

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
2022-DR-004

**İNSAN PARAZİTLERİ *ACANTHAMOEBA CASTELLANİİ* VE
LEISHMANİA TROPİCA'YA KARŞI *XENORHABDUS* VE
PHOTORHABDUS BAKTERİ SEKONDER
METABOLİTLERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE
ETKEN MADDELERİN BELİRLENMESİ**

**ŞEBNEM HAZAL GÜLŞEN
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Selçuk HAZIR**

Bu tez 100/2000 YÖK Doktora burs programı ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF-20001 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Doktora süresince hiçbir bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, yol gösteren ve her türlü desteği veren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Selçuk HAZIR'a,

Tez çalışmam süresince, çalışma ortamını güzelleştiren ve bana destek olan sevgili arkadaşlarım, Harun ÇİMEN, Derya ULUĞ ve Mustapha TOURAY'a,

Parazit deneyleri esnasında bana laboratuvarlarını açan ve eğiten sayın hocalarım Hatice ERTABAKLAR ve Sema ERTUĞ'a,

Biyoaktivite deneylerinde bilgisini ve vaktini esirgemeyip uzun saatler süren çalışmalarda bana destek olan Evren TİLEKLİOĞLU'na,

Bu zorlu sürecin her aşamasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen ve zaman yanımda olan sevgili aileme,

Tez çalışmamı FEF-20001 no'lu proje ile destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne ve 116Z074 no'lu proje ve 22-11A doktora bursu ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Son olarak doktora süresince 100/2000 programı kapsamında bursiyer olarak yer aldığım YÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> Bakteri Türleri	2
1.2. Sekonder Metabolitler ve Üretim Mekanizması.....	5
1.2.1. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> 'lar Tarafından Üretilen Bazı Önemli Sekonder Metabolitler.....	8
1.3. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	13
1.4. <i>Leishmania tropica</i>	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Yabancıl Tip ve Mutant Bakterilerin Eldesi.....	26
3.1.1. Yabancıl Tip Bakterilerin Eldesi	26
3.1.2. Mutant Bakterilerin Eldesi	28
3.2. Bakteri Supernatantlarının Eldesi	32
3.2.1. Yabancıl Tip Bakterilerden Supernatant Eldesi	32

3.2.2. Mutant Bakterilerden Supernatant Eldesi.....	33
3.2.3. Hfq Mutantlarına Ait Supernatantlardan Saf Madde Eldesi.....	34
3.3. Parazit Kùltürlerinin Oluşturulması	34
3.3.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> Trofozoit Kùltürü.....	34
3.3.2. <i>Leishmania tropica</i> Promastigot Kùltürü	35
3.4. <i>In vitro</i> Antiprotozoal Aktivite Deneylei	35
3.4.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'ye Karşı Aktivite Deneylei.....	35
3.4.2. <i>Leishmania tropica</i> 'ya Karşı Aktivite Deneylei	37
3.5. İstatistik Analiz.....	39
4. BULGULAR	40
4.1. Yabanıl Tip Bakterilerle Yapılan <i>In vitro</i> Antiprotozoal Aktivite Deneylei	40
4.1.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'ye Karşı Yabanıl Tip Bakterilerle Yürütölen Aktivite Deneylei.....	40
4.1.2. <i>Leishmania tropica</i> 'ya Karşı Yabanıl Tip Bakterilerle Yürütölen Aktivite Deneylei	44
4.2. Mutant Bakterilerle Yapılan <i>In vitro</i> Antiprotozoal Aktivite Deneