T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKTİNOMİSET GENOMLARINDA YENİ GLİKOPEPTİD BİLEŞİKLERİN GENETİK OLARAK TARANMASI

Mehmet Ali ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Aralık 2018

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Mehmet Ali ÖZCAN tarafından yapılan "**AKTİNOMİSET GENOMLARINDA YENİ GLİKOPEPTİD BİLEŞİKLERİN GENETİK OLARAK TARANMASI** " konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI

Üye : Prof. Dr. Veysel TOLAN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 18/01/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

..../..../20

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, iki yıl boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI' ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarımda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım sevgili Ekrem KUM ve sevgili Merve YAVUZ' a sonsuz teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan her türlü desteklerini esirgemeyen canım aileme ve sevgili dostum Emine GÜZEL'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışmaya FEN.17.034 no'lu projeye maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP) teşekkür ederim.

Aralık 2018

Mehmet Ali ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR…….. I

İÇİNDEKİLER……. II

ÖZET……. V

ABSTRACT…….. VII

ÇİZELGE LİSTESİ……. IX

ŞEKİL LİSTESİ…… X

KISALTMA VE SİMGELER……. XII

1. GİRİŞ……. 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ…… 7

2.1. Genel Bilgiler……. 7

2.1.1. Aktinomisetler…… 7

2.1.2. *Streptomyces* Türlerinin Genel Özellikleri……. 8

2.1.3. *Streptomyces* Türleri Tarafından Sentezlenen Doğal Ürünler…… 8

2.1.4. Sekonder Metabolitler…….. 9

2.1.5. Doğal Ürün Biyosentezi..... 10

2.1.5.1 Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)…….. 12

2.1.6. Glikopeptid Antibiyotikler (GPA)…….. 13

2.1.6.1. GPA Biyosentezi…… 15

2.1.7. Antibiyotik Dirençliliği…….. 19

2.1.8. Yeni Antibiyotiklerin Tarama Yöntemleri…… 21

2.2. Önceki Çalışmalar…….. 22

3. MATERYAL VE METOT…….. 25

3.1. Materyal…….. 25

3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller…… 25

3.1.2.	Kimyasal Maddeler……...	25
3.1.2.1.	Antibiyotikler……	25
3.1.2.2.	DNA'ların Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar……..	26
3.1.2.3.	Besiyerleri İçin Kullanılan Kimyasallar……...	26
3.1.2.4.	Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar……	26
3.1.2.5.	Diğer Kimyasallar…….	26
3.1.3.	Besiyerleri…….	26
3.1.4.	Çözeltiler……..	27
3.1.5.	Enzimler……	28
3.1.6.	Primerler……...	28
3.1.7.	Bu Çalışmada Kullanılan Kitler……...	28
3.1.8.	Bu Çalışmada Kullanılan Cihazlar……...	29
3.2.	Metot……	29
3.2.1.	Organizmaların Vankomisinli Ortamda Üretilmesi…….	29
3.2.2.	Dirençli İzolatların Kromozomal DNA İzolasyonu…….	30
3.2.3.	PCR Amplifikasyonu……	30
3.2.4.	DNA'ların Görüntülenmesi……..	30
3.2.5.	Pütatif Monooksijenaz Genlerinin Jelden Ekstraksiyonu	31
3.2.6.	*E. coli* DH5-α İzolatının Transformasyon İçin Hazırlanması……..	31
3.2.7.	Pütatif Monooksijenaz Geninin Transformasyonu	31
3.2.8.	DNA Dizilieme…….	32
3.2.9.	Pütatif Monooksijenaz dizilerinin NCBI ve MEGA programlarındaki analizleri……..	32
4.	**BULGULAR VE TARTIŞMA…….**	**33**
4.1.	Bulgular……	33

4.1.1. Dirençli Organizmaların Üretilmesi……... 33

4.1.2. Kromozomal DNA izolasyonu ……. 33

4.1.3. Monooksijenaz Geninin Dirençli İzolatların Genomlarında Taranması …… 34

4.1.4. Pütatif Monooksijenaz Genlerinin Jelden Geri Alınması …… 36

4.1.5. Pütatif Monooksijenaz Genlerinin T-Vektörlere Klonlanması 36

4.1.6. Biyoinformatik İncelemeler ……. 36

4.1.7. Elde Edilen DNA Dizilerinin Filogenetik İncelenmesi 37

4.2. Tartışma……. 38

5. SONUÇ VE ÖNERİLER……. 43

6. KAYNAKLAR……. 45

ÖZGEÇMİŞ …….. 62

ÖZET

AKTİNOMİSET GENOMLARINDA YENİ GLİKOPEPTİD BİLEŞİKLERİN GENETİK OLARAK TARANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Ali ÖZCAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Aktinomisetler başta olmak üzere mikroplardan elde edilen doğal ürünler, β-laktamlar, tetrasiklinler, makrolitler, aminoglikozitler, rifamisinler ve glikopeptidler gibi önemli antimikrobiyal ilaç çeşitlerinin kaynağı olmuştur. Yeni antibiyotik keşif çalışmaları yüksek üretim kapasitesine sahip organizmalardan kimyasal ve genetik tarama teknikleri kullanılarak yapılmaktadır. Bunlar içerisinde en güncel metotlardan biri mikroorganizmaların genomlarında yer alan antibiyotik biyosentetik gen kümelerine ait korunmuş genlerin taranmasıdır. Glikopeptid antibiyotikler (GPA), Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde uzun süredir ilaç olarak kullanılan ve sadece aktinomisetlerden elde edilen nadir doğal ürünlerdir. Biyosentezleri sırasında; glikozilasyon, halojenasyon, metilasyon gibi modifikasyonlar bu antibiyotik sınıfının kimyasal çeşitliliğinde ve aktivitelerinde önemli rollere sahiptir. Aromatik yan grupların çarpraz bağlanmasından sorumlu monoksijenaz genleri, glikopeptid biyosentezinde görülen bir diğer önemli modifikasyondur. Bu çalışmada, GPA biyosentezinde görev alan monooksijenaz genlerinden *oxy*C geni, 8 farklı rizosferik *Streptomyces* izolatında dejenere primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile tarandı. Elde edilen

amplikon dizileri NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, ABD) veri tabanında Blastx programında homoloji incelemelerine tabi tutuldu. Daha sonra bu MEGA 6.0 programı kullanılarak filogenetik analizleri yapıldı. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen monooksijenaz genlerinin gerek GPA gerekse diğer antibiyotik gen kümelerinde bulunan diğer monooksijenazlarla yakın ilişkili olduğu gözlendi. Elde edilen genlerden CA19, CA17, AS36, CA18 ve CS38 izolatlarına ait olanların, *Streptomyces lavendulae*'ya ait komplestatin gen kümesinde bulunan genlerin homoloğu olan, sırasıyla oxyA ve oxyB genleri ile yakın akraba oldukları görüldü. Bu çalışmada elde edilen genlerin tipik GPA bileşiklerinin biyosentezleri ile ilişkili fakat filogenetik olarak ayrı konumlanması, kullanılan izolatların yeni olmaya aday GPA bileşikleri üretebilme potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, Glikopeptid antibiyotikleri, Genetik tarama, Monooksijenaz genleri, oxyC

ABSTRACT

SCREENING OF NOVEL GLYCOPEPTIDE COMPOUNDS IN ACTINOMYCETES GENOMES BY USING GENETIC TOOLS

MASTER THESIS

Mehmet Ali ÖZCAN

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

2019

Microbial natural products, from actinomycetes in particular, have been the sources of the most important antimicrobial drug classes, including the β-lactams, tetracyclines, macrolides, aminoglycosides, rifamycins and glycopeptides. The discovery of new antibiotics has been accomplished by chemically or genetically screening methods from organisms that have potential for production. One of the most current methods used in novel antibiotic screening studies is to search the conserved biosynthetic genes in the antibiotic biosynthetic gene clusters of microorganisms.

Glycopeptide antibiotics (GPA) are natural products from the actinomycetes have long served as drugs of last resort for the treatment of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial infections. The chemical diversity of the GPA class is achieved through glycosylation, halogenation, methylation, and acylation of the core. These modifications are improved the solubility, stability and activity of the molecule. Cross-

linking of aromatic side chains by monooxygenases is another necessary modification in GPA biosynthesis. In order to assess the presence of the GPA biosynthetic systems in 8 local *Streptomyces* strains, it was used the degenerate primers for amplification of a monooxygenase gene, *oxy*C. PCR products were cloned and sequenced. Translated protein sequences were compared with those in databases through the NCBI (National Center for Biotechnology Information, US) using BLASTx program. Sequences were aligned using multiple sequence alignment tools from Clustal W in MEGA 6.0 package. According to the bioinformatic analysis, different monooxygenase genes belong to both glycopeptide or other antibiotics were determined. The phylogenetic analysis showed that the genes obtained in this study were most closely related to *oxy*A (CA19, CA17, AS36 and CA18) and *oxy*B (CS38) genes of the GPA complestatin from *Streptomyces lavendulae*. The *Streptomyces* isolates used in this study are promising candidates to look for novel GPA and other natural products.

Keywords: *Streptomyces*, glycopeptide antibiotics, genetic screening, monooxygenase genes, oxyC

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Aktinomisetler tarafından üretilen bazı biyoaktif ajanlar	3
Çizelge 2.1..	Glikopeptid bileşikleri üreten izolatların biyosentez gen kümeleri	18
Çizelge 3.1.	Biyolojik materyal olarak kullanılan *Streptomyces* izolatları	25
Çizelge 3.2.	Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	30
Çizelge 4.1.	Vankomisine dirençli izolatların belirlenmesi	33
Çizelge 4.2.	Pütatif P450 monooksijenaz genlerinin Blastx sonuçları	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	Doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşikler	1
Şekil 2.1.	Mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolit oranları	7
Şekil 2.2.	*Streptomyces* tarafından üretilen çeşitli ilaçlar	9
Şekil 2.3.	Günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan NRP bileşikleri	11
Şekil 2.4.	Klinik uygulamalarda kullanılan PK bileşikleri	12
Şekil 2.5.	NRPS enzim sisteminin şematik gösterimi	14
Şekil 2.6.	Vankomisinin etki mekanizması	15
Şekil 2.7.	Doğal olarak oluşan glikopeptid antibiyotikler	16
Şekil 2.8.	NRPS üzerinde vankomisin biyosentezinin şematik gösterimi	17
Şekil 2.9.	Pekiskomisin biyosentez gen kümesi	18
Şekil 2.10.	Monooksijenaz enzimlerinin GPA aglikonlarında oluşturduğu bağlantılar	20
Şekil 2.11.	Doğal ürünlerin keşfinde kullanılan tarama yöntemleri	22
Şekil 3.1.	pGEM-T Easy vektör haritası	29
Şekil 4.1.	İzole edilen kromozomal DNA'lar	34
Şekil 4.2.	PCR sonucunda izolatlardan elde edilen pütatif monooksijenaz genleri	34

Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. AS36'dan elde edilen pütatif monooksijenaz genleri 35

Şekil 4.4. PCR sonucu elde edilen ürünler 35

Şekil 4.5. PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu 36

Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. CA19 izolatına ait rekombinant plazmitler 36

Şekil 4.7. Pütatif monooksijenaz genlerinin filogenetik analizi 38

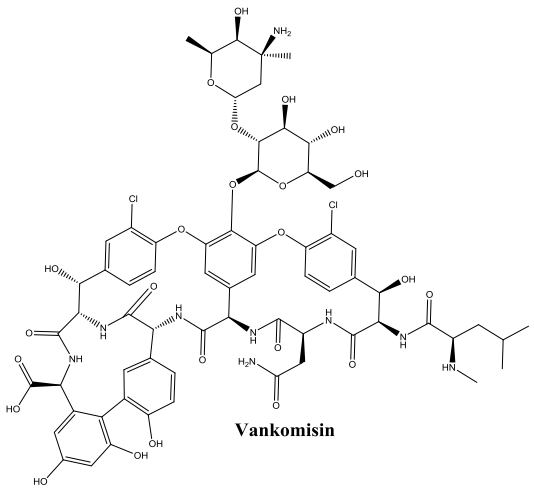
KISALTMA VE SİMGELER

A	: Adenilasyon
ACP	: Açil Taşıyıcı Protein
AT	: Açiltransferaz
Bal	: Balhimisin
BFB	: Brom fenol blue
BGC	: Biyosentez Gen Kümesi
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
C	: Kondensasyon
Cep	: Kloroeremomisin
Com	: Komplestatin
Dbv	: Dalbavansin
dk	: Dakika
DMF	: Dimetilformamid
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DpgC	: Dihidrofenilglisin
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	: Etidyumbromür
g	: Gram
GC	: Guanin-Sitozin
GPA	: Glikopeptid antibiyotikleri
Hpg	: Hidrofenilglisin
IPTG	: İsopropil-β-D-Thiogalactoside
L	: Litre
LB	: Lurient Broth
M	: Molarite
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetic Analysis
mM	: Milimolar
MRSA	: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
NCBI	: Uluslararası Teknoloji Bilgi Merkezi
ng	: Nanogram
NRP	: Ribozomal olmayan peptidler

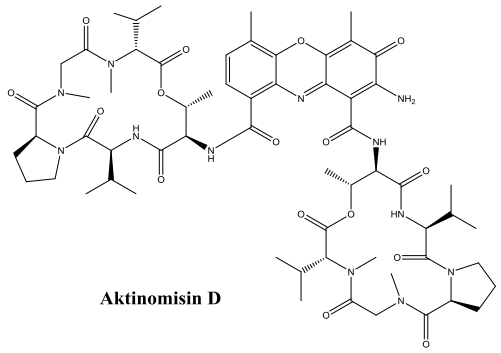
NRPS	: Ribozomal olmayan peptid sentetaz
O.D	: Optik Dansite
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
OxyC	: monooksijenaz C
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pek	: Pekiskomisin
PK	: Poliketidler
PKS	: Poliketid sentaz
pSK	: p-bulescript plazmid
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolution per minute
Sn	: Saniye
TAE	: Tris-baz Asetik Asit EDTA
TE	: Tris-EDTA
Tei	: Teikoplanin
TSA	: Tryptone Soya. Agar
TSB	: Tryptone Soya Broth
TSE	: Tris-Sükroz-EDTA
Van	: Vankomisin
VpsA	: Vankomisin NRPS A alt birimi
VpsB	: Vankomisin NRPS B alt birimi
VpsC	: Vankomisin NRPS C alt birimi
VRE	: Vankomisine Dirençli Enterokoklar
Zor	: Zorbamisin
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

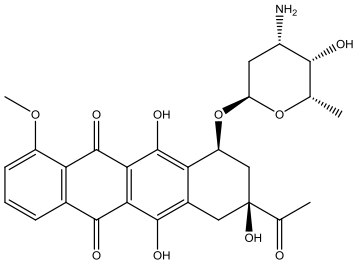
Doğal ürünler bitki, mantar ve bakteriler tarafından üretilen farklı kimyasal çeşitliliğe ve geniş yelpazede biyolojik aktivitelere sahip, bu özelliklerinden dolayı da insan ve hayvan hastalıklarında ve aynı zamanda tarımda ilaç olarak kullanılan bileşiklerdir. Bunlar, karasal bitkiler, mikroorganizmalar, omurgalı ve omurgasız canlılar ve deniz organizmaları da dâhil olmak üzere çeşitli kaynaklardan köken alırlar. Tarihsel olarak, birçok ilacın aktif bileşenini meydana getiren, hem yapısal hem de işlevsel olarak birbirinden oldukça farklı bu biyoaktif bileşikler, günümüzde, kanser, hipertansiyon, mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonlar ve nörolojik hastalıkların tedavisi için önemli ilaç kaynakları oluşturmaktadırlar (Lahlou 2013, Chen ve ark. 2015, Katz ve Baltz 2016). Antibiyotikler (Vankomisin, Rifamisin Şekil 1.1), antitümör ajanlar (Aktinomisin D, Daunorobisin Şekil 1.1) , toksinler, immün baskılayıcılar ve sideroforları içeren doğal ürünlerin eşsiz yapıları çeşitli kimyasal tepkimeler sonucu oluşan karmaşık karbon iskeletlerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 1.1). Çeşitli enzimler tarafından biyosentezi gerçekleştirilen bu doğal bileşikler genellikle yüksek molekül ağırlıklara sahip olup fazlaca oksijen atomu ve beşten fazla H-bağı donörü içerirler. Bu, istenen etkinliğe ulaşmak için yüksek düzeyde biyo-yararlanıma yol açar (John 2009).



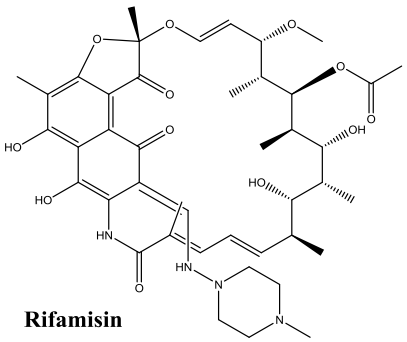
Vankomisin



Aktinomisin D



Daunorobisin



Rifamisin

Şekil 1.1. Doğal kaynaklardan elde edilen bazı biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapıları (Katz ve Baltz 2016).

Mikroorganizmaların ürettiği doğal ürünler, ilaç keşifinde ve hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynamıştır. 1940'ların başlarında penisilinin gelişmesine kadar, çoğu doğal ürün türevi ilaçlar karasal bitkilerden elde edilirdi. Ancak, penisilinin enfeksiyon tedavilerindeki başarısı ve mikrobiyal sekonder metabolitlerin kimyasal yapılarının daha kompleks ve çeşitli olması, mikroorganizmalardan ilaç keşfi çalışmalarında önemli atılımlara neden olmuştur. 1981 ile 2006 yılları arasındaki bileşik keşiflerinde biyo-yararlanımı yüksek ilaçların çoğu mikrobiyal doğal ürünlerden elde edilmiştir (Sung ve ark. 2017).

Bakterilerin ve mantarların sekonder metabolizması, farmasötik, tarımsal ve beslenme uygulamaları için büyük potansiyele sahip zengin biyoaktif kimyasal bileşiklerin kaynağıdır. Günümüzde, anti-enfektifler alanında, hâlihazırda medikal kullanımda olan ilaçların yaklaşık % 70'i sekonder metabolit kaynaklı veya bunların türevleridir (Newman ve Cragg 2012). Yapısal olarak farklı biyoaktif madde kaynağı olan karasal mikroorganizmalar; glikopeptidler, β-laktamlar, alkaloidler, makrolidler, sefalosporinler, aminoglikozitler, tetrasiklinler ve diğer bileşikler dâhil olmak üzere birçok antibakteriyel ajanın keşfine önemli katkılar sağlamıştır.

Doğal bir ürün olarak antibiyotikler geçtiğimiz yüzyılda keşfedilen ve geliştirilen en başarılı ilaçlardır. Antibiyotiklerin tedavide ilk kez kullanımı Alexander Fleming'in 1928 de penisilini tesadüfen keşfetmesinden sonraki yıllara dayanır. 1940'lı yıllarda üretilen penisilin, stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Antibiyotik araştırmaları 1943'de Selman Waksman ve arkadaşları tarafından, streptomisinin bulunmasıyla (Schatz ve Waksman 1944) hız kazanmıştır. O yıllarda streptomisin, tüberküloz tedavisinde kullanılan etkili ilk antibiyotik olmuş ve *Streptomyces* cinsinin tipik bir türü olan *Streptomyces griseus*'dan elde edilmiştir.

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve diğer organizmaların büyümesini engellemek veya öldürmek için kullanılan doğal antimikrobiyal maddeler olarak tanımlanır (Lancini ve ark. 1995). Antibiyotikler, esas olarak doğada toprak bakterileri ve mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolitler olup bu, organizmalara habitatlarında besin, su ve diğer sınırlı kaynaklar için rekabet ettiklerinde avantaj sağlar (Williams ve ark. 1989, Angell ve ark. 2006). Antibiyotikler bakteriyostatik veya bakterisidal olarak sınıflandırılır.

