7(3): 373-390.

Subramani, R., Aalbersberg, W. 2013. Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery. ***Appl Microbiol Biotechno***l, 97:9291–9321.

Tan, L.T., Okino, T., Gerwick, W. 2013. Bouillonamide: A Mixed Polyketide–Peptide Cytotoxin from the Marine Cyanobacterium *Moorea bouillonii. Mar.* ***Drugs***, 11, 3015-3024.

Thakur, D., Bora, T.C., Bordoloi, G.N., Mazumdar, S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by Streptomyces sp. 201. ***Journal de Mycologie Médicale***, 19, 161—167.

Thibessard, A., Haas, D., Gerbaud, C., Aiglea, B., Lautru, S., Pernodet, J. and Leblond, P. 2015. Complete genome sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, the spiramycin producer. ***Journal of Biotechnology***, 214 : 117–118.

Tsugawa, H., Kind, T., Nakabayashi, R., Yukihira, D., Tanaka, W., Cajka, T., Kazuki Saito, K., Fiehn, O., Arita, M. 2016. Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. ***Analytical Chemistry***, 1-35.

Vijayakumar, R. Selvam, K.P., Muthukumar, C., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., Saravanamuthu, R. 2012. Antimicrobial potentiality of a halophilic strain of Streptomyces sp. VPTSA18 isolated from the saltpan environment of Vedaranyam, India. ***Ann Microbiol***, 62:1039–1047.

Vinayavekhin, N. 2012. Metabolomics Strategies for Discovery of Biologically Active or Novel Metabolites. PhD. thesis, Harvard University, Department of Chemistry and Chemical Biology, Massachusetts, 1-191.

Wang, H., Li, C., Zhang, B., He, H., Jin, P., Wang, J., Zhang, J., Wang X., Xiang, W. 2015. Complete genome sequence of Streptomyces cyaneogriseus ssp. noncyanogenus, the thermotolerant producer of commercial antibiotics nemadectin. ***Journal of Biotechnology***, 204:1–2.

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Porto, C. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. ***Nature biotechnology***, *34*(8), 828.

Wang, Y., Chen, Y., Shen, Q., Xihou Yin, X. 2011. Molecular cloning and identification of the laspartomycin biosynthetic gene cluster from Streptomyces viridochromogenes. ***Gene***, 483:11-21.

Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. ***Journal of Biotechnology***, 106 : 221–232.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Hyun Uk Kim, H., Bruccoleri, R., Lee, S.Y., Fischbach, M.A. Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Eriko Takano, E., Marnix H. Medema, M.H. 2015. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. ***Nucleic Acids Research***, 43, 237-243.

Wu, C., Du, C., Ichinose, K., Hae Choi, Y., Gilles P. van Wezel. 2017. Discovery of C-Glycosylpyranonaphthoquinones in Streptomyces sp. MBT76 by a Combined NMR-Based Metabolomics and Bioinformatics Workflow. ***J. Nat. Prod***. 80, 269−277.

Xia, J. 2011. Developing bioinformatics tools for metabolomics. PhD. thesis, University of Alberta Department of Biological Sciences, Alberta, 1-230.

Yang, J., Sanchez, L., Rath, C., Liu, X., Boudreau, P., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., Felicio, R., Amanda Fenner, A., Wong, W., Linington, R., Zhang, L., Debonsi, H., Gerwick, W. and C. Dorrestein, P. 2013. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. ***Nat. Prod***. 76:1686−1699.

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

Yin, M., Jiang, M., Renc, Z., Yilong Dong, Y., Lu, T. 2017. The complete genome sequence of *Streptomyces autolyticus* CGMCC 0516, the producer of geldanamycin, autolytimycin, reblastatin and elaiophylin. ***Journal of Biothechnology***, 252: 27-31.

Zhou, Z., Xu, Q., Bu, Q., Guo, Y., Liu, S., Liu, Y., Du, Y., Li, Y. 2015. Genome Mining-Directed Activation of a Silent Angucycline Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces chattanoogensis.* ***ChemBioChem***, 16: 496 – 502.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	**:**	Ekrem KUM
Doğum Tarihi:		01.04.1981
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri	**:**	Iğdır
Medeni Hali	**:**	Bekâr
Adres	**:**	Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 21280 Diyarbakır
E-Mail	**:**	ekremekolojist@mail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Eylül 1987-Haziran 2002
İlkokul öğrenimimi Evci Köyü İlkokulunda, Ortaokulu Hürriyet İlköğretim Okulunda ve Lise Eğitimimi Iğdır Anadolu Lisesinde tamamladım.

Eylül 2004-Temmuz 2010
Harran Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü bitirdim.

Şubat 2011-Şubat 2013
Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyolji Anabilim Dalında "**Hayat Hikayesi Kuramı Kapsamında Adıyaman *Drosophila melanogaster* Meig. Yabanıl Tipinin Poligenik Fekondite, Ömür Uzunluğu, Mortalite ve Uyum Karakterlerinin *Araştırılması***" adlı yüksek lisans tezini Yrd. Doç. Dr. Oya Betül Sarı danışmanlığında bitirdim.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Ekrem KUM
ÖĞRENCİ NO	13801512
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☒ Güz ☐ Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	Karasal Aktinomisetlerde Yeni İlaç Adaylarının Kimyasal ve Genomik Olarak Taranması
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	86
BENZERLİK ORANI	% 21
RAPORLAMA TARİHİ	18./02/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 86 sayfalık kısmına ilişkin, 18/02/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 21 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(Öğrencinin Adı Soyadı)

Ekrem KUM

Prof. Dr. Ebru İnce BOSTANCI
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yüksel COŞKUN
Anabilim Dalı Başkanı
25 Şubat 2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.