Penisilinin keşfinden bu yana, 23.000'den fazla doğal ürün karakterize edilmiştir. Doğal kaynaklardan elde edilen bu biyoaktif bileşiklerin, 16.500'ü antibiyotik aktivitesine sahip olup, bunların 10.100 tanesi aktinomiset kökenlidir (Chin ve ark. 2006, Selvameenal ve ark. 2009). Bunlardan bazıları Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. Aktinomisetlerin ürettiği bu geniş spekturumlu bileşikler, günümüzde biyoteknoloji alanında, klinik ve endüstriyel uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Diğer taraftan, aktinomisetler, insanlar için yeni antibiyotikler, antifungaller, antikanser ajanlar veya bitki büyümesini uyaran ve bitki hastalıklarına karşı direncin artırılması için kullanılan bazı sekonder metabolitlerin üretimi için büyük potansiyele sahiptir (Barka ve ark. 2016, Behie ve ark. 2017).

Çizelge 1.1. Aktinomisetler tarafından üretilen bazı biyoaktif ajanlar.

Organizma	**Biyoaktif Ajan**	**Referans**
	Antimikrobiyal	
Amycolatopsis orientalis	Vankomisin	(Brigham ve Pittenger 1956)
Streptomyces griseus	Streptomisin	(Schatz ve Waksman 1944)
Streptomyces mediterranei	Rifamisin	(Margalith ve Beretta 1960)
Streptomyces fradiae	Neomisin	(Dulmage 1951)
Streptomyces venezuelae	Kloramfenikol	(Omura ve ark. 1986)
Streptomyces avermitilis	Avermektin	(Burg ve ark. 1979)
Streptomyces aureofaciens	Tetrasiklin	(Darken ve ark. 1960)
Streptomyces rimosus	Oksitetrasiklin	(Rhodes 1984)
Streptomyces kanamyceticus	Kanamisin	(Umezawa 1957)
	Antifungal	
Streptomyces anulatus	Aktinomisin	(Waksman ve Woodruff 1940)
Streptomyces nodosus	Amfoterisin B	(Linke 1974)
Streptomyces griseus	Kandisidin	(Acker ve Lechevalier 1954)
Streptomyces spp.	Karboksamisin	(Hohman ve ark. 2009)
Streptomyces natalensis	Natamisin	(Struyk ve ark. 1958)

Streptomyces humidus	Fenilasetat	(Hwang ve ark. 2001)
Streptomyces canus	Rezistomisin	(Zhang ve ark. 2013)
Streptomyces hygroscopicus	Validamisin	(Iwasa ve ark. 1970)
	Antitümör	
Streptomyces peucetius	Doksorubisin	(Arcamone ve ark. 1969)
Streptomyces peucetius	Daunorubisin	(White ve Stroshane 1984)
Micromonospora spp.	Tiokoralin	(Baz ve ark. 1997)
Streptomyces spp.	Borellidin	(Vino ve Lokesh 2008)
Salinispora tropica	Salinisporamid	(Kwon ve ark. 2006)
	İmmünosüpresan	
Nocardia brasiliensis	Brasilikardin	(Komaki ve ark. 1999)
Streptomyces filipinensis	Higromisin	(Uyeda ve ark. 2001)
Streptomyces filipinensis	Pentalenolakton	(Uyeda ve ark. 2001)
	Terapötik	
Streptomyces spp.	L_ Asparaginaz	(Dejong 1972)
Streptomyces olivochromogenes	L_ Glutaminaz	(Balagurunathan ve ark. 2010)
	Antiviral	
Streptomyces antibioticus	Arabinofuranosiladin	(Farmer ve Suhaldonik 1972)
Streptomyces hygroscopicus	Higromisin	(Gonzales ve ark. 1978)
Streptomyces spp.	Panosialins	(Aoyagi ve ark. 1971)
	Biyoherbisit	
Streptomyces hygroscopicus	Herbimisin	(Omura ve ark. 1979)
Streptomyces prasinus	Prasinons	(Box ve ark. 1973)
Saccharopolyspora spinosa	Spinosad	(Waldron ve ark. 2001)

Klinik olarak dünyadaki insanların sağlığı ve refahı için olağanüstü katkıları olan aktinomisetlerin en yetenekli olanları *Streptomyces* cinsine ait olan türlerdir. *Streptomyces*'lar hala en önemli doğal antibiyotik kaynağı olup tüm aktinobakteriyal antibiyotiklerin %80'inden sorumludur. Bu yetenekli mikroorganizma grubu antibiyotiklerin yanı sıra, Çizelge 1.1'de de görüldüğü gibi herbisitler, antifungaller, antitümör veya immünbaskılayıcı ilaçlar ve antihelmintik ajanlar gibi biyolojik aktiviteleri olan çok sayıda sekonder metabolit üretirler (Ilic ve ark. 2007, Manteca ve Yagüe 2018). Gerçekten de, son yıllarda klinik kullanım için onaylanan antibiyotik iskeletlerinin çoğu mikrobiyal doğal ürünler olmuştur (Thaker ve ark. 2013).

1940'ların başında penisilin, gramisidin, tirozidin ve streptomisin gibi antibiyotiklerin keşfedilmesi antimikrobiyal tedavinin ihtiyaçlarını önemli derecede karşılamaktaydı (Thaker ve ark. 2012). Fakat 21. yüzyılın başlarında, antibiyotik direncinin ortaya çıkması ile mikrobik hastalıkların tedavisi gittikçe karmaşık bir hal

aldı. İnsan patojenlerinde endişe verici bir şekilde artmaya devam eden antibiyotik direnci, kliniğin ötesine geçerek ekolojik boyutları korkunç olan küresel bir sorun haline gelmiştir (Gibson ve ark. 2015). Mevcut antibiyotiklerin çeşitli enfeksiyonların tedavilerinde ihtiyaçları karşılayamamasından dolayı, bilinen direnç mekanizmalarından etkilenmeyen yeni antibiyotiklerin keşif çalışmaları zorunlu hale gelmiştir (Bush ve ark. 2011).

Antibiyotiklerin en belirgin özelliği, kimyasal çeşitlilikte ve karmaşık olmasıdır. Bu kimyasal çeşitlilik, birçok antibiyotikte ana yapı olarak işlev gören peptid ve poliketid omurgaları tarafından sağlanmaktadır. Bunu da, sırasıyla ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentaz (PKS) enzim sistemleri yapmaktadır. NRPS'ler çoğu tıbbi değere sahip biyoaktif peptidlerin üretimi için oldukça önemli metabolik yolakları sentezlemektedirler. Ribozom dışı sentezlenen peptidlerin en önemli antibiyotik üyeleri; nokardisin gibi β-laktamlar, daptomisin gibi siklik peptidler ve vankomisin gibi glikopeptid antibiyotiklerdir (GPA) (Felnagle ve ark. 2008).

Aktinomisetler geniş yelpazede biyolojik aktiviteye sahip doğal bileşiklerin önemli kaynaklarıdır. Bunların içerisinde GPA'lar, sahip oldukları kimyasal çeşitlilikten dolayı klinik olarak kullanılan en önemli antibiyotik sınıflarından biridir. GPA'lar, NRPS'ler tarafından sentezlenen ve nadir bulunan heptapeptidlerdir. Biyosentez sürecinde peptid iskeletlerinin modifikasyonları glikopeptid antibiyotiklerine muazzam bir seçicilik ve işlev sağlar (Pinchman ve ark. 2013). Bu modifikasyonlar; amino asit yan zincirlerinin hidroksilasyonu, aromatik yan zincirlerin sitokrom P450 monooksijenazlar ile çapraz bağlanması, glikozilasyon, metilasyon, sülfasyon, asetilasyon ve ayrıca amino asit kalıntılarının aromatik yan zincirlerinin halojenasyonu şeklinde meydana gelir.

Farklı kaynaklardan rastgele taranan aktinomisetlerden elde edilen yeni antibiyotik iskeletlerinin bulunma frekansı 10^{-1} ve 10^{-7} arasında derecelendirilmiştir. Doğal üreticiler tarafından Streptotirisin 10^{-1}, streptomisin 10^{-2}, tetrasiklin ve aktinomisin 10^{-3} frekanslarında üretilmektedir (Baltz 2005). Bunun aksine, daha düşük frekanslarda (1.5×10^{-6}) üretilen bir GPA iskeletini bulmak için 150.000'den fazla aktinomiset suşunun taranması gerektiği ortaya konulmuştur (Baltz 2005, Thaker ve ark. 2013).

Yeni doğal ürünlerin keşif çalışmalarında, geleneksel tarama stratejileri daha önceden tanımlanmış bileşiklerin tekrar bulunmasına yol açtığı için yeni antibiyotiklerin keşif sürecini sekteye uğratmıştır. Araştırmacılar, zaman ve verimden kaybettiren bu yöntemler yerine biyosentetik potansiyel ve çeşitliliği daha kısa sürede ortaya çıkaran genetik tarama stratejilerini benimsemişlerdir. Aktinomisetlerin biyoaktif doğal ürün üretme potansiyelleri onlarca yıldan beri bilinmekle beraber, genom projelerinden ortaya çıkan sonuçlara göre muazzam yapısal çeşitliliğe sahip çok sayıda doğal ürün sentezleme yeteneği olduğu anlaşılmıştır (Bentley ve ark. 2002, Hornung ve ark. 2007). Antibiyotik biyosentetik genleri genomda tipik olarak; biyosentez, modifikasyon ve bazen dirençlilik genlerini içeren kümeler halinde bulunmaktadırlar. Bu nedenle, üretim potansiyeli yüksek olan bakteri genomlarının doğal ürün biyosentez genlerinin genetik olarak taranması yeni ilaç keşfi çalışmaları için son derece önemlidir (Cundliffe ve ark. 2010).

Çalışmamızda, lokal *Streptomyces* izolatlarında yeni glikopeptid antibiyotikler bulmak amacıyla PCR'a dayalı genetik taramalar yapıldı. Bunun için GPA da dahil bazı antibiyotiklerin biyosentez gen kümelerinde bulunan P450 monooksijenaz genleri (vankomisin benzeri gen kümelerinde *oxy*C adını almaktadır) kullanıldı. Bu genler GPA antibiyotiklerinin sınıflandırılmasında önemi olan ve sekonder metabolitlerin evrimi açısından değerli genleridir.

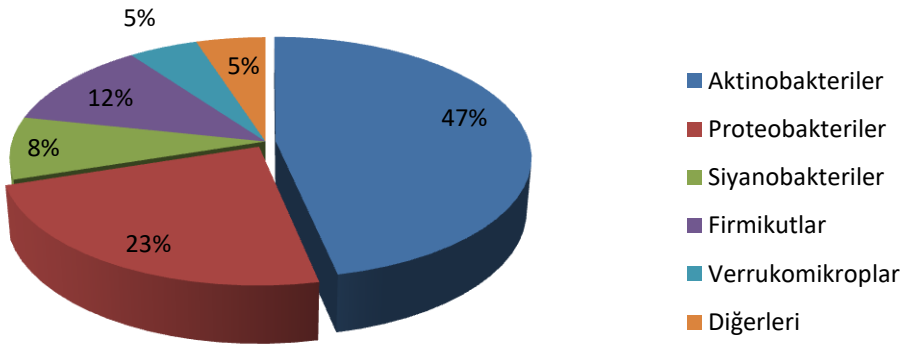
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. Aktinomisetler

Aktinomisetler, *Bacteria* domaininde yer alan 18 ana soy arasında en büyük taksonomik birimden birini temsil eden Aktinobakteri şubesine ait karmaşık bir yaşam döngüsü ile karakterize olan filamentli bakterilerdir (Ventura ve ark. 2007). Aktinobakteriler, toprak ve su ekosistemlerinde yaygın olarak bulunurlar (McCarthy ve Williams 1992, Stach ve Bull 2005).

Aktinomisetler; tarımsal, endüstriyel ve farmasötik amaçlar için çok değerli sekonder metabolitleri ve enzimleri üretirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif sekonder metabolitlerin, yaklaşık 10.000 tanesinin aktinomisetler tarafından üretildiği ve bu rakamın tüm biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin % 4'ünü temsil ettiği rapor edilmiştir (Şekil 2.1, Berdy 2005).



Şekil 2.1. Mikroorganizmalardan elde edilen sekonder metabolitlerin oranları (Berdy 2005)

16S rRNA genine dayalı verilere göre, aktinomisetlerin 100'ün üzerinde cinse sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bunların içerisinde tür sayısı ve yayılım açısından en yaygın olan ise *Streptomyces* cinsidir. *Streptomyces* türleri, yüksek ticari değeri olan insan ve hayvan sağlığında ve tarımda önemli uygulamalara sahip biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir kaynağını temsil etmektedir (Watve ve ark. 2001, Berdy 2005).

2.1.2. *Streptomyces* Türlerinin Genel Özellikleri

Streptomyces cinsi, *Actinomycetales* takımının *Streptomycetacea* ailesine ait Gram pozitif bakterilerdir. İsimlerini latince streptos (bükülmüş) ve myces (misel) olarak, morfolojisini filamentöz mantarlara benzer şekilde yansıtan ve spor zincirlerine ayrılan hava misellerinin buruşmuş şeklinden alırlar.

Streptomyces'lar, toprak mikrobiyal florasının yaklaşık % 10' unu temsil eden ve 900'den fazla tanımlanmış türü olan aerob bakterilerdir (Chater 2001, Janssen 2006). Bu organizma gurubu hem karasal ortamlarda hem de sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır ve saprofit olup bir kısmı bitki ve hayvanlarla parazitik ilişki içerisindedir (Sembiring ve Goodfellow 2008). Toprak ortamında saprofitik hayata iyi uyum sağlarlar. *Streptomyces*'lar, aynı zamanda, ölü veya çürüyen organik maddelerin ayrışması için, hücre dışına hidrolitik enzimler salgılarlar, bunların bazıları selüloz, kitin veya nişasta gibi karmaşık polimerleri parçalarlar. Böylece, karbon döngüsü için büyük önem teşkil ederler (Kieser ve ark. 2000).

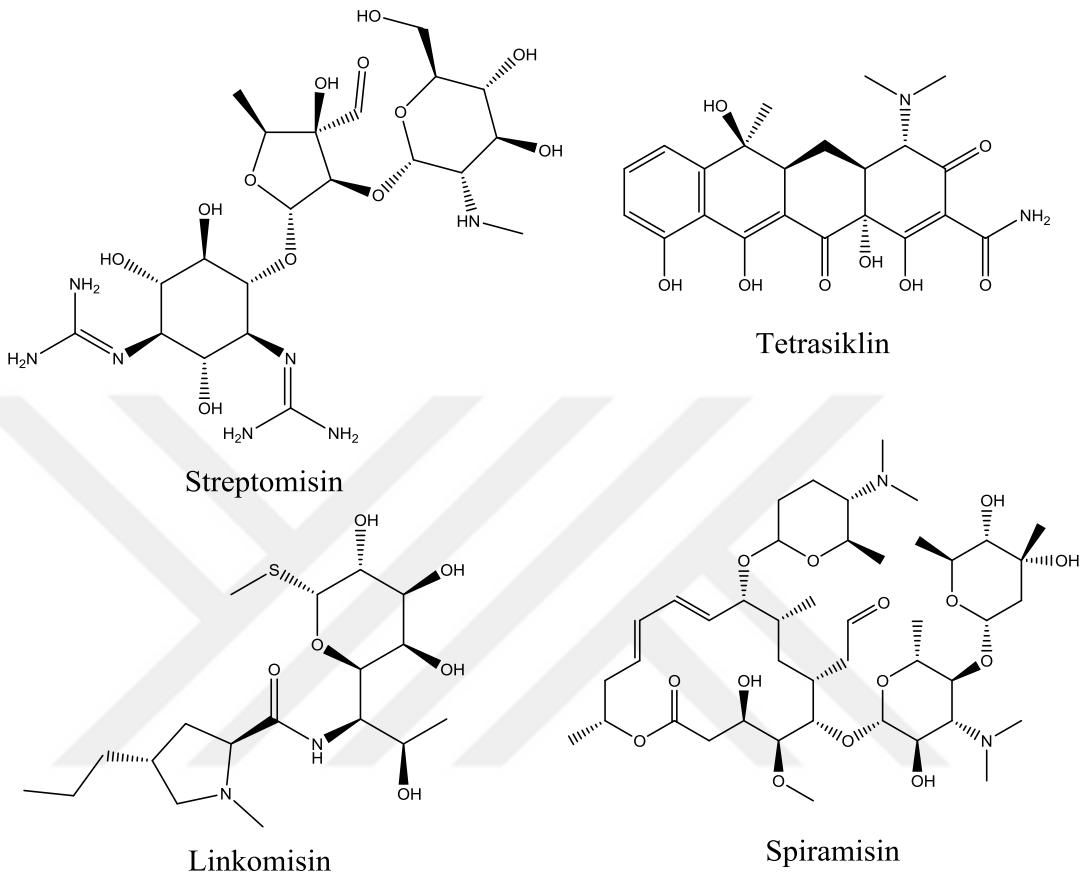
Bakteriler arasında *Streptomyces* türleri tipik olarak 8,7 Mbp (megabaz çifti) ile 11,9 Mbp aralığında olup, mikroplar içerisinde en büyük genomlara sahiptirler (Zhou ve ark. 2012). Şu ana kadar rapor edilen en küçük *Streptomyces* genomu 5.18 Mbp uzunluğundaki *S. somaliensis DSM 40738* suşuna aittir (Kirby ve ark. 2012). Uzun bir zaman diliminde sadece üç *Streptomyces* türünün (*S. coelicolor* A3 (Bentley ve ark. 2002), *S. avermitilis* (Ikeda ve ark. 2003) ve *S. griseus* (Ohnishi ve ark. 2008) tam genom dizisinin yayınlanmasından sonra yeni nesil dizileme teknolojileriyle beraber 1800' den fazla *Streptomyces* türünün tüm genom dizilimi yayınlanmıştır (https://gold.jgi.doe.gov/projects?setColumns=yes&Organism.Species=streptomyces).

Streptomyces cinsi önemli bir biyoteknolojik grubu temsil etmekte olup çok çeşitli kimyasal yapılara ait bileşikler üretir. Tıbbi ve tarımsal antibiyotiklerin üçte ikisini, çeşitli antitümör ajanları, antifungalleri, apoptozis indükleyicileri ve inhibitörlerini ve başka biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bileşik üretirler (Worrall ve Vijgenboom 2010).

2.1.3. *Streptomyces* Türleri Tarafından Sentezlenen Doğal Ürünler

Büyük bir endüstriyel öneme sahip *Streptomyces* cinsi, antibiyotik üreten mikroorganizmalar arasındaki en büyük bakteriyel grup olup, genel mikrobiyal

üretiminin % 75'inin kaynağıdır. Şekil 2.2.'de *S. griseus* tarafından üretilen streptomisin, *S. rimosus* tarafından üretilen tetrasiklin, *S. lincolnensis* tarafından üretilen linkomisin ve *S. ambofaciens* tarafından üretilen spiramisin bunlar arasında yer alan birkaç örnektir.



Şekil 2.2. *Streptomyces* tarafından üretilen çeşitli sekonder metabolitler

Antibiyotiklerin yanında antikanser ilaçlar, immünosüpresanlar, herbisitler ve bitki büyüme düzenleyicileri de üretirler (Çizelge 1.1). *Streptomyces*'lar sekonder metabolitlerin yanı sıra endüstriyel öneme sahip hidrolitik enzimler de üretirler (Newman ve ark. 2003, Jimenez ve ark. 2005).

2.1.4. Bir doğal ürün olarak sekonder metabolitler

İlk mikrobiyal fizyologlar, mikroorganizmaların üremelerinin logaritmik fazında, büyüme ve hücre bölünmesi için bir ön koşul olarak hücresel bileşenlerini hızla çoğalttıkları ve yoğun metabolik faaliyete sahip oldukları fikrine sahiptiler. Bu kavramın yanlışlığını ilk fark eden doğal ürün kimyacılarıydı. 1920-1930 yılları arasında, organik kimyacılar, esasında durağan fazdaki mantar kültürlerinin, neredeyse hiç bitmeyen karmaşık organik bileşikler sentezlediğini buldular. Bu moleküllerin

kimyasal yapıları aydınlatıldığında, primer metabolizmada rol oynamadıkları ortaya çıkmıştır. Primer metabolizma sonrasında metabolik fonksiyonlara sahip olan bu bileşiklere sekonder metabolit adı verilmiştir (Hirano 1996). Savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücresel haberleşme gibi oldukça geniş kapsamda görevleri olan sekonder metabolitler, bakterilerin doğrudan üremeleri, ve gelişmeleri için elzem olmayıp, diğer organizmalar ile etkileşimlerinde önemli ekolojik rol oynarlar (Cannel 1998).

Ökaryotik organizmalar ve birçok deniz ve karasal ortam genellikle farklı mikrobiyal topluluklara ev sahipliği yapar. Bu topluluklarda çok sayıda bakteri, arke, tek hücreli, mantar ve hatta virüslerin bulunması, farklı mikrobiyal türler arasındaki özgün etkileşimlerin ve iletişimin evrilmesine yol açar. Bu çoklu organizmaların bulunduğu aynı ortam etkileşimlerinde üretilen sekonder metabolitler bu iletişimi kolaylaştırabilir, aynı zamanda mikroorganizmaların habitatlarını rakiplerine karşı savunmasına yardımcı olan savunma molekülleri olarak da hareket edebilir (Andersson ve Hughes 2014).

Canlı sistemlerdeki birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlayan sekonder metabolitler diğer bakterilere, mantarlara, amiplere, bitkilere ve böceklere karşı kullanılan rekabetçi silahlar olarak, metal taşıma maddeleri olarak, mikroplar ve bitkiler, nematodlar, böcekler ve daha yüksek hayvanlar arasındaki simbiyoz ajanları, cinsel hormonlar ve farklılaşma efektörleri olarak işlev görürler (Demain ve Fank 2000).

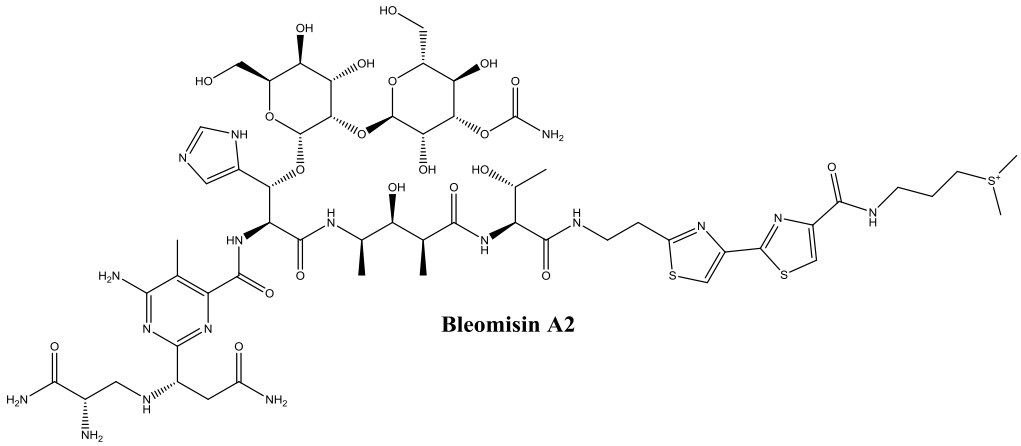
Sekonder metabolitler için bir dönüm noktası olan 1928'deki penisilinin keşfi ve penisilinin klinikteki başarısı karasal mikroorganizmaların sekonder bileşik potansiyellerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır. Penisilinin keşfini takiben antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal), antitümör veya antiviral aktivite gösteren bileşikler, aminoglikozid tetrasiklin ve poliketid içeren bileşikler keşfedilmiştir (Dewick 2002, Berdy 2005).

2.1.5. Doğal Ürün Biyosentezi; mega enzim sistemleri

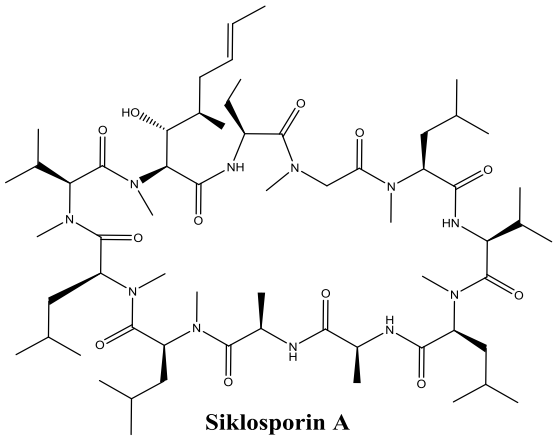
Modern tıbbın önemli unsurlarından olan doğal ürünler canlı organizmalar tarafından çeşitli biyosentez yolaklarından meydana gelirler. Ribozom dışı yolla sentezlenen peptidler (NRP) ve poliketidler (PK), önemli biyolojik aktivitelere ve farmakolojik özelliklere sahip doğal ürünlerin geniş iki farklı ailesini oluştururlar (Cane

ve ark. 1998). NRP'ler sadece mantarlardan ve bakterilerden sekonder metabolizma sonucu meydana gelirken, poliketidler bitkiler tarafından da sentezlenirler. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları çeşitli ve biyoaktiviteleri geniş kapsamlıdır.

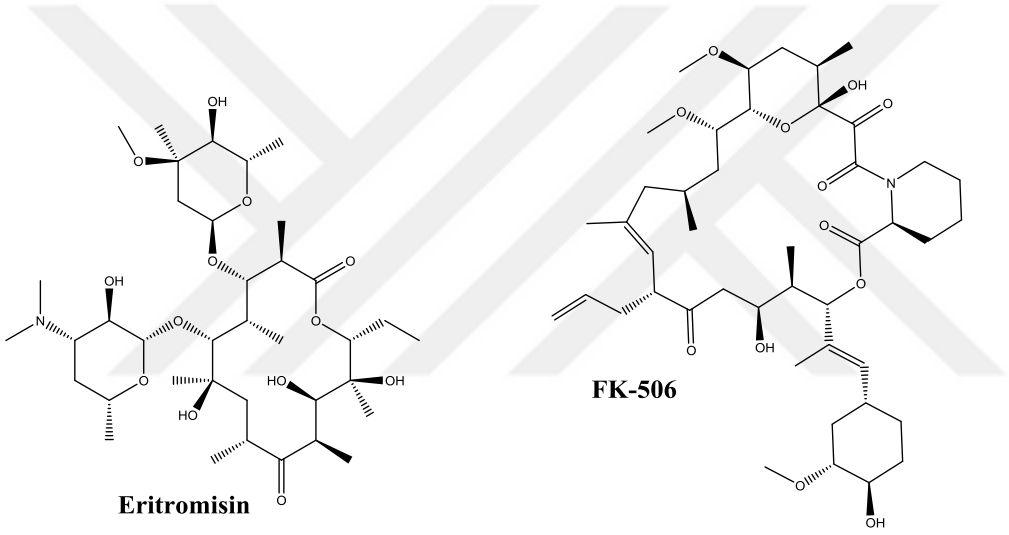
NRP ve PK'ler, farmakoloji endüstrisinde çok önemli ekonomik değere sahip ilaç grubunu oluşturmaktadırlar (şekil 2.3 ve şekil 2.4) (Walsh 2007, Komaki ve ark. 2009). Doğrusal, halkasal veya dallanmış yapılara sahip NRP ve PK'ler, toksinler, sideroforlar, pigmentler, antibiyotikler, sitostatikler, immünbaskılayıcılar ve antifungallerin yanı sıra biyopestisit olarak da aktivite gösterebilirler (Kopp ve Marahiel 2007). Bu olağanüstü farmakolojik öneme sahip bileşikler sırasıyla ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentaz (PKS) adı verilen korunmuş bir tiotemplate mekanizması ile modüler enzim kompleksleri üzerinde sentezlenirler (Walsh 2007). Bu multimodüler enzim sistemleri lipopeptidler, sideroforlar ve antimikrobiyal metabolitler dâhil olmak üzere birçok doğal bileşiğin sentezinden sorumlu önemli sayıda modüler genin tanımlanmasına da olanak sağlamıştır. NRPS ve PKS genetik mekanizmaları şimdiye kadar 991 organizmadan 3,339 gen kümesinin keşfi ile toplam 2,699 genom üzerinde incelenmişlerdir (Wang ve ark. 2014, Esmaeel ve ark. 2018).



Bleomisin A2



Şekil 2.3. Günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan NRP bileşikleri; bleomisin A (antitümör) ve siklosporin A (immünosüpresan) (Walsh 2007)



Şekil 2.4. Klinik uygulamalarda kullanılan PK bileşikler; eritromisin (antifungal), FK-506(immüno-supresan) (Rajgarhia ve Strohl 1997)

2.1.5.1. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)

NRPS'lar, karmaşık biyoaktif makrosiklik peptidlerin sentezine aracılık eden multimodüler biyokatalizörlerdir (Finking ve Marahiel 2004, Grunewald ve Marahiel 2006). Ribozomal olmayan peptidler, protein yapısına giren amino asitlere ek olarak, çoğu kez biyoaktivite için de önemli olan ve proteinlerin yapısına girmeyen amino asitleri içerirler. Bugüne kadar 422'den fazla monomerin NRPS enzimleri tarafından substrat olarak kullanıldığı bilinmektedir (Caboche ve ark. 2008).

NRPS modülleri, her bir peptidik ürüne bir monomerik öncünün dahil edilmesinden sorumlu olan megasentetazların tekrarlayan yapı taşlarıdır. Buna göre, verilen bir biyosentetik küme içindeki NRPS modüllerinin sırası ve özgüllüğü, NRP'in dizisini yansıtır (Schwarzer ve ark. 2003, Sieber ve Marahiel 2005). Her bir NRPS modülünde peptidik ara bileşiklerin uzamasını katalize eden üç domain bulunur.

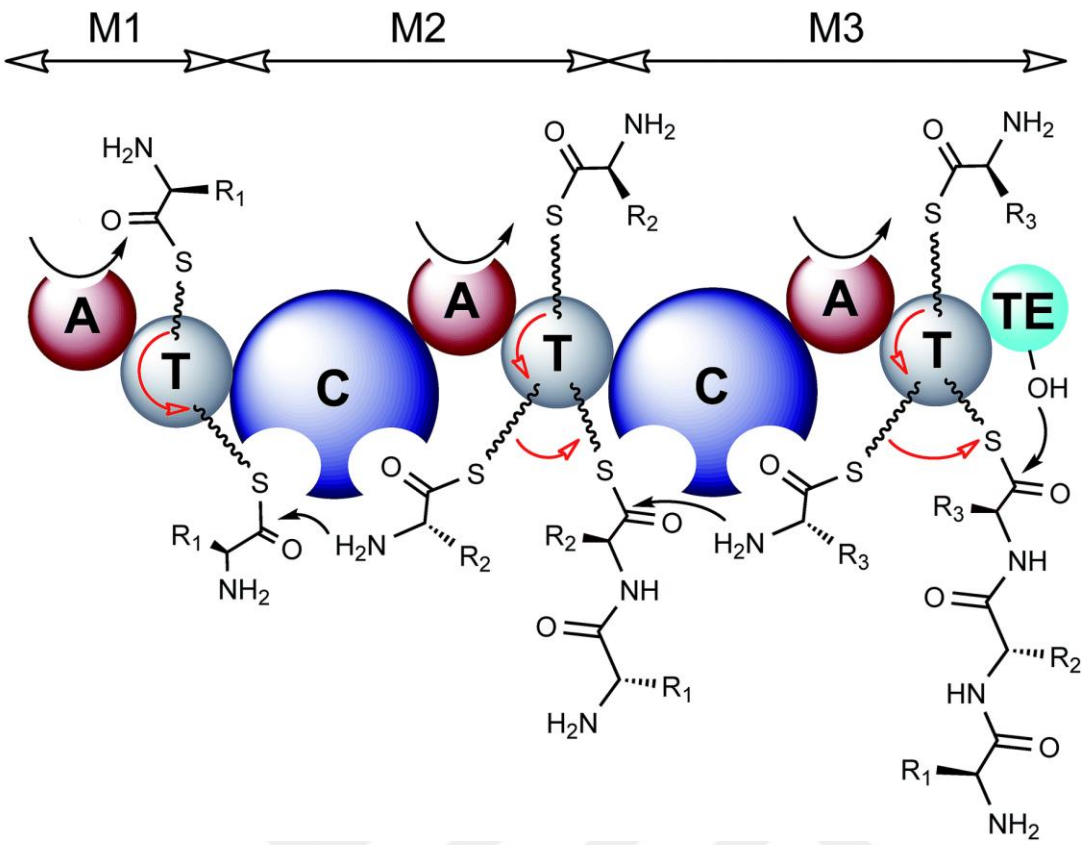
Bir modül Şekil 2.5'te ki gibi adenilasyon (A), peptidil taşıyıcı protein (PCP), kondensasyon (C) ve final modülünde tiyoesteraz (TE) olmak üzere dört temel domainden oluşur. TE domaini diğer tekrar eden NRPS domainlerinin aksine, bir NRPS ürün sentezinde sadece bir kez görev alır. NRPS modülleri, epimerizasyon (E), metilasyon (M), N-formülasyon (F) veya heterosiklizasyon (Cy) gibi substrat modifikasyonlarını katalize eden yardımcı domainler de içerebilirler (Walsh, 2007).

2.1.6. Glikopeptid Antibiyotikler (GPA)

Aktinobakterilerden elde edilen ilk iki glikopeptid antibiyotik vankomisin ve ristosetin, 1950'lerin ortalarında sırasıyla, *Amycolatopsis orientalis* ve *Amycolatopsis lurida*'da keşfedildi (Levine 2006, Butler ve ark. 2014). Vankomisin, 1958'de klinikte kullanılmak üzere onaylanmış olmasına rağmen kimyasal yapısı, ilk kullanımından 27 yıl sonra aydınlatıldı (Harris ve Harris 1982). Bu iki GPA özellikle Gram-pozitif enfeksiyonları tedavi etmek için klinikte büyük önem arz ettiler. Bununla birlikte, ristosetin, daha sonra bazı hastalarda kan trombosit sayılarının azalmasına (trombositopeni) yol açtığı için piyasadan kaldırıldı (Jenkins ve ark. 1974).

Eylül 2009'da ilk yeni nesil yarı sentetik glikopeptid olan telavansin piyasaya sürülmüştür. Diğer yarı sentetik GPA'lar olan dalbavansin ve oritavansin ise 2014 yılında ilaç olarak onaylanmıştır (Butler ve ark. 2014). Avoparsin kompleksi, 1980'lerde hayvanlarda bir büyüme promotoru olarak kullanıldı. Ancak, ilaç direncinin transferi endişesi, özellikle vankomisine dirençli enterokokların (VRE) ortaya çıkmasıyla dünyadaki birçok ülkede kullanımı durdurulmuştur (Phillips 2007).

GPA'lar genellikle glikolize olan ve bazen yağ asidi yan zincirleri içeren benzersiz trisiklik veya tetrasiklik heptapeptid çekirdeklerine sahip antibiyotiklerdir (Rossolini ve 2014).

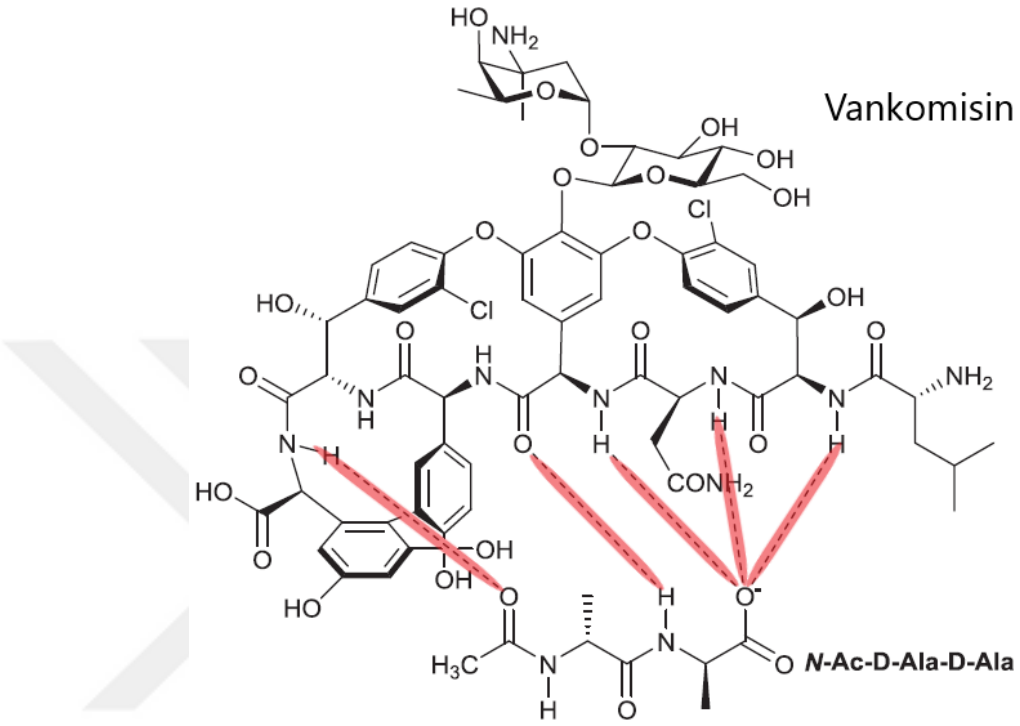


Şekil 2.5. NRPS enzim sisteminin şematik gösterimi (Walsh 2007).

Vankomisin, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve anaerob *Clostridium difficile* gibi Gram-pozitif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir role sahiptir (Venugopal ve Johnson 2012, Anstead ve ark. 2014). GPA'lar, aynı zamanda, diğer antibiyotik sınıflarına doğal dirençliliği olan ve yatay gen transferi veya mutasyon yoluyla kolayca direnç kazanabilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için de kullanılmaktadır. Yakın zamanda bulaşıcı hastalık ölümlerinin önemli bir nedeni olarak ortaya çıkan ağır *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde de oral yoldan vankomisin kullanımı giderek artmaktadır (Rossolini ve 2014).

Doğal olarak üretilen bir diğer önemli glikopeptid antibiyotik teikoplanin, 1978 yılında *Actinoplanes teichomyceticus*' tan izole edilmiş olup, ristosetine benzer bir lipoglikopeptid antibiyotiktir (Barna ve ark. 1984). Teikoplanin, 1998'de Avrupa'da klinikte onaylanmış olup, günümüzde birçok ülkede kullanılmaktadır. Ancak, Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı için onay verilmemiştir. Teikoplanin, Lepitit Araştırma Merkezi'nde (Milano, İtalya) keşfedilmiş ve benzer enfeksiyonları tedavi etmek için günümüzde hala kullanılmaktadır. Teikoplanin, glukozamin şekerine bağlı

bir yağ asidi zincirine sahip bir lipoglikopeptidtir. Hücre duvarının D-Ala-D-Ala parçasına bağlanarak (Şekil 2.6) hücre duvarı biyosentezini inhibe eder. Teikoplaninin lipofilik kısmı, membrana tutunan özellikler kazandırır. Genel olarak, vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri benzer bir toksisite ve aktivite profiline sahiptirler (Svetitsky ve ark. 2009).

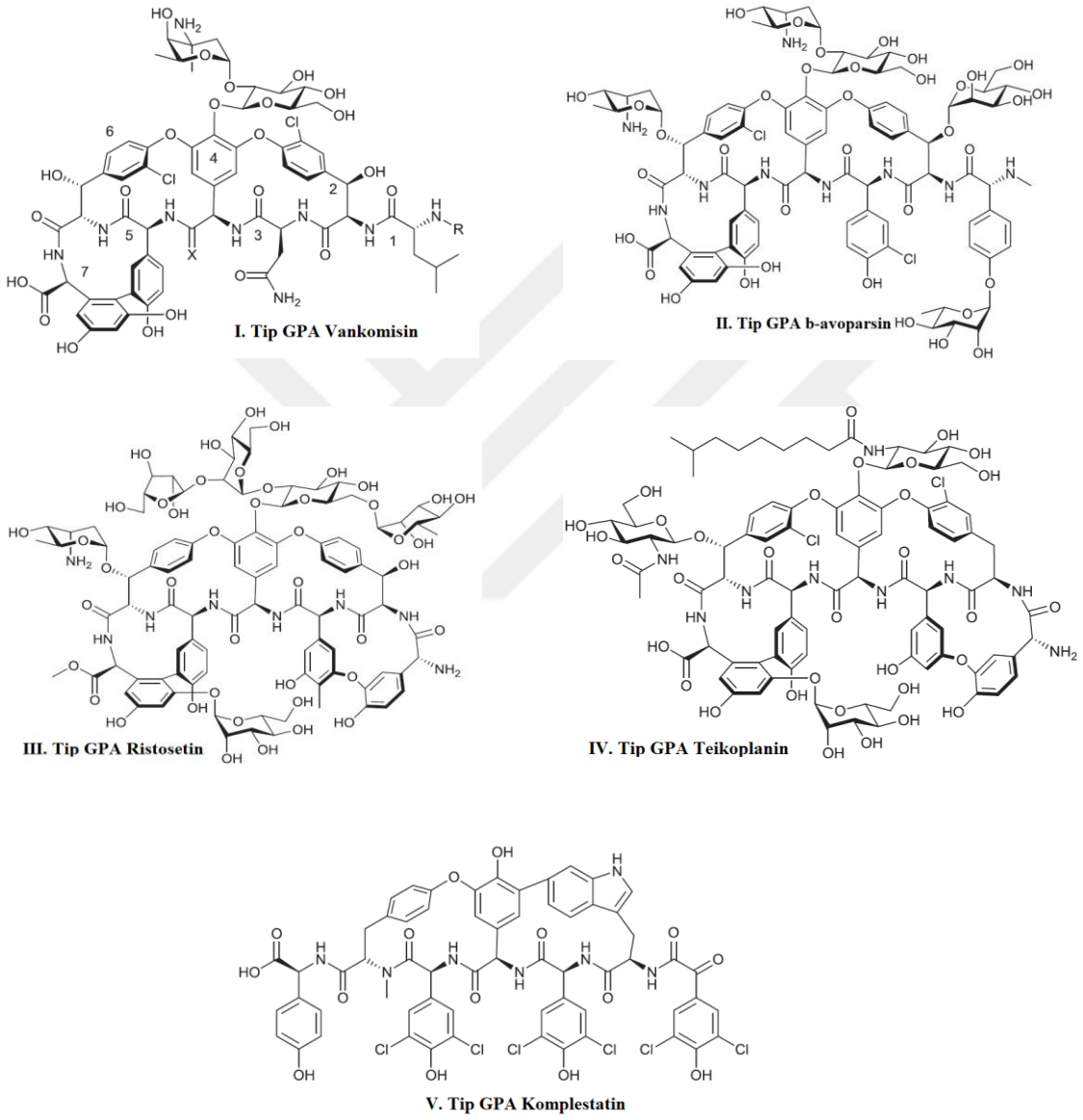


Şekil 2.6. Vankomisin ve Lipid II'nin D-Ala-D-Ala bileşeni arasındaki hidrojen bağı etkileşimi (Blaskovich ve ark. 2018)

2.1.6.1. GPA Biyosentezi

Glikopeptidler, NRPS enzim sistemiyle üretilen heptapeptidlerdir. Bütün glikopeptidlerde görülen ortak çekirdek yapı, şeker artıkları, klor atomları ve lipit zincirleri gibi farklı kısımlarla yoğun oksidatif çapraz bağlama ve modifiye edilmiş aromatik amino asitleri içeren bir heptapeptid iskeletidir. Lancini (1989) glikopeptid antibiyotiklerin NRPS sistemlerinde 1. ve 3. modüllerdeki A domeinlerinin seçtikleri amino asit substratlarının tipine göre GPA'ları dört ayrı yapısal alt sınıfa (I-IV) ayırdı. Bu gruplar daha sonra Nicolaou ve ark. (1999) tarafından güncellendi. Vankomisin gibi glikopeptidler heptapeptid yapılarında 1. modülde valin, 3. modülde asparajin amino asitlerini içerdiğinden, I. tip GPA olarak adlandırılırlar. b-avoparsin antibiyotiği NRPS sisteminin 1. ve 3. modüllerdeki A domeinlerin her ikisi de glutamin aino asidini içerdiğinden II. tip GPA olarak adlandırılırlar. III. tip GPA'lar 1. modülde hidrofenil

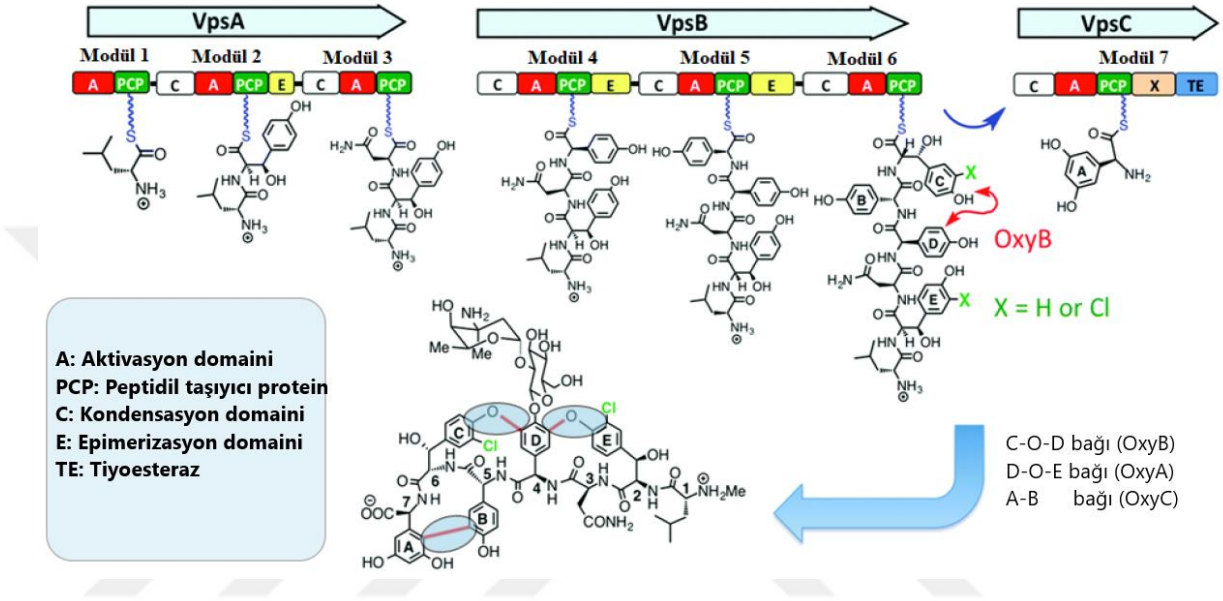
glisin, 3. modülde ise dihidrofenil glsin amino asitlerini içerirler. Teikoplanin gibi IV. tip GPA'lar yapılarındaki amino şekerlere bağlı ek bir yağ asidi bileşenini içeren III. tip GPA'ların bir alt sınıfıdır. Nicolaou ve arkadaşları ayrıca heptapeptid çekirdeğinde bir fenil grubunun yerine bir triptofan içeren komplestatin gibi V tip bir glikopeptid aglikonunu da belirlemiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. GPA bileşikleri ve Lancini tarafından tanımlanan yapısal sınıfları (Lancini 1989)

Şekil 2.7 de görülen glikopeptid yapılarındaki aromatik halkalar arasında oluşan çapraz bağlantılar ve halojenli heptapeptid omurgası, bu antibiyotik sınıfının antimikrobiyal

aktivitesi için önemlidir. Şekil 2.8'de görülen vankomisin biyosentezindeki peptid omurgası, 3 tane NRPS alt birim (VpsA, VpsB, VpsC) ve 7 modülden oluşur (Wohlleben ve ark. 2009). Vankomisin, balhimisin ve kloroeremomisin dahil olmak üzere birçok glikopeptid antibiyotiği aromatik yan zincirlerinde klor atomları bağlayan halojenaz enzimleriyle modifiye edilirler. Bu modifikasyon *Staphylococcus aureus'a* karşı antimikrobiyal aktivite deneylerinde D-Ala-D–Ala hücre duvarı hedefine bağlanma afinitesini arttırır (Pinchman ve Boger 2013).



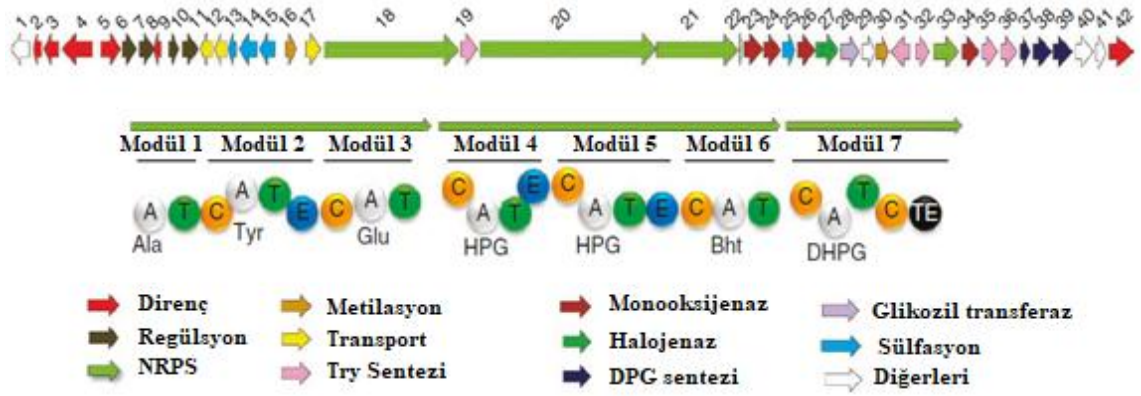
Şekil 2.8. Vankomisin biyosentezinin şematik gösterimi

Son yıllarda bir çok GPA biyosentetik gen kümesi tanımlanmış ve karakterize edilmiş olup, bunların yarısı son birkaç yılda rapor edilmiştir (Çizelge 2.1). Özellikle yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde; balhimisin, vankomisin, dalbavansinin öncüsü olan A40926, teikoplanin ve pekiskomisin (Şekil 2.9) gibi birçok glikopeptid antibiyotiğinin biyosentetik gen kümeleri tanımlanmıştır (Yim ve ark. 2014).

Çizelge 2.1. GPA üreten suşların biyosentez gen kümeleri (BGC) ve genomları. r.p: rapor edilmemiş (Marcone ve ark. 2018).

GPA	Üretici organizma	Biyosentetik gen kümesi (BCG)	Açık okuma çerçevesi (ORF), BGC uzunluğu
Vankomisin (Telavansin öncüsü)	*A.orientalis*	van	29 ORF, 64 kb
Teikoplanin	*Actinoplanes teichomyceticus*	tei	49 ORF, 89 kb
Kloroeremomisin (Oritavansin öncüsü)	*A.orientalis*	cep	39 ORF, 72 kb
A40926	*Nonomura eagerenzanensis*	dbv	37 ORF, 71 kb

(Dalbavansin öncüsü)			
Balhimisin	*Amycolatopsis balhimycina*	bal	36ORF, 66 kb
A47934	*Streptomyces toyocaensis*	sta	34ORF, 68 kb
Komplestatin	*Streptomyces lavendulae*	com	16 ORF, 48.7kb
Ristosetin	*Amycolatopsis lurida*	ris	39 ORF, 79 kb
Avoparsin	*Amycolatopsis coloradensis*	r.p	r.p
Norvankomisin	*Amycolatopsis orientalis* CPCC200066	r.p	30 ORF
Kistamisin	*Nonomuraea* ATCC 55076	kis	24 ORF
Pekiskomisin	*Streptomyces* sp. WAC1420	Pek	42 ORF, 86 kb
UK-68,597	*Actinoplanes* sp. ATCC 53533	auk	46 ORF, 81kb



Şekil 2.9. Pekiskomisin biyosentez gen kümesinde yer alan biyosentez ve modifikasyon genleri ve NRPS genlerinin modüler organizasyonu (Thaker ve ark. 2013)

Sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri, birçok yaşam formunda, çeşitli oksidatif dönüşüm mekanizmalarından sorumlu olan çok büyük bir oksidatif hemprotein ailesini oluştururlar (Coon 2005). Bunlar; bakteriler, mantarlar, omurgalı, omurgasız hayvanlar ve memelilerde bulunur. CYP'ler, NRP ve PK bileşiklerinin çoğunda bulunurlar. Bu reaksiyonlara tipik olarak fizyolojik ve ksenobiyotik bileşiklerin modifikasyonu ve çeşitli biyoaktif bileşiklerin (steroidler, antibiyotikler, sinyal molekülleri) biyosentezi dahildir.

GPA'lar kimyasal olarak şaşırtıcı derecede karmaşık yapılara sahip olup, yüksek miktarda çapraz bağlanmalar oluştururlar. Heptapeptit omurgalarında bulunan aromatik amino asitlerin yan zincirleri arasında üç veya dört biaril ve biaril-eter çapraz bağlantılarına sahiptirler (Buttler ve ark. 2014). Bu çapraz bağlantılar, GPA aglikonlarının karakteristik üç boyutlu fincan şeklini almalarına yol açar. Bu yapı aktiviteleri için önemlidir, zira beş hidrojen bağ donörüyle Şekil 2.7'de görüldüğü gibi,

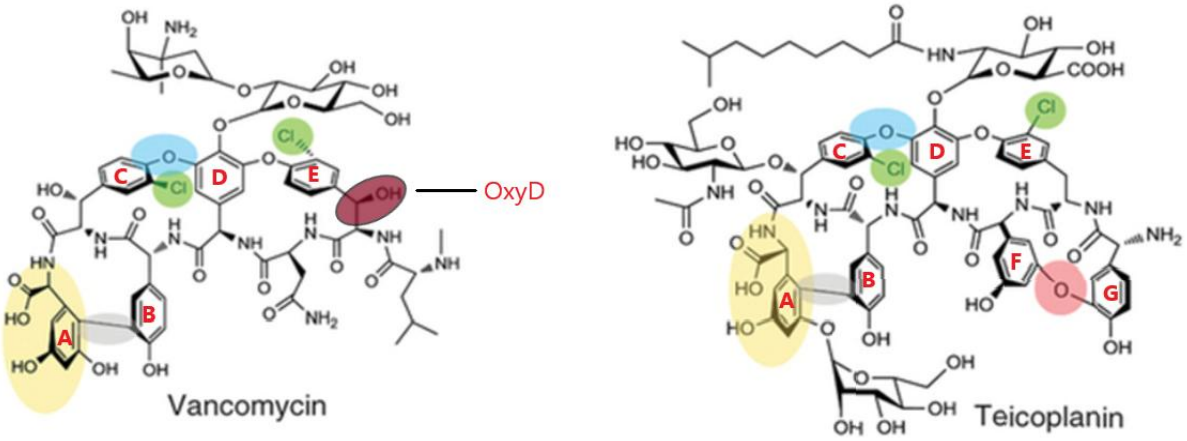
Gram pozitif bakterilerin hücre duvarına bağlanarak bakteri büyümesini engeller (Schneider ve Sahl 2010, Yim ve ark. 2014).

Sitokrom P450 monooksigenazların sayısı farklı GPA'larda değişebilmektedir. Vankomisin tipi glikopeptidlerin gen kümelerinde, aromatik halkalar arasındaki çapraz bağlantılardan sorumlu dört monooksijenaz (oxyA, oxyB, oxyC ve OxyD) varken, teikoplanın tipi antibiyotiklerin gen kümelerinde ek bir monooksigenaz geni olan oxyE vardır. Komplestatin antibiyotiğinde ise sadece 2 farklı monoksijenaz geni (OxyA, OxyB) vardır (Şekil 2.7, 2.10). Gen inaktivasyon çalışmaları sayesinde bu P450 monooksijenaz enzimlerinin, hem balhimisin (vankomisin benzeri, Tip I) hem de teikoplanin (Tip IV) tipi GPA'larda, aromatik halkalar arasındaki çapraz bağları oluşturarak bileşiğin sıkı bir siklizasyona uğradığını ortaya çıkarmıştır (Hadatsch 2007). Balhimisin için, oluşturulacak ilk halka sisteminin OxyB tarafından katalize edilen C-O-D diaril eter halkası (C-O-C bağı), sonrasında OxyA'nın D-O-E diaril eter halkasını (C-O-C bağı) katalizlediği, Şekil 2.10'daki OxyD'nin vankomisin aglikonunda C-O-H bağını katalizler. Ve son olarak da biaril A-B halkasının (C-C) OxyC tarafından kataliz edildiği gösterilmiştir (Şekil 2.10). Teikoplanin benzeri bir GPA olan A47934 bileşiği için de benzer deneyler gerçekleştirildi. Bu bileşikte ise bunlara ek olarak F-O-G halkasının OxyE enzimi tarafından katalizlendiği rapor edildi. Ayrıca, bu sonuçlar sitokrom P450 monooksijenazların NRPS sistemi ile yakın etkileşim içinde çalıştığını göstermiştir (Bischoff ve ark. 2001, Bischoff ve ark. 2005). Şekil 2.10'da görüldüğü gibi monooksijenaz B (OxyB) ve monooksijenaz A (OxyA), 4-hidroksifenilglisin (Hpg4) / 6-hidroksifenilglikolat (Bht6) gibi proteogenik olmayan amino asit halkalarının arasında diaril eterler (C-O-C bağları) oluştururken, OxyC, Hpg5 ve dihidrooksifenilglisin (Dpg7) gibi amino asitlerin arasındaki C-C bağlarını oluşturur (Stegman ve ark. 2006, Cryle ve ark. 2011).

2.1.7. Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotiklerin tedavi amaçlı olarak aşırı miktarda ve gelişigüzel kullanımı birçok bakteri türünün günümüzde mevcut antimikrobiyallerin çoğuna karşı dirençlilik geliştirmesine yol açmıştır. Bundan dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Özellikle hastane enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecalis*'den *Staphylococcus aureus*'a kadar birçok patojenik bakterinin

güncel olarak kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (İkeda ve ark. 2003).



Şekil 2.10. Monooksijenaz enzimlerinin GPA aglikonlarında oluşturduğu bağlantılar. OxyB; C-O-D, OxyA; D-O-E, OxyC; A-B,OxyE; F-O-G, OxyD; C-O-H (Peschke ve ark. 2016)

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 verilerine göre 9.200.000 hastadan 1.700.000'ü tüberkülozdan ölmektedir. 2011 yılında Almanya'da *E. coli* ile enfekte olmuş sebzelerden etkilenen 5000 kişinin 50'sinden fazlası bu enfeksiyonlardan dolayı hayatını kaybetmiştir (Bush ve ark. 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde karbapenemaz üreticisi *Klebsiella pneumonia*'nın yaygın hastane enfesiyonlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Bartlett ve ark. 2013). Yine Birleşik Devletler'de her yıl yaklaşık 19.000 ölümün metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Klevens ve ark. 2007). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2011 yılında yaptığı açıklama doğrultusunda, Avrupa genelinde her yıl 25.000 kişinin dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar sonucu öldüğü rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kan kültürlerinden üçüncü olarak en fazla izole edilen mikroplar *Candida* türleridir (https://www.cdc.gov/drugresistance/us-activities/national-strategy.html). 1980'lerin sonlarında, glikopeptit antibiyotiklerine karşı gelişen direncin enterokoklar ve daha sonra stafilokoklar arasında ortaya çıkması, bu antibiyotiklere bağımlı olan klinik topluluğa çok ciddi problemler yaratmıştır (Binda ve ark. 2014).

Aktinomisetler tarafından üretilen GPA'lar, yarım yüzyılı aşkın bir süredir, bakteriyel enfeksiyonlara karşı mücadelede yoğun olarak kullanılmaktadır. Piyasada kullanılan GPA'ların sınırlı sayıda olması ve bugün hala MRSA ve penisiline dirençli *S.*

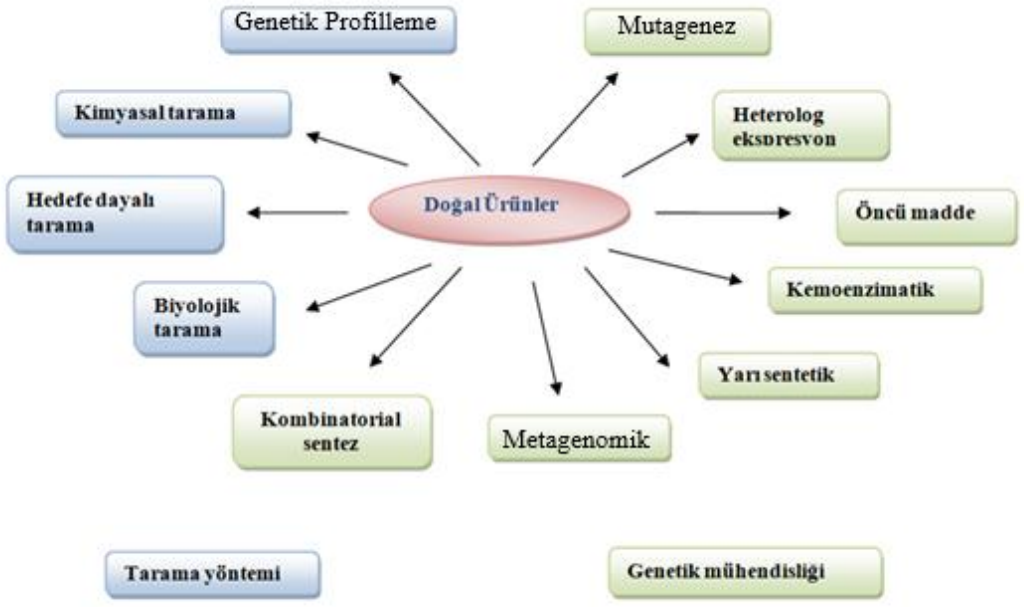
pneumoniae enfeksiyonlarının ilk tedavi seçeneklerinden biri olmaya devam etmesi sebebiyle, GPA'lar klinik olarak kullanılan en önemli antibiyotik sınıfı olma özelliklerini korumaktadır. Ancak, mevcutta kullanılan GPA'lara karşı dirençli enterokokların ve stafilokokların ortaya çıkması, bu alanda yeni glikopeptid bileşiklerinin keşfedilmesi için ihtiyaç oluşturmaktadır.

Vankomisinin klinik başarısı ve diğer antibakteriyel ajanlara kıyasla GPA direncinin geç ortaya çıkması sebebiyle, yeni GPA'ların keşfine odaklanılmıştır. Bu nedenle, 1982'den 1996'ya kadar olan dönemde tanımlanan yeni glikopeptidlerin sayısında ciddi bir artış gözlenmiştir. (Yao ve Crandall 1994). Bu gelişmelere rağmen, 1990'lardan şimdiye kadar çok az sayıda yeni glikopeptid doğal ürün keşfedildiği için, bilinenlerin analoglarının yarı-sentetik olarak veya genetik manipülasyonlarla üretilme yoluna gidilmiştir. (Thaker ve ark. 2013).

2.1.8. Yeni Antibiyotiklerin Tarama Yöntemleri

Yeni biyoaktif bileşiklerin taranmasında üç temel yaklaşım vardır. Bunlardan ilki organizmanın seçimi, ikincisi kültür metotlarının çeşitliliği, üçüncüsü ise bileşiklerin farklı tarama yöntemleriyle ortaya konulmasıdır. Genel olarak doğal ürün tarama stratejileri geleneksel ve yeni yöntemler olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.11). Geleneksel yöntemler biyolojik aktivite temelli olup, organik ekstraktlardan analitik yöntemlerle biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyonu prensibine dayanan kimyasal taramalardır.

Biyoaktif doğal bileşiklerin biyosentez ve modifikasyonu ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Bakteri genomlarında, özellikle dejenere PCR primerleri ile NRPS ve PKS gen dizilerinin taranarak mikroorganizmaların genetik potansiyellerin ortaya çıkarılması biyoaktif metabolitlerin moleküler düzeyde tespiti için kullanılan güncel yöntemlerdendir. Bu strateji özellikle tüm genom dizilimi mevcut olmayan izolatların doğal ürün biyosentez potansiyellerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Shen ve ark. 2006, Donadio ve ark. 2007). Son yıllarda genetik tarama stratejileri yardımıyla GPA'ların biyosentetik gen kümelerinde bulunan dirençlilik, regülasyon, transport ve modifikasyon genlerinin taranmasıyla yeni bir GPA olan pekiskomisin antibiyotiği keşfedilmiştir (Thaker ve ark. 2013).



Şekil 2.11. Doğal ürünlerin keşfinde kullanılan tarama yöntemleri

2.2. Önceki Çalışmalar

Sekonder metabolit biyosentezi ile ilişkili genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır.

NRPS ve PKS genleri şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğunun yapısını oluşturmaktadırlar. Savic ve Vasilevic aktinomisetlerin PKS-I genlerini hedef alarak dizayn ettikleri dejenere primerler yardımıyla iki yeni PKS genini tespit ederek bu genlerin immünbaskılayıcı benzeri bir metabolitin biyosentezinde görevli olduğunu bulmuşlardır (Savic ve Vasilevic 2006).

Özakın ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada NRPS A domainlerini hedef alan dejenere primerler kullanarak 26 tane toprak aktinomiset taranmış ve tüm izloatlarda NRPS varlığı tespit edilmiştir. Yapılan Blastx analizlerine göre NRPS A domainlerinin GenBank'taki en yakın akrabalarına %70'ten daha az bir benzerlik gösterdiğini ve, bitki rizosferleriyle ilişkili aktinomisetlerin NRPS sistemlerindeki A domainlerinin büyük genetik çeşitliliğe sahip olduklarını ortaya koymuşlardır (Özakın ve ark. 2014).

GPA'lar, NRPS'ler tarafından sentezlenen nadir bulunan heptapeptitlerdir. GPA biyosentezinde peptid iskeletlerinin modifikasyonları glikopeptid antibiyotiklerine muazzam bir seçicilik ve işlev sağlar (Pinchman ve ark. 2013). Bu modifikasyonlar

sırasında, amino asit yan zincirlerinin hidroksilasyonu, aromatik yan zincirlerin monooksijenazlar ile çapraz bağlanması, glikozilasyon, metilasyon, sülfasyon, asetilasyon ve ayrıca amino asit kalıntılarının aromatik yan zincirlerinin halojenasyonu meydana gelir (Yim ve ark. 2014).

Wood ve arkadaşları potansiyel olarak bir glikopeptid antibiyotik üreticisi olan *Amycolatopsis* sp. UM16 suşunun genomunda, dejenere primerler yardımıyla GPA iskeletindeki aromatik halkaların oksidasyonunu yapan ve evrimsel açıdan korunmuş monooksigenaz B (*oxy*B) genini elde etmişlerdir. Bu çalışma ile izolatın bir glikopeptid üretme potansiyeline sahip olduğunu kanıtladılar (Wood ve ark. 2006).

Banik ve Brady (2008), yeni GPA'lar bulmak amacıyla farklı toprak örneklerinden elde ettikleri DNA'ları dejenere PCR primerleri kullanarak monoksijenaz C (*oxy*C) genleri açısından taradılar. Yapılan çalışma sonucunda vankomisin ve bir teikoplanin konjeneri tespit ettiler.

Halojenizasyon, glikopeptid modifikasyonun önemli bir örneğidir. Klor atomlarının varlığının GPA'ların etki ve özgünlüğüne katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (Gerhard ve ark. 1993, Pinchman ve ark. 2013). Halojenaz genleri evrimsel süreçte korunduğu için birbirinden farklı GPA'ların ayırt edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu alanda yapılan bir çalışmada, rastgele seçilen 550 aktinomiset izolatı, GPA antibiyotik biyosentez kümesindeki $FADH_2$'ye bağımlı halojenaz genleri açısından taranmıştır. 103 yeni pütatif halojenaz geni tespit edilen bu çalışmada, genlerin şimdiye kadar bulunmuş olan halojenaz genleri ile filogenetik olarak %10 ile %100 arasında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Hornung ve ark. 2007).

Antibiyotik araştırmalarında yeni glikopeptidlerin keşfi diğer doğal ürünler ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Yeni glikopeptid antibiyotik taramalarının yapıldığı bir çalışmada, Thaker ve arkadaşları (2013) kendi kütüphanelerinde bulunan aktinomisetlerden rastgele 1000 aktinomiseti seçerek, bunların genomlarında korunmuş olan GPA modifikasyon, transport ve dirençlilik genlerinin PCR temelli taranması sonucunda yeni bir glikopeptid antibiyotiği olan pekiskomisin gen kümesini tespit etmişlerdir (Thaker ve ark. 2013).

Verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada, daha önce izolasyonu ve teşhisi gerçekleştirilmiş olan *Streptomyces* izolatlarında (Yılmaz ve ark., 2008) yeni GPA'lar bulmak amacıyla bu bileşiklerin modifikasyonundan sorumlu P450 monooksijenaz

genlerinden *oxy*C geni PCR-temelli yaklaşım ile tarandı. Elde edilen monooksijenaz genleri filogenetik olarak incelendi.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller

Vankomisin direnci ve monooksijenaz genleri esas alınarak yeni glikopeptid antibiyotiklerinin (GPA) bulunması amacıyla yapılan çalışmada; 3 farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından daha önce izolasyonları ve moleküler teşhisleri yapılmış olan (Yılmaz ve ark. 2008) olan 40 adet *Streptomyces* izolatında genetik tarama yapıldı (Çizelge 3.1).

Transformasyon deneylerinde *E. coli* DH5α kompetent hücre olarak kullanıldı.

Çizelge 3.1. Biyolojik materyal olarak kullanılan *Streptomyces* izolatları

1	*Streptomyces* sp. AA50	21	*Streptomyces* sp. BAH46
2	*Streptomyces* sp. AA53	22	*Streptomyces* sp. BR57
3	*Streptomyces* sp. AR2	23	*Streptomyces* sp. BS29
4	*Streptomyces* sp. AR3	24	*Streptomyces* sp. BS32
5	*Streptomyces* sp. AR4	25	*Streptomyces* sp. BS39
6	*Streptomyces* sp. AR9	26	*Streptomyces* sp. BS40
7	*Streptomyces* sp. AR12	27	*Streptomyces* sp. BS44
8	*Streptomyces* sp. AR17	28	*Streptomyces* sp. BSH50
9	*Streptomyces* sp. AAH67	29	*Streptomyces* sp. CA16
10	*Streptomyces* sp. AS28	30	*Streptomyces* sp. CA17
11	*Streptomyces* sp. AS29	31	*Streptomyces* sp. CA18
12	*Streptomyces* sp. AS31	32	*Streptomyces* sp. CA19
13	*Streptomyces* sp. AS36	33	*Streptomyces* sp. CA21
14	*Streptomyces* sp. AS37	34	*Streptomyces* sp. CA28
15	*Streptomyces* sp. AS40	35	*Streptomyces* sp. CAH29
16	*Streptomyces* sp. ASH47	36	*Streptomyces* sp. CAH33
17	*Streptomyces* sp. BA1	37	*Streptomyces* sp. CS38
18	*Streptomyces* sp. BA2	38	*Streptomyces* sp. CS41
19	*Streptomyces* sp. BA3	39	*Streptomyces* sp. CS42
20	*Streptomyces* sp. BA5	40	*Streptomyces* sp. CS43

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.2.1. Antibiyotikler

Streptomyces izolatlarının GPA dirençliliğini belirlemek için vankomisin (Roche) kullanıldı.

Ampisilin (Roche) ise rekombinant hücrelerin seçiminde kullanıldı.

3.1.2.2. DNA'ların Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektroforezi deneylerinde; Agaroz (AppliChem), DNA marker (Roche), brom fenol blue (Fermentase), etidyum bromür (AppliChem) kullanıldı.

3.1.2.3. Besiyerleri İçin Kullanılan Kimyasallar

Agar (Sigma Aldrich), sükroz (Merck), malt özütü (Merck), maya özütü (Oxoid), glukoz (Merck), tripton (Difco), triptik soy broth (TSB), nutrient agar (NA) kullanıldı.

3.1.2.4. Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktosit) (Roche), β-galaktosidaz için kromojenik bir substrattır ve bu kimyasalın mavi/beyaz seleksiyonu transformasyon çalışmalarında kullanıldı. Liyofilize halindeki 100 mg X-Gal, 2 ml DMF içerisinde çözüldü. Stok çözelti -20 °C' de muhafaza edildi.

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

3.1.2.5. Diğer Kimyasallar

Etilen diamin tetra asetikasit (EDTA) (AppliChem), tris-baz (Merck), sodyum asetat, gliserol (Merck), kalsiyum klorür (Merck), etil alkol (Merck), sodyum asetat, magnezyum klorür, sodium dodecylsulfate (SDS) (Merck), glisin (Sigma), dimetilformamid (DMF) kullanıldı.

3.1.3. Besiyerleri

M2 besiyeri

4 g maya özütü, 3 g glukoz ve 10 g malt özütü tartılarak final hacmi musluk suyu ile 1 litreye tamamlandı ve 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi. M2 agar hazırlamak için sıvı M2 besiyerine 15 g agar eklendikten sonra sterilizasyon işlemi tekrarlandı.

Triptik Soya Agar (TSA)

Hazırlanan 1 litre TSB içerisine 15 g agar eklendikten sonra 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri soğutularak (yaklaşık 45 °C) final hacmi 10µg/ml olacak şekilde vankomisin eklendi.

Triptik Soya Broth (TSB)

Kromozomal DNA izolasyonu için bakterilerin ön inkübasyonunda kullanıldı. Final hacim 1 L olacak şekilde 30 g TSB üzerine saf su eklendi. Daha sonra 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi.

Maya özütü-Malt özütü (YEME)

TSB ile birlikte DNA izolasyonu için zengin besiyeri olarak bakterilerin üretilmesi için kullanıldı. Malt ve maya özütünden 3'er gr, pepton (Bacto) 5 g, glukozdan 10 g ve sükrozdan 340 g tartılarak final hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı ve 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi. Sterilizasyon sonrasında 0.2 µm por çaoına sahip filtre ile steril edilmiş 2,5 M magnezyum klorürden ($MgCl_2.6H_2O$) 2 ml ve % 20'lik glisinden 25 ml eklenerek hazırlandı.

Lurient Broth (LB) besiyeri

Transformasyon deneylerinde rekombinant kolonileri tespit etmek için kullanıldı. 5 g maya özütü, 10 g tripron, 5 g sodyum klorür tartılarak hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı ve 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi. Lurient agar için hazırlanan 1 litre LB besiyerine 15 g agar eklendi ve 15 dk boyunca 121°C'de 1.2 atm basınç altında otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi.. Soğutulmaya bırakılan besiyeri yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi ve petriye döküldü.

3.1.4. Çözeltiler

50X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA)

TAE buffer'ı 0.05 M EDTA (pH 8), % 5.71 asetik asit, 242 g tris-baz olacak şekilde saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

TSE Tris-HCI Sükroz EDTA (Tris-HCI Sükroz EDTA)

TSE çözeltisinden 100 ml hazırlandı. Daha önceden hazırlanmış 0,1 M Tris-HCl ve 0,1 M EDTA'dan 25'er ml ölçülerek karıştırıldı. Üzerine 15 ml 3 M sükroz eklenerek saf su ile son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.1.5. Enzimler

PCR deneyleri için Taq polimeraz (Roche ve Qiagen) ve kromozomal DNA izolasyonları için RNaz (Fermentas), lizozim (Roche) ve proteinaz K (Omega) enzimleri kullanıldı.

3.1.6. Primerler

Amplikon uzunluğu yaklaşık olarak 800 bp uzunluğunda olan P450 monooksijenaz (*oxy*C) geninin PCR amplifikasyonu için daha önce literatürde rapor edilmiş olan ileri oxyCF (CGGCTGCGSVRGATGCTSAC) ve geri oxyCR (AGRTRRTGGAYGCCGTGCCCGAA) primerleri kullanıldı (Thaker ve ark. 2013). Primerler İontek (İstanbul) şirketinde sentezlettirildi (Dejenere primerlerdeki değişkenler S= G/C değişkeni, Y= C/T değişkeni, V=G/A/C değişkeni, B = G/T/C değişkeni).

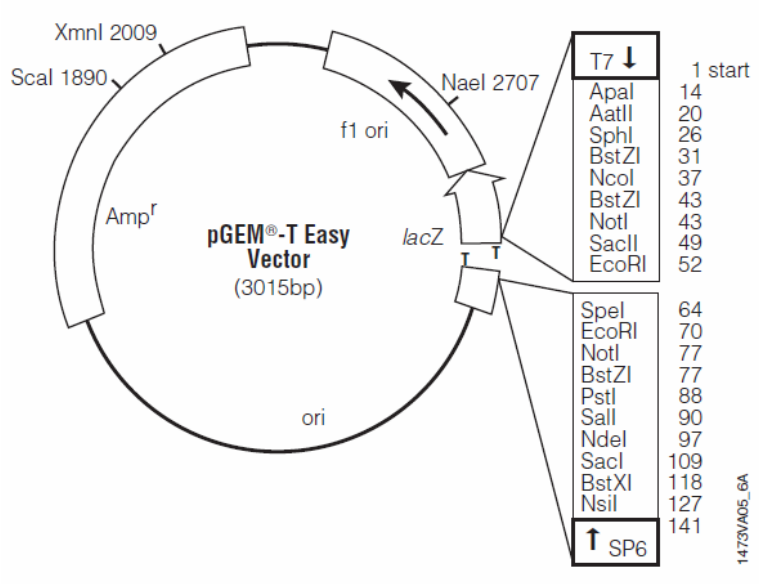
3.1.7. Bu Çalışmada Kullanılan Kitler

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin kromozomal DNA'larının izolasyonu için Omega mini kiti kullanıldı.

PCR ürünlerini jelden geri kazanmak için High Pure DNA saflaştırma kiti (Roche) kullanıldı.

Ligasyon için, içerisinde ligasyon tamponu, pGEM-T Easy vektör (Şekil 3.1), DNA ligaz bulunan pGEM-T klonlama kiti (Promega) kullanıldı.

Bakterilerden plazmit DNA izolasyonu için High Pure plazmit izolasyon kiti (Roche) kullanıldı.



Şekil 3.1. pGEM-T Easy vektör haritası.

3.1.8. Bu Çalışmada Kullanılan Cihazlar

+4 °C buzdolabı (Sanyo), Çalkalamalı inkübatör (Zhicheng ZHWY-200B), Derin Dondurucu (Uğur) Elektroforez tankı (Scie-Plas), Etüv (Heraeus), Güç kaynağı (Bio-Rad), Hassas Terazi (DAİHAN), Isıtıcı – magnetik karıştırıcı (Heildoph), İnkübatör (Velp Scientifica FTC 90 I), Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad), Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör), Magnetik Karıştırıcı (Stuart), Mikropipet (Ependorf), Mini Santrifüj (E.S-6), Otoklav (Hirayama), PCR Cihazı (Eppendorf), pH Metre (Mettler Toledo MP220), Soğutmalı santrifüj (Sigma), Sterilizatör (Heraeus), Su banyosu (Grant LTD 66), UV lambalı laminar Kabin (Telstar AV 100), Vorteks cihazı (VWR)

3.2. Metot

3.2.1. Organizmaların Vankomisinli Ortamda Üretilmesi

Bu çalışmada 40 *Streptomyces* türü vankomisinli ortama ekilmeden önce M2 besiyerinde 3 gün üretildi. Daha sonra M2 besiyerinden alınan izolatların, final konsatrasyonu 10 µg/ml olan vankomisinli TSA (Triptik Soya Agar) besiyerine ekimleri yapıldı. Ekimi yapılan izolatlar vankomisin içeren TSA katı besiyerinde 4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası vankomisin içeren besiyerlerinde üreyen dirençli izolatlar daha sonraki deneyler için seçildi.

3.2.2. Dirençli İzolatların Kromozomal DNA İzolasyonu

Vankomisine en yüksek direnci gösteren 8 izolat seçilerek, % 0.5 maltoz eklenmiş TSB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (230 rpm) 28 C'de 48 saat üretildi. TSB'li besiyerinde üreyen kültürün 2 mililitresi 2:3 oranında TSB-YEME içeren 50 ml zengin sıvı besiyerine aktarılıp çalkalamalı inkübatörde 28 C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda 2 ml'lik ependorf tüplere kültür örneği alınıp, mini santrifüjde 2 dakika maksimum rpm'de santrifüjlendi. Pelet kısmı izolasyon için kullanıldı. Pelet iki kez % 10.3 sükroz çözeltisi ile yıkandıktan sonra kromozomal DNA'lar izole edildi. Kromozomal DNA'lar +4 °C muhafaza edildi.

3.2.3. PCR Amplifikasyonu

İzolasyonları yapılan kromozomal DNA'lar agaroz jelde kaliteleri ve saflıkları incelendikten sonra PCR'da kalıp olarak kullanıldı. İleri oxyCF ve geri oxyCR primerleri kullanılarak pütatif oxyC genleri çoğaltıldı.

Çizelge 3.2. Taq DNA polimeraz Kit (Qiagen) PCR koşulları

• Nükleotid mix 0.2 µM • PCR tamponu % 10 • Her bir primer 0.4 µM • GC tampon % 10 • $MgCl_2$ (25 mM) gerekli olduğunda • Taq DNA polimeraz 1U • Kromozomal DNA 100 ng • PCR mix hacmi 50µl	• 95 °C 5 dk başlangıç denatürasyonu 1 döngü • 95 °C 30 sn • 55 °C 1 dk } 35 döngü • 72 °C 1 dk • 72 °C 10 dk- final 1 döngü

Standart PCR koşullarında ürün elde edilemediği zaman PCR optimizasyonları yapıldı.

3.2.4. DNA'ların Görüntülenmesi

İzole edilen DNA'lar % 0.8'lik, agaroz jelde incelendi. PCR ürünlerini görüntülemek için % 1'lik agaroz jel. kullanıldı. TAE tamponuyla hazırlanan agaroz jele 0.5µg/ml EtBr eklendi, DNA ve PCR ürünleri 1:5 oranında BFB: DNA karışımı yapılarak karışımlar elektroforez tankına yüklendi. 90 volt gücündeki elektrik alanında DNA'lar yürütüldü.

3.2.5. Pütatif Monooksijenaz Genlerinin Jelden Ekstraksiyonu

Sekans uzunlukları yaklaşık 800 bp olan pütatif *oxy*C genleri agaroz jelden izole edildi.

3.2.6. *E. coli* DH5α İzolatının Transformasyon İçin Hazırlanması

LB besiyerinde ön inkübasyon için *E. coli* DH5α bakterisinin ekimi yapıldı ve 250 rpm'de 37 °C'de, 220 rpm'de bir gece boyunca üretildi. Üretilen kültürden 1ml alınarak taze LB besiyerine ekildi ve 2 saat 250 rpm 37 °C'de üretildi. Kültürün optik densitesi $O.D_{550}$= 0.3-0.4'e geldiği zaman santrifüj tüplerine alındı ve 10 dakika buzda bekletildi. 4000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine soğutulmuş 10 mM kalsiyum klorürden 5ml eklendi. 3000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı hücrelerin üzerine 75 mM kalsiyum klorür eklendi. Homojen karışım elde ettikten sonra 192:108 oranında, kompetent hücre: % 50'lik gliserol bir birine ilave edilerek -80 °C'de muhafaza edildi..

3.2.7. Pütatif monooksijenaz genlerinin klonlanması, rekombinantların transformasyonu ve seçimi

Ligasyon karışımının total hacimi 10 µl olacak şekilde 5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl pGEM-T plazmit, 300-400 ng PCR ürünü ve 1 µl DNA ligaz enzimi eklendi, hacim steril distile su ile tamamlanarak verimli bir ligasyon için bir gece 16 °C'de inkübe edildi.

İnkübasyon süreleri dolan ligasyon ürünleri kompetent hücrelerle bir araya getirilerek 30 dakika buzda bekletildi, bu sürenin sonunda hücreler 70 saniye 42 °C'deki su banyosuna bırakıldı ve tekrar buza alınıp 5 dakika buzda bekletildi. Bütün bu işlemlerden sonra hücrelere 1 ml LB besi yeri ilave edildi ve 2 saat boyunca 150 rpm'de 37 °C'de orbital çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda önceden IPTG ve X-Gal yayılmış 100 µg/µl ampisilin içeren katı LB besiyerine yayma yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda beyaz renkli ampisiline dirençli pütatif rekombinant koloniler mavi renkli kolonilerden seçilerek ayrıldı.

3.2.8. DNA Dizileme

Saflaştırılan PCR ürünlerinin DNA dizi analizi Sanger metodu kullanılarak İontek şirketine (İstanbul) yaptırıldı.

3.2.9. Genlerin analizi

Dejenere primerler kullanarak izolatlarımızdan elde edilen pütatif P450 monooksijenaz (*oxy*C) gen dizileri NCBI'da Blastx analizine tabii tutuldu.

Filogenetik analizler MEGA6 (Tamura ve ark. 2007) programı kullanılarak yapıldı. Filogenetik ağaç Neighbor-Joining yöntemiyle çizildi. Daha önce bulunmuş GPA'ların monooksijenaz genlerinin (*oxy*A, *oxy*B ve *oxy*C) amino asit dizilerinin yanı sıra NRPS, PKS enzim sistemleri tarafından üretilen biflaviolin, melanin, himastatin, arilomisin, aktinomisin ve GPA türevi olan zorbamisin bileşiklerinin sitokrom P450 genlerinin amino asit dizileri de filogenetik ağaca dahil edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Vankomisine Dirençli İzolatların Belirlenmesi

Kullandığımız izolatların vankomisine direnç gösterip göstermediklerini belirlemek için vankomisinli ortama ekimi yapılan izolatlar 5 günlük inkübasyon boyunca gözlemlendi. 40 izolattan 24 tanesinde farklı derecelerde vankomisin dirençliliği tespit edildi. İzolatların vankomisinli ortamda üremelerine göre çizelge 4.1'deki gibi koloni sayılarıyla orantılı kalitatif bir dirençlilik değerlendirilmesi yapıldı. Yüksek dirençlilik (+++) gösteren 8 izolat sonraki deneyler için kullanıldı.

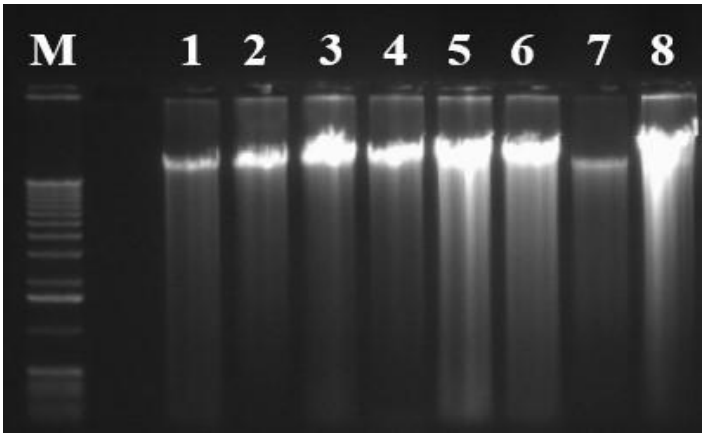
Çizelge 4.1. Vankomisine dirençli izolatların belirlenmesi.

Vankomisinli Ortamda Üreyen İzolatlar			
Organizma		**Organizma**	
Streptomyces sp. AA53	+	*Streptomyces* sp. BS29	+++
Streptomyces sp. AR2	+	*Streptomyces* sp. BS39	+++
Streptomyces sp. AR3	++	*Streptomyces* sp. BS44	++
Streptomyces sp. AR9	+	*Streptomyces* sp. BR57	++
Streptomyces sp. AR12	++	*Streptomyces* sp. BSH50	+
Streptomyces sp. AAH67	+	*Streptomyces* sp. CA16	+
Streptomyces sp. AS29	+	*Streptomyces* sp. CA17	+++
Streptomyces sp. AS31	+	*Streptomyces* sp. CA18	+++
Streptomyces sp. AS36	+++	*Streptomyces* sp. CA19	+++
Streptomyces sp. BA1	+	Streptomyces sp. CAH33	++
Streptomyces sp. BA5	+	*Streptomyces* sp. CS38	+++
Streptomyces sp. BAH46	+++	*Streptomyces* sp. CS41	+

+; az dirençli, ++; orta dirençli, +++; çok dirençli.

4.1.2. Kromozomal DNA'ların eldesi

Vankomisine yüksek dirençlilik gösteren 8 tane izolattan elde edilen kromozomal DNA'lar Şekil 4.1'de görülmektedir.

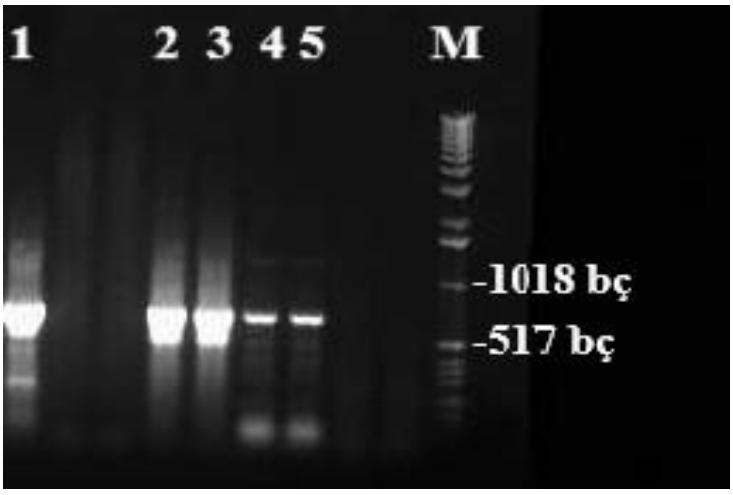


Şekil 4.1. İzole edilen kromozomal DNA'lar: 1. *Streptomyces* sp. AS36, 2. *Streptomyces* sp. BAH46, 3.*Streptomyces* sp. BS29, 4.*Streptomyces* sp. BS39, 5. *Streptomyces* sp. CA17, 6. *Streptomyces* sp. CA18,7. *Streptomyces* sp. CA19, 8. *Streptomyces* sp. CS38

4.1.3. Monooksijenaz Genlerinin PCR ile Taranması

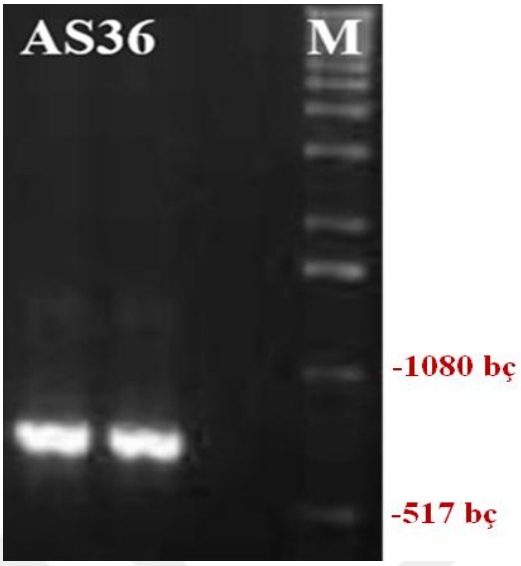
PCR ile pütatif *oxy*C genleri çoğaltıldı. Vankomisine direnç gösteren izolatların tümünde farklı optimizasyonlar sonucunda ürün elde edildi.

Standart PCR koşullarında amplifikasyon gerçekleşmeyen izolatlarda, primer bağlanma sıcaklığı 62-57 °C aralığında bir gradient yapılarak uygulandı. Bu reaksiyonda $MgCl_2$ miktarı 4.5 mM'a çıkarılarak Şekil 4.2' de belirtilen izolatlardan istenilen bölgede ürün elde edildi.



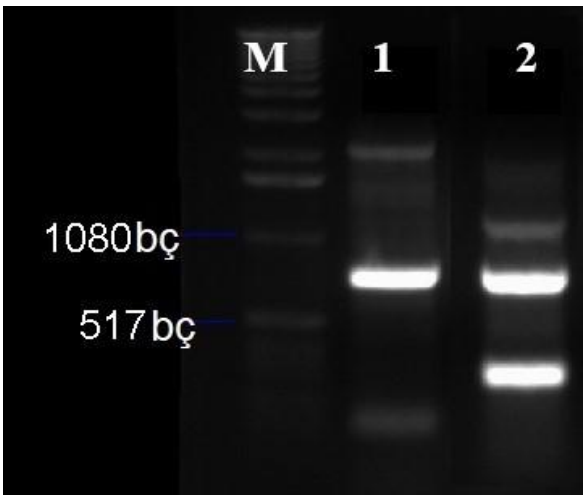
Şekil 4.2. PCR sonucunda elde edilen ürünler:1. *Streptomyces* sp. BAH46, 2. *Streptomyces* sp. CA17, 3. *Streptomyces* sp. CA18, 4, *Streptomyces* sp. BS29, 5. *Streptomyces* sp. BS39.

Primer bağlanma sıcaklığı 61-56 °C' aralığında ve $MgCl_2$ miktarı 3.5 mM olarak değiştirildiğinde *Streptomyces* sp. AS36'da ürün elde edildi (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. AS36'ya ait PCR sonucu.

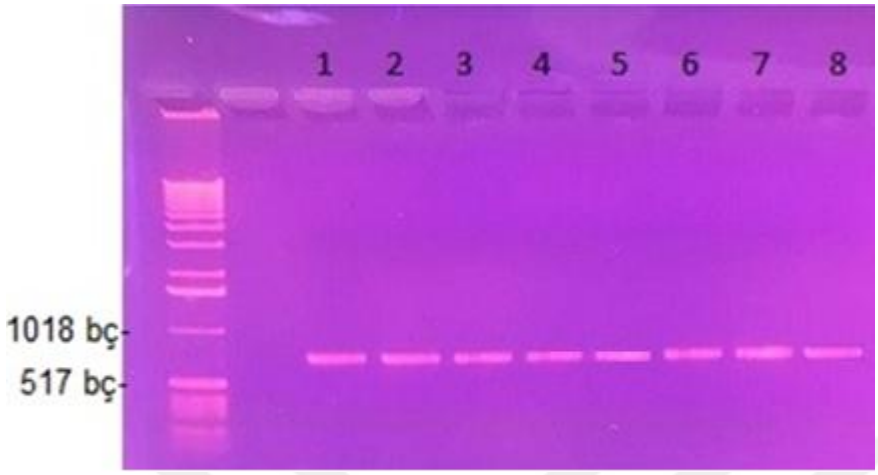
Primer bağlanma sıcaklığı ve magnezyum konsantrasyonları değişimleri sonucunda ürün elde edemediğimiz izolatlarda kullanılan Taq polimeraz değiştirilerek taramalar yapıldı. Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) kullanılarak *Streptomyces* sp. CA19 ve *Streptomyces* sp. CS38 için, sırasıyla, 2.5 ve 4.5 mM $MgCl_2$ kullanarak, 61-56 °C aralığındaki bağlanma sıcaklığında Şekil 4.4'te görülen amplifikasyonlar elde edildi.



Şekil 4.4. 1. *Streptomyces* sp. CA19, 2. *Streptomyces* sp. CS38'in PCR sonuçları

4.1.4. PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması

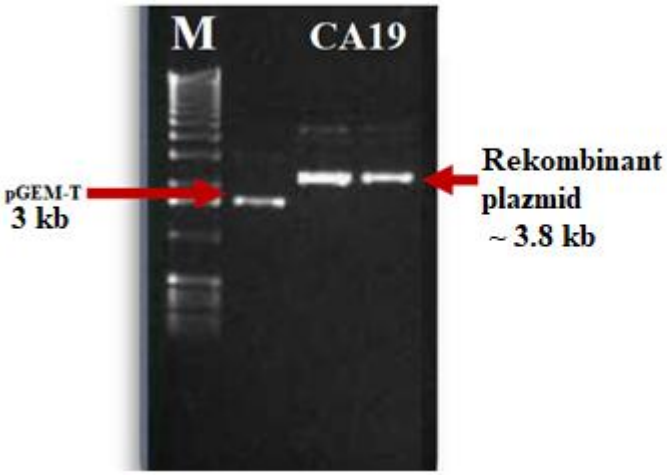
Monooksijenaz PCR ürünleri jelden kazanılarak konsantrasyon ve kalite açısından agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Pütatif OxyC genlerinin jelden geri alınması. 1. *Streptomyces* sp. AS36, 2. *Streptomyces* sp. BAH46, 3. *Streptomyces* sp. BS29, 4. *Streptomyces* sp. BS39, 5. *Streptomyces* sp. CA17, 6. *Streptomyces* sp. CA18, 7. *Streptomyces* sp. CA19, 8. *Streptomyces* sp. CS38.

4.1.5. Pütatif *oxy*C Genlerinin T-Vektörlere Klonlanması

Elde edilen PCR ürünleri T-vektörlere klonlandı. *Streptomyces* sp. CA19 izolatının *oxy*C ürünün rekombinant plazmidi Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. CA19 izolatına ait PCR ürününü taşıyan rekombinant plazmitler.

4.1.6. Biyoinformatik İncelemeler

Pütatif monooksijenaz genleri ileri ve geri primerler kullanılarak çift yönlü olarak dizilendi. DNA dizilimleri NCBI web sitesinde Blastx programlarında homoloji incelemelerine tabi tutuldu (Çizelge 4.2). BAH46 izolatının PCR ürünü spesifik olarak

görünmesine rağmen Blastx incelemesi sonucunda herhangi bir sitokrom P450 geni ile eşleşmediği görüldü. Elde edilen diğer PCR ürünlerinin ise spesifik olduğu Çizelge 4.2'deki farklı aktinomisetlere özgü sitokrom p450 genleri ile farklı oranlarda benzerlik gösterdiği bulundu.

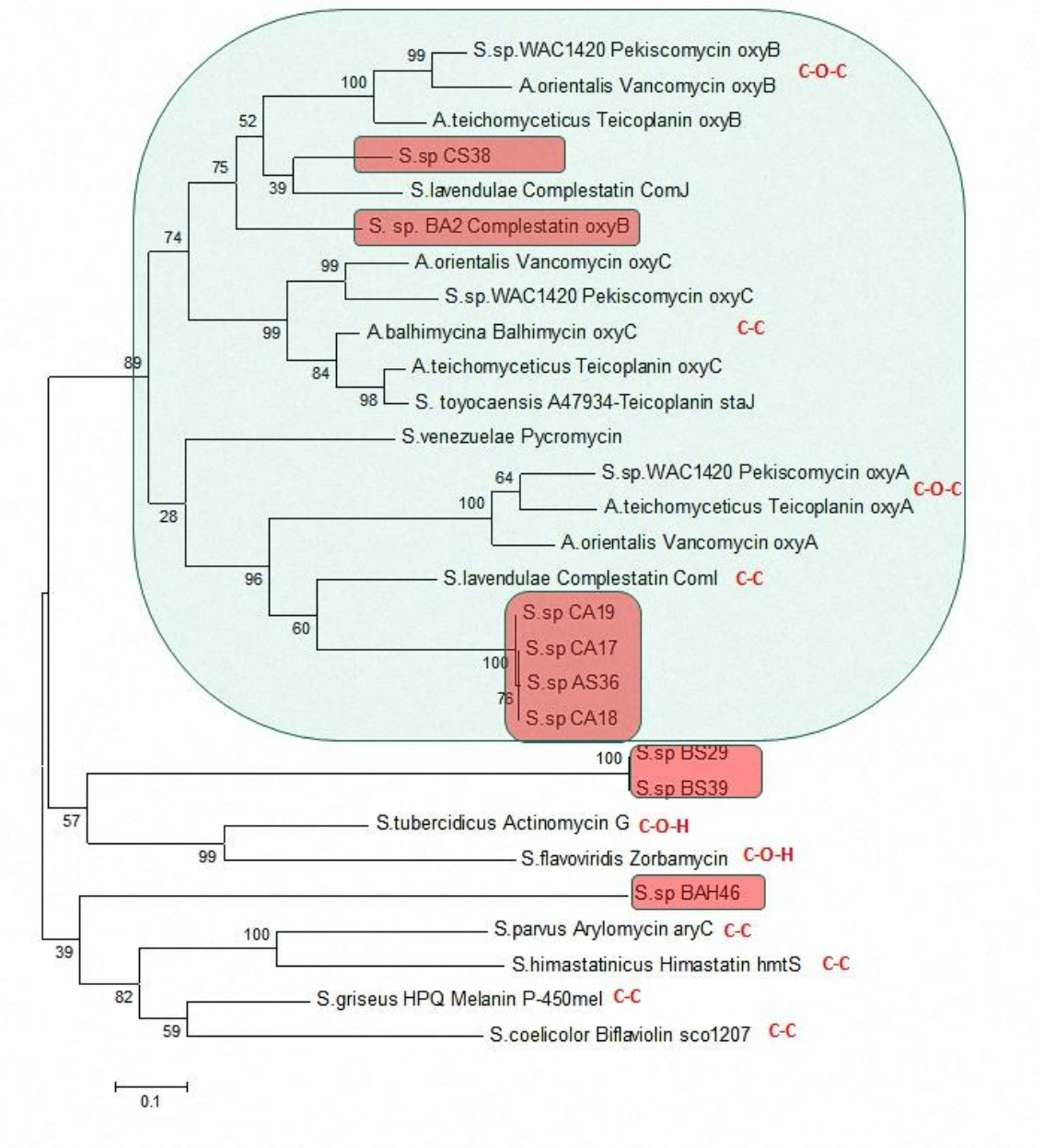
Çizelge 4.2. Pütatif P450 monooksijenaz genlerinin Blastx sonuçları.

İzolat	Gen Bankasındaki en yakın organizma	Gen Bankası Giriş No	Benzerlik %
Streptomyces sp. AS36	Sitokrom P450 *Streptomyces atriruber*	WP_055569258.1	92
Streptomyces sp. BAH46	Herhangi bir sitokrom P450 geni ile eşleşmedi.	-	-
Streptomyces sp. BS29	Sitokrom P450 *Streptomyces auratus* AGR0001	KWT59463.1	91
Streptomyces sp. BS39	Sitokrom P450 *Nocardia pneumoniae*	EJJ06395.1	89
Streptomyces sp. CA17	Sitokrom P450 *Streptomyces atriruber*	WP_040782693.1	93
Streptomyces sp. CA18	Sitokrom P450 *Streptomyces atriruber*	WP_055569258.1	93
Streptomyces sp. CA19	Sitokrom P450 *Streptomyces atriruber*	WP_055569258.1	92
Streptomyces sp. CS38	Sitokrom P450 *Streptomyces* sp. NRRL S-920	WP_030775365.1	94

4.1.7. Elde Edilen DNA Dizilerinin Filogenetik İncelenmesi

Elde edilen pütatif P450 monooksijenaz genlerinin gerek GPA gerekse diğer antibiyotiklerin biyosentez gen kümesinde bulunan P450 monooksijenazlar ile akrabalık derecesini belirlemek üzere filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.7).

İzolatlarımızdan elde edilen P450 monooksijenaz genlerinin diğer antibiyotik gen kümelerindeki monooksijenazlarla yakın ilişkili olduğu gözlendi. Örneğin BS29 ve BS39 izolatlarına ait genlerin bir GPA türevi olan zorbamisin ve peptid bir bileşik olan aktinomisin G monooksijenazları ile kümeleştiği tespit edildi. CS38 izolatından elde edilen gen, bir GPA olan komplestatinin diaril eter yapısını C-O-C bağları ile oluşturan *com*J (*oxy*B ile homolog) geni ile aynı taksonda yer almaktadır. Bir diğer izolat olan BAH46 ise arilomisin gibi yeni sınıf bir doğal antibiyotik ve himastatin gibi bir peptid antitümör antibiyotiğinin sitokrom P450 geni ile yakın ilişki gösterdi. *Streptomyces* spp. CA19, CA17, AS36 ve CA18'e ait genlerin birbiri ile kümeleştiği ve *S. lavendulae*'nin *Com*l (oxyA ile homolog) ile aynı taksonda yer aldığı tespit edildi.



Şekil 4.7. Elde edilen pütatif p450 monoksigenaz genlerinin farklı antibiyotiklerin biyosentez kümelerinde yer alan diğer monooksijenaz genleri ile moleküler filogenetik analizleri.

4.2. Tartışma

Yeni antibiyotik tarama stratejilerinin gelişmesine paralel olarak son yıllarda halk sağlığını ve biyolojik dengeyi çok ciddi şekilde tehdit eden antibiyotik direnci küresel bir sorun haline gelmiştir. Sadece Amerika ve Avrupa kıtasında her yıl 25.000'den fazla insan dirençli bakteri enfeksiyonlarından dolayı yaşamını yitirmektedirler. Bu ölümlerin, 2050 yılına kadar tüm dünyada, her yıl periyodik olarak (10 milyondan fazla) artacağı tahmin edilmektedir (WHO Report 2017). Bu sorun yeni ve değerli antibiyotiklere olan ihtiyacı açıkça göstermektedir.

Son yıllarda doğal ürün keşif çalışmalarındaki gerilemenin en önemli nedeni geleneksel tarama stratejilerin yetersiz kalarak daha önce bulunmuş bileşiklerin tekrardan bulunması ve mikroorganizmalardaki biyosentetik potansiyelin tespit edilememesidir. Günümüzde antibiyotik keşif çalışmalarının en güncel yöntemlerinden biri mikroorganizmaların genom dizilerinde bulunan genlerin veya gen kümelerinin incelenmesidir. DNA dizilimi maliyetlerinin de ucuzlamasıyla araştırmacılar yönlerini genetik taramalara çevirdiler. Mikrobiyal metabolitlerin biyosenteziyle ilişkili genlerin PCR ile taranması mikroorganizmaların özellikle de aktinomisetlerin biyosentetik potansiyelini ve aynı yapısal iskeleti taşıyan bileşiklerin kimyasal çeşitliliğini ortaya çıkarmaktadır (Ayuso ve Genilloud 2005, Wright 2012, Thaker ve ark. 2013). Bu yeni yaklaşıma göre antibiyotik biyosentezindeki karakteristik genleri tespit etmek için PCR oligonükleotidlerinin tasarımı, o antibiyotik sınıfının sentezine özgü bir gene dayanmalıdır. Ayrıca, hedef genin ürünü, çekirdek antibiyotik yapısının sentezinde yer almalıdır, böylece PCR primerleri, bu antibiyotik sınıfı için evrensel olacaktır (Gonzales ve ark. 2005, Wood ve ark. 2007).

Glikopeptid antibiyotikleri aktinomisetlerden elde edilen, Gram pozitif enfeksiyonlara karşı klinikte 50 yıldan uzun bir süredir kullanılan ve diğer antibiyotiklere kıyasla en az dirence maruz kalmış oldukça değerli antibiyotiklerdir. Antibiyotik araştırmalarında yeni glikopeptidlerin keşfedilme olasılığının diğer doğal ürünler ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu bazı çalışmalarda ortaya konmuştur (Baltz 2006, Thaker ve ark. 2013).

Antibiyotik üretici organizmalar ürettikleri antibiyotiklerin etkilerinden kurtulmak için özel bir direnç mekanizmaları geliştirirler. Antibiyotik biyosentez genleri, genomda, tipik olarak biyosentez ve dirençlilik genlerini içeren kümeler halinde bulunmaktadırlar. Bulunma frekansı düşük olan güçlü antibiyotiklerin iskelet yapılarındaki korunmuş spesifik genleri binlerce aktinomisetin genomunda genetik olarak taramak oldukça güçtür. Bunun yerine antibiyotik üretici organizmaların direnç mekanizmalarından faydalanarak istenilen antibiyotik sınıfını bulma olasılığını arttırmak mümkündür (Wright 2007, Cundliffe ve ark. 2010, Thaker ve ark. 2013).

3 farklı endemik bitkinin kök çevresinden izole edilen *Streptomyces* türlerini vankomisin dirençliliğinden yola çıkarak, dirençli olanların GPA üretme potansiyellerinin incelendiği çalışmamızda; 40 tane *Streptomyces* izolatının 24

tanesinde farklı oranlarda vankomisin direnci tespit edildi. Literatürle kıyaslandığında (Thaker ve ark. 2013) direncin bu denli yüksek olmasının sebebinin, spesifik GPA dirençliliği olmayıp aktif pompa sistemlerinden kaynaklı (efflux pump) olabileceği düşündürmektedir. Efflux pompaları, bakterilerin sentezledikleri antibiyotiklerin biyolojik aktivitelerinden etkilenmeden kendi kendine direnç sağlayan, antibiyotik üreten bakterilerde sıklıkla gözlenen doğal bir antibiyotik direnç mekanizmasıdır (Webber ve Piddock 2003, D'costa ve ark. 2006). Bu pompalar, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltarak aktif olarak bakteriyel hücrelerin sitozolünden ilaçları çıkartarak çalışır. (Webber ve Piddock 2003, Balganesh ve ark. 2012). Ayrıca GPA biyosentez gen kümelerinde bulunan ve dirençten sorumlu spesifik VanHAX operonun dışında dirence destek veren ABC transporter genlerinin de mevcut olduğu rapor edilmiştir (Chiu ve ark. 2001, Thaker ve ark. 2013).

Bu çalışmada, nadir bulunan glikopeptid antibiyotiklerin tümünün gen kümelerinde bulunan ve aromatik halkaların arasında karbon-karbon biaril (C-C) veya diaril eter (C-O-C) bağı kuran monooksijenaz genleri 8 tane vankomisine dirençli S*treptomyces* izolatının genomunda tarandı. GPA üreticilerinin GPA dirençlilik genlerinin antibiyotiğin biyosentez gen kümesinde bulunma olasılığından ötürü, dirençli olan türlerin GPA üretme potansiyeline sahip olabileceği hipotezinden yola çıkarak ilgili genler vankomisine dirençli olan izolatlarda tarandı. Bu strateji daha önce Thaker ve ark. (2013) tarafından metagenomik olarak uygulanmış ve yeni bir GPA antibiyotiği olan pekiskomisinin keşfine yol açmıştır.

Bu çalışmada kullandığımız monooksijenaz (*oxy*C) geni glikopeptid bileşiklerinin yapısında iki aromatik halka arasında karbon-karbon bağı yaparak bu antibiyotik sınıfına özgüllük sağlar. Glikopeptid bileşiklerinin yapısındaki evrimsel olarak oldukça korunmuş olan bu gen üzerindeki nükleotid değişimleri GPA'ların farklı tiplere ayrılmasını sağlar (Banik ve Brady 2008, Thaker ve ark. 2013, Yim ve ark. 2014). Ancak literatürde *oxy*C genini çoğaltmak üzere kullanılan primerler, yaptığımız çalışmalar sonucunda hedeflediğimiz *oxy*C geni yerine filogenetik ağaçta da görüldüğü gibi hem diğer antibiyotiklerin monooksijenaz genlerini hem de bir GPA olan komplestatin antibiyotiğinin *oxy*B ve *oxy*A genleriyle yakın ilişkili genleri amplifiye etti.

GPA gibi önemli antibiyotiklerin yapılarında 3, 4 veya 5 monooksigenaz geni bulunmaktadır (*oxy*A, *oxy*B, *oxy*C, *oxy*D ve *oxy*E). GPA'larda *oxy*C geni komplestatinin yapısında bulunmazken *oxy*E geni sadece teikoplanin tipi GPA'ların yapılarında bulunur. Bu çalışmada elde edilen genlerden CS38, CA19, CA17, AS36 ve CA18 izolatlarına ait olanların GPA biyosentez gen kümesine ilişkin genler olduğu görülmektedir. CS38 geninin bir *oxy*B homoloğu olan komplestatin comJ geni ile, diğer izolatların ise bir *oxy*A homoloğu olan coml ile eşleşmiş olması bunu destekler niteliktedir. Ayrıca elde edilen genlerin filogenetik ağaçta bulunan diğer GPA'lara ait genler ile ayrı taksonlarda yer almış olması, kullanılan izolatların yeni birer GPA üretebilme potansiyellerini işaret etmektedir. Çalışmamızda elde edilen monooksijenaz genleri yalnızca GPA değil aynı zamanda diğer antibiyotiklerin biyosentetik kümelerinde bulunan monooksijenazlarla akrabalık göstermektedir. Dolayısıyla bu genler başka bir doğal bileşiğin gen kümesinin bir parçası olabilirler.

Yeni GPA'lar bulmak üzere, GPA biyosentezinde görevli bir monooksijenaz genini taradığımız çalışmamızda, bu geni çoğaltmak için kullandığımız primerlerin, gerek GPA gerekse başka doğal antibiyotiklerin gen kümelerinde bulunan diğer monooksijenaz genlerine de bağlandığı göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen genlerin tipik GPA bileşikleri ile ilişkili fakat filogenetik olarak ayrı konumlanması, kulanılan izolatların yeni olmaya aday GPA bileşikleri üretebilme potansiyelini göstermektedir. Bu çalışmanın diğer bir sonucu ise; *oxy*C geninin tek başına yeni GPA iskeleti taramak için yeterli olmadığı, bunun yanısıra diğer monooksijenaz genleri (*oxy*A, *oxy*B ve *oxy*E) veya halojenaz gibi diğer GPA modifikasyon genlerinin dahil edilmesiyle ancak yeni GPA'ların ortaya çıkarılabileceği sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalar bu doğrultuda devam ettirilecektir.

.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Vankomisine yüksek oranda dirençlilik gösteren 8 izolatın genomunda taranan monooksijenaz genleri tüm izolatlardan elde edildi.

2. Yapılan BLAST analizlerinde bu genlerin farklı *Streptomyces* türlerine ait sitokrom P450 genleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği bulundu.

3. Elde edilen genler, GPA ve başka antibiyotiklerin biyosentez gen kümelerinde bulunan sitokrom monooksijenaz genleri ile filogenetik ilişki açısından incelendiğinde, bu çalışmadaki genlerin hem GPA hem de diğer antibiyotik monooksijenaz genleri ile akrabalık ilişkisine sahip olduğu tespit edildi.

4. *Streptomyces* sp. CS38 geninin bir *oxy*B homoloğu olan komplestatin *com*J geni ile diğer izolatların ise bir *oxy*A homoloğu olan *com*I ile eşleşmiş olması bu genlerin GPA biyosentez gen kümesine ilişkin genler olduğu göstermektedir. Benzerliğin güçlü olmaması bu izolatların genomlarında yeni olmaya aday GPA'lar olabileceğini düşündürmektedir.

5. *Streptomyces* sp. BS29 ve BS39 izolatlarından elde edilen monooksijenaz genlerinin, yapısında C-O-H bağı yapan GPA türevi olan ve antitümör aktivitesine sahip zorbamisinle aynı taksonda olması bu genlerin yeni bir GPA türevli bileşiğe ait olabileceğini düşündürmektedir.

6. Bu çalışmada kullanılan bir diğer *Sterptomyces* izolatı olan BAH46'dan elde edilen monoksijenaz geninin yeni bir antibiyotik olan arilomisin antibiyotiğinin C-C bağını yapan sitokrom P450 geniyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

7. Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda kullandığımız yerel *Streptomyces* izolatlarının hem yeni GPA bileşikleri hem de diğer antibiyotik bileşiklerinin üreticileri olması muhtemeldir.

6. KAYNAKLAR

Acker, R. F., & Lechevalier, H. (1954). Some nutritional requirements of Streptomyces griseus 3570 for growth and candicidin production. *Applied microbiology*, *2*(3), 152.

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(7), 465.

Angell, S., Bench, B. J., Williams, H., & Watanabe, C. M. (2006). Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action. *Chemistry & biology*, *13*(12), 1349-1359.

Anstead, G. M., Cadena, J., & Javeri, H. (2014). Treatment of infections due to resistant Staphylococcus aureus. In *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols* (pp. 259-309). Humana Press, Totowa, NJ.

Ayuso-Sacido, A., & Genilloud, O. (2005). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial ecology*, *49*(1), 10-24.

Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., & Somasundaram, S. T. (2010). L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci*, *4*(5), 698-705.

Balganesh, M., Dinesh, N., Sharma, S., Kuruppath, S., Nair, A. V., & Sharma, U. (2012). Efflux Pumps of Mycobacterium tuberculosis play a significant role in anti-tuberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-06003.

Banik, J. J., & Brady, S. F. (2008). Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(45), 17273-17277.

Barabote, R. D., Xie, G., Leu, D. H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., ... & Parales, R. E. (2009). Complete genome of the cellulolytic thermophile Acidothermus cellulolyticus 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome research*.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 1-43.

Barna, J. C., Williams, D. H., Stone, D. J., Leung, T. C., & Doddrell, D. M. (1984). Structure elucidation of the teicoplanin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, *106*(17), 4895-4902.

Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *56*(10), 1445-1450.

Bayly, C. L., & Yadav, V. G. (2017). Towards precision engineering of canonical polyketide synthase domains: recent advances and future prospects. *Molecules*, *22*(2), 235.

Baz, J. P., Canedo, L. M., Puentes, J. L. F., & ELIPE, M. V. S. (1997). Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine Micromonospora. *The Journal of antibiotics*, *50*(9), 738-741.

Behie, S. W., Bonet, B., Zacharia, V. M., McClung, D. J., & Traxler, M. F. (2017). Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products in situ. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2149.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... & Bateman, A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3 (2). *Nature*, *417*(6885), 141.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, *58*(1), 1.

Beyer, M., & Diekmann, H. (1985). The chitinase system ofStreptomyces sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *23*(2), 140-146.

Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, *8*(2), 208-215.

Binda, E., Marinelli, F., & Marcone, G. (2014). Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics*, *3*(4), 572-594.

Bischoff, D., Pelzer, S., Bister, B., Nicholson, G. J., Stockert, S., Schirle, M., ... & Süssmuth, R. D. (2001). The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide

antibiotics—The order of the cyclization steps. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*(24), 4688-4691.

Blaskovich, M. A., Hansford, K. A., Butler, M. S., Jia, Z., Mark, A. E., & Cooper, M. A. (2018). Developments in glycopeptide antibiotics. *ACS infectious diseases*, *4*(5), 715-735.

Boone, C. J., & Pine, L. (1968). Rapid method for characterization of actinomycetes by cell wall composition. *Applied microbiology*, *16*(2), 279-284.

Brigham, R. B., & Pittenger, R. C. (1956). Streptomyces orientalis, n. sp., the source of vancomycin. *Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill.)*, *6*(11), 642-647.

Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., ... & Tunac, J. B. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, *15*(3), 361-367.

Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., ... & Lerner, S. A. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), 894.

Butler, M. S., Hansford, K. A., Blaskovich, M. A., Halai, R., & Cooper, M. A. (2014). Glycopeptide antibiotics: back to the future. *The Journal of Antibiotics*, *67*(9), 631.

Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P., & Kucherov, G. (2007). NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic acids research*, *36*(suppl_1), D326-D331.

Cane, D. E., Walsh, C. T., & Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, *282*(5386), 63-68.

Cannell, R. J. (1998). How to approach the isolation of a natural product. In *Natural products isolation* (pp. 1-51). Humana Press.

CDC, 2014. National Strategy for Combating Antibiotic Resistant Bacteria Report. Erişim: https://www.cdc.gov/drugresistance/us-activities/national-strategy.html Erişim Tarihi: 27.02.2018

Chen, Y. P., Guo, R., Liu, N., Liu, X., Mao, Y. P., Tang, L. L., ... & Ma, J. (2015). Efficacy of the additional neoadjuvant chemotherapy to concurrent chemoradiotherapy

for patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a Bayesian network meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Cancer*, *6*(9), 883.

Cheng, Y. Q., Tang, G. L., & Shen, B. (2002). Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in Streptomyces atroolivaceus S-140. *Journal of bacteriology*, *184*(24), 7013-7024.

Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., & Kinghorn, A. D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS journal*, *8*(2), E239-E253.

Chiu, H. T., Hubbard, B. K., Shah, A. N., Eide, J., Fredenburg, R. A., Walsh, C. T., & Khosla, C. (2001). Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8548-8553.

Coon, M. J. (2005). Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *45*, 1-25.

Cryle, M. J., Staaden, J., & Schlichting, I. (2011). Structural characterization of CYP165D3, a cytochrome P450 involved in phenolic coupling in teicoplanin biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, *507*(1), 163-173.

Cundliffe, E., & Demain, A. L. (2010). Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *37*(7), 643-672.

Darken, M. A., Berenson, H., Shirk, R. J., & Sjolander, N. O. (1960). Production of tetracycline by Streptomyces aureofaciens in synthetic media. *Applied microbiology*, *8*(1), 46-51.

D'costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, *311*(5759), 374-377.

Dejong, P. J. (1972). L-Asparaginase production by Streptomyces griseus. *Applied microbiology*, *23*(6), 1163-1164.

Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. In *History of modern biotechnology I* (pp. 1-39). Springer, Berlin, Heidelberg.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Donachie, W. D. (1993). The cell cycle of Escherichia coli. *Annual Reviews in Microbiology*, *47*(1), 199-230.

Donadio, S., Monciardini, P., & Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Natural product reports*, *24*(5), 1073-1109.

Dulmage, H. T. (1951). *The Production of Neomycin by Streptomyces Fradiae 3535* (Doctoral dissertation, Rutgers University).

Elliot, M. A., Buttner, M. J., & Nodwell, J. R. (2008). Multicellular development in Streptomyces. *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, 419-438.

El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(7), 1505-1520.

Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018). Nonribosomal peptides and polyketides of Burkholderia: New compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(30), 29794-29807.

Farmer, P. B., & Suhadolnik, R. J. (1972). Nucleoside antibiotics. Biosynthesis of arabonofuranosyladenine by Streptomyces antibioticus. 10. *Biochemistry*, *11*(5), 911-916.

Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., & Thomas, M. G. (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular pharmaceutics*, *5*(2), 191-211.

Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, *58*, 453-488.

Fisch, K. M. (2013). Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Advances*, *3*(40), 18228-18247.

Flärdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in Streptomyces. *Current opinion in microbiology*, *6*(6), 564-571.

Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(1), 36.

Garcia, I., Vior, N. M., Braña, A. F., González-Sabin, J., Rohr, J., Moris, F., ... & Salas, J. A. (2012). Elucidating the biosynthetic pathway for the polyketide-nonribosomal peptide collismycin A: mechanism for formation of the 2, 2′-bipyridyl ring. *Chemistry & biology*, *19*(3), 399-413.

Genome Online. 2018. *Streptomyces* Whole Genome Sequencing Database. Erişim: [https://gold.jgi.doe.gov/projects?setColumns=yes&Organism.Species=streptomyces]. Erişim Tarihi: 22.12.2018.

Gerhard, U., Mackay, J. P., Maplestone, R. A., & Williams, D. H. (1993). The role of the sugar and chlorine substituents in the dimerization of vancomycin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(1), 232-237.

Gibson, M. K., Forsberg, K. J., & Dantas, G. (2015). Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME journal*, *9*(1), 207.

Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, *37*(1), 189-216.

Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(1), 121-146.

Hadatsch, B., Butz, D., Schmiederer, T., Steudle, J., Wohlleben, W., Süssmuth, R., & Stegmann, E. (2007). The biosynthesis of teicoplanin-type glycopeptide antibiotics: assignment of p450 mono-oxygenases to side chain cyclizations of glycopeptide a47934. *Chemistry & biology*, *14*(9), 1078-1089.

Hakvag, S., Fjærvik, E., Josefsen, K. D., Ian, E., Ellingsen, T. E., & Zotchev, S. B. (2008). Characterization of Streptomyces spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. *Marine drugs*, *6*(4), 620-635.

Harris, C. M., & Harris, T. M. (1982). Structure of the glycopeptide antibiotic vancomycin. Evidence for an asparagine residue in the peptide. *Journal of the American Chemical Society*, *104*(15), 4293-4295.

Hasegawa, T., Takizawa, M., & Tanida, S. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *29*(4), 319-322.

Hirano, S. (1996). Chitin biotechnology applications. In *Biotechnology annual review* (Vol. 2, pp. 237-258). Elsevier.

Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A. T., ... & Beil, W. (2009). Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain Streptomyces sp. NTK 937. *The Journal of antibiotics*, *62*(2), 99.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Group 19. Regular, nonsporing Gram-positive rods. *Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md*, 566.

Hopwood, D. A. (2006). Soil to genomics: the Streptomyces chromosome. *Annu. Rev. Genet.*, *40*, 1-23.

Hopwood, D. A., & Sherman, D. H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual review of genetics*, *24*(1), 37-62.

Hornung, A., Bertazzo, M., Dziarnowski, A., Schneider, K., Welzel, K., Wohlert, S. E., ... & Vente, A. (2007). A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *ChemBioChem*, *8*(7), 757-766.

Hutchinson, C. R., & Fujii, I. (1995). Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annual Reviews in Microbiology*, *49*(1), 201-238.

Hwang, B. K., Lim, S. W., Kim, B. S., Lee, J. Y., & Moon, S. S. (2001). Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate fromStreptomyces humidus. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3739-3745.

Igarashi, Y., Ogawa, M., Sato, Y., Saito, N., Yoshida, R., Kunoh, H., ... & Furumai, T. (2000). Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by Alternaria brassicicola, from Streptomyces sp. TP-A0569. *The Journal of antibiotics*, *53*(10), 1117-1122.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., ... & Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis. *Nature biotechnology*, *21*(5), 526.

Ilic, S. B., Konstantinovic, S. S., Todorovic, Z. B., Lazic, M. L., Veljkovic, V. B., Jokovic, N., & Radovanovic, B. C. (2007). Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, *76*(4), 421-428.

Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, *72*(3), 1719-1728.

Jenkins, C. S. P., Meyer, D., Dreyfus, M. D., & Larreu, M. J. (1974). Willebrand factor and ristocetin I. Mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation. *British journal of haematology*, *28*(4), 561-578.

Jensen, P. R., Dwight, R. Y. A. N., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, *57*(4), 1102-1108.

Jiménez-Esquilín, A. E., & Roane, T. M. (2005). Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *32*(8), 378-381.

John, J. E. (2009). Natural products-based drug discovery: some bottlenecks and considerations. *Current science*, *96*(6), 753-754.

Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L., & Khosla, C. (2000). Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from Sorangium cellulosum. *Gene*, *249*(1), 153-160.

Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *43*(2-3), 155-176.

Kiesser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). Practical Streptomyces Genetics The John Innes Foundation Norwich. *UK Google Scholar*.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, *16*(2), 111-120.

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

Komaki, H., Izumikawa, M., Ueda, J. Y., Nakashima, T., Khan, S. T., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2009). Discovery of a pimaricin analog JBIR-13, from Streptomyces bicolor NBRC 12746 as predicted by sequence analysis of type I polyketide synthase gene. *Applied microbiology and biotechnology*, *83*(1), 127-133.

Komaki, H., Nemoto, A., Tanaka, Y., Takagi, H., Yazawa, K., Mikami, Y., ... & Nagata, Y. (1999). Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic Nocardia brasiliensis: fermentation, isolation and biological activity. *The Journal of antibiotics*, *52*(1), 13-19.

Kopp, F., & Marahiel, M. A. (2007). Where chemistry meets biology: the chemoenzymatic synthesis of nonribosomal peptides and polyketides. *Current opinion in biotechnology*, *18*(6), 513-520.

Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2006). Marinomycins A− D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "Marinispora". *Journal of the American Chemical Society*, *128*(5), 1622-1632.

Lahlou, M. (2013). The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm*, *4*(3A), 17-31.

Lancini, G. C. (1989). Fermentation and biosynthesis of glycopeptide antibiotics. *Progress in industrial microbiology*, *27*, 283-296.

Lancini, G., Parenti, F., & Gallo, G. G. (1995). Antibiotics and Producer organisms. In *Antibiotics* (pp. 255-263). Springer, Boston, MA.

Lechevalier, M. P. (1994). Taxonomy of the genus Frankia (Actinomycetales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*(1), 1-8.

Lee, L. F., & Chen, C. W. (1998). Multidrug resistant genes in Streptomyces. *Actinomycetologica*, *12*(2), 148-152.

Levine, D. P. (2006). Vancomycin: a history. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(Supplement_1), S5-S12.

Linke, H. A., MECHLINSKI, W., & SCHAFFNER, C. P. (1974). Production of amphotericin B-14C by Streptomyces nodosus fermentation, and preparation of the amphotericin B-14C-methyl-ester. *The Journal of antibiotics*, *27*(3), 155-160.

Madigan, M., & Martinko, J. (2006). Screening for antibiotics from indigenous Streptomycetes, their genetic and mutational analysis. *Brock Biology of Microorganisms, 11th edn, Prentice Hall International, Inc. USA.*

Mansson, M., Gram, L., & Larsen, T. O. (2011). Production of bioactive secondary metabolites by marine Vibrionaceae. *Marine drugs*, *9*(9), 1440-1468.

Manteca, Á., & Yagüe, P. (2018). Streptomyces Differentiation in Liquid Cultures as a Trigger of Secondary Metabolism. *Antibiotics*, *7*(2), 41.

Manteca, A., Ye, J., Sánchez, J., & Jensen, O. N. (2011). Phosphoproteome analysis of Streptomyces development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *Journal of proteome research*, *10*(12), 5481-5492.

Marcone, G. L., Binda, E., Berini, F., & Marinelli, F. (2018). Old and new glycopeptide antibiotics: From product to gene and back in the post-genomic era. *Biotechnology advances*.

Margalith, P., & Beretta, G. (1960). Rifomycin. XI. taxonomic study on streptomyces mediterranei nov. sp. *Mycopathologia et mycologia applicata*, *13*(4), 321-330.

McCarthy, A. J., & Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene*, *115*(1), 189-192.

McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., ... & Dosanjh, M. (2006). The complete genome of Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15582-15587.

Méndez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B., & Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in Streptomyces. *Canadian journal of microbiology*, *31*(5), 446-450.

Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, *145*(3), 515-525.

Mizuno, C. M., Kimes, N. E., López-Pérez, M., Ausó, E., Rodriguez-Valera, F., & Ghai, R. (2013). A hybrid NRPS-PKS gene cluster related to the bleomycin family of antitumor antibiotics in Alteromonas macleodii strains. *PLoS One*, *8*(9), e76021.

Moore, B. S., & Hopke, J. N. (2001). Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem*, *2*(1), 35-38.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, *75*(3), 311-335.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981− 2002. *Journal of natural products*, *66*(7), 1022-1037.

Nicolaou, K. C., Boddy, C. N., Bräse, S., & Winssinger, N. (1999). Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*, *38*(15), 2096-2152.

Niehans, G. A., Kratzke, R. A., Froberg, M. K., Aeppli, D. M., Nguyen, P. L., & Geradts, J. (1999). G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *British journal of cancer*, *80*(8), 1175.

OMURA, S., IMAMURA, N., OIWA, R., KUGA, H., IWATA, R., MASUMA, R., & IWAI, Y. (1986). CLOSTOMICINS, NEW ANTIBIOTICS PRODUCED BY MICROMONOSPORA ECHINOSPORA SUBSP. ARMENIACA SUBSP. NOV. *The Journal of antibiotics*, *39*(10), 1407-1412.

Özakın, S., Porsuk, İ., Acer, İ., Bali, B., & İnce, E. (2014). Diversity of non-ribosomal peptide synthetases genes in terrestrial streptomycetes. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *29*(3), 144-153.

Pandey, B., Ghimire, P., & Agrawal, V. P. (2004). Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. *Journal Biology Science*, *23*, 44-53.

Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, *38*(6), 864-870.

Peschke, M., Brieke, C., & Cryle, M. J. (2016). F-O-G ring formation in glycopeptide antibiotic biosynthesis is catalysed by OxyE. *Scientific reports*, *6*, 35584.

Pinchman, J. R., & Boger, D. L. (2013). Probing the role of the vancomycin E-ring aryl chloride: selective divergent synthesis and evaluation of alternatively substituted E-ring analogues. *Journal of medicinal chemistry*, *56*(10), 4116-4124.

Rajgarhia, V. B., & Strohl, W. R. (1997). Minimal Streptomyces sp. strain C5 daunorubicin polyketide biosynthesis genes required for aklanonic acid biosynthesis. *Journal of bacteriology*, *179*(8), 2690-2696.

Recktenwald, J., Shawky, R., Puk, O., Pfennig, F., Keller, U., Wohlleben, W., & Pelzer, S. (2002). Nonribosomal biosynthesis of vancomycin-type antibiotics: a heptapeptide backbone and eight peptide synthetase modules. *Microbiology*, *148*(4), 1105-1118.

Rhodes, P. M. (1984). The production of oxytetracycline in chemostat culture. *Biotechnology and bioengineering*, *26*(4), 382-385.

Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., ... & Van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology*, *61*(5), 1237-1251.

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & Van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces. *EMBO reports*, *9*(7), 670-675.

Savic, M., & Vasiljevic, B. (2006). Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *33*(6), 423.

Schatz, A., & Waksman, S. A. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *57*(2), 244-248.

Schneider, T., & Sahl, H. G. (2010). An oldie but a goodie–cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(2-3), 161-169.

Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural product reports*, *20*(3), 275-287.

Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, *71*(5), 499.

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current opinion in chemical biology*, *7*(2), 285-295.

Shen, B., & Van Lanen, S. G. (2006). Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Current opinion in microbiology*, *9*(3), 252-260.

Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical reviews*, *105*(2), 715-738.

Stach, E. M., & Bull, A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *87*(1), 3-9.

Stegmann, E., Pelzer, S., Bischoff, D., Puk, O., Stockert, S., Butz, D., ... & Wohlleben, W. (2006). Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. *Journal of biotechnology*, *124*(4), 640-653.

Struyk, A. P., Drost, G., Haisvisz, J. M., van Eek, T., & Hoogerheide, J. C. (1958). Pimaricin, a new antifungal antibiotic. *Pimaricin, a new antifungal antibiotic.*

Sung, A. A., Gromek, S. M., & Balunas, M. J. (2017). Upregulation and identification of antibiotic activity of a marine-derived Streptomyces sp. Via co-cultures with human pathogens. *Marine drugs*, *15*(8), 250.

Svetitsky, S., Leibovici, L., & Paul, M. (2009). Comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin: systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(10), 4069-4079.

Taechowisan, T., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2003). Chitinase production by endophytic Streptomyces aureofaciens CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Annals of microbiology*, *53*(4), 447-462.

Tahlan, K., Ahn, S. K., Sing, A., Bodnaruk, T. D., Willems, A. R., Davidson, A. R., & Nodwell, J. R. (2007). Initiation of actinorhodin export in Streptomyces coelicolor. *Molecular microbiology*, *63*(4), 951-961.

Tahvonen, R., Hannukkala, A., & Avikainen, H. (1995). Effect of seed dressing treatment of Streptomyces griseoviridis on barley and spring wheat in field experiments. *Agricultural and Food Science*, *4*(4), 419-427.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, *24*(8), 1596-1599.

Thaker, M. N., & Wright, G. D. (2012). Opportunities for synthetic biology in antibiotics: expanding glycopeptide chemical diversity. *ACS synthetic biology*, *4*(3), 195-206.

Thaker, M. N., Wang, W., Spanogiannopoulos, P., Waglechner, N., King, A. M., Medina, R., & Wright, G. D. (2013). Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nature biotechnology*, *31*(10), 922.

Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., & LokaBharathi, P. A. (2010). Marine drugs from sponge-microbe association—A review. *Marine drugs*, *8*(4), 1417-1468.

Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., ... & Morra, M. J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving Streptomyces lydicus WYEC108 and the pea plant (Pisum sativum). *Applied and environmental microbiology*, *68*(5), 2161-2171.

Uyeda, M., Mizukami, M., Yokomizo, K., & Suzuki, K. (2001). Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by Streptomyces filipinensis and Streptomyces hygroscopicus. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *65*(5), 1252-1254.

van Wezel, G. P., & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances. *Natural product reports*, *28*(7), 1311-1333.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, *71*(3), 495-548.

Venugopal, A. A., & Johnson, S. (2012). Current state of Clostridium difficile treatment options. *Clinical infectious diseases*, *55*(suppl_2), S71-S76.

Vino, S., & Lokesh, K. R. (2008). Borrelidin: a promising anticancer agent from Streptomyces species. *Adv Biotech*, *6*, 22-26.

Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil Actinomyces. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, *45*(2), 609-614.

Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck Jr, P. R., Broughton, M. C., Turner, J., Madduri, K., ... & Baltz, R. H. (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of Saccharopolyspora spinosa1. *Chemistry & biology*, *8*(5), 487-499.

Walsh, C. T. (2007). The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Accounts of chemical research*, *41*(1), 4-10.

Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., & Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201401734.

Wang, Y., Brown, H. N., Crowley, D. E., & Szaniszlo, P. J. (1993). Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant, Cell & Environment*, *16*(5), 579-585.

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?. *Archives of microbiology*, *176*(5), 386-390.

Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(1), 9-11.

Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, laments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol*, *12*, 115124Colson.

White, R. J., & Stroshane, R. M. (1984). Daunorubicin and adriamycin: Properties, biosynthesis, and fermentation. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences[DRUGS PHARM. SCI.]. 1984.*

WHO, 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Erişim: https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed. Erişim Tarihi: 27.02.2017

Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., & Rahman, S. K. (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *Journal of Natural Products*, *52*(6), 1189-1208.

Worrall, J. A., & Vijgenboom, E. (2010). Copper mining in Streptomyces: enzymes, natural products and development. *Natural product reports*, *27*(5), 742-756.

Wright, G. D. (2012). Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology*, *19*(1), 3-10.

Yao, R. C., & CRANDALL, L. W. (1994). Classification, Occurrence, and Discovery. *Glycopeptide Antibiotics*, *63*, 1.

Yilmaz, E. I., Yavuz, M., & Kizil, M. (2008). Molecular characterization of rhizospheric soil streptomycetes isolated from indigenous Turkish plants and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(8), 1461-1470.

Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K., & Wright, G. (2014). Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *The Journal of antibiotics*, *67*(1), 31.

Ylihonko, K., Hakala, J., Kunnari, T., & Mäntsälälä, P. (1996). Production of hybrid anthracycline antibiotics by heterologous expression of Streptomyces nogalater nogalamycin biosynthesis genes. *Microbiology*, *142*(8), 1965-1972.

Yokota, A. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. Atlas of actinomycetes. *The Society for actinomycetes*, *194*.

Zhang, Y. L., Li, S., Jiang, D. H., Kong, L. C., Zhang, P. H., & Xu, J. D. (2013). Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated Streptomyces canus BYB02. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(7), 1521-1524.

Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(3),589

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Mehmet Ali

Soyadı: ÖZCAN

Doğum tarihi: 27/11/1988

Doğum yeri: ŞIRNAK/İdil

Medeni hali: Bekar

Yabancı dili: İngilizce

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ortaokul: Bülent Pekdemir İlk Öğretim Okulu-2003 Nusaybin/ MARDİN

Lise: Emire Gözü Lisesi-2007 Nusaybin/ MARDİN

Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009-2014)

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Mehmet Ali ÖZCAN
ÖĞRENCİ NO	16801008
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☒ Güz ☐ Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	AKTİNOMİSET GENOMLARINDA YENİ GLİKOPEPTİD BİLEŞİKLERİN GENETİK OLARAK TARANMASI
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	80
BENZERLİK ORANI	%13
RAPORLAMA TARİHİ	18/02/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 80 sayfalık kısmına ilişkin, 18/02/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 13 'tür.

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.

18.02.2018.

(Öğrencinin Adı Soyadı)
Mehmet Ali ÖZCAN

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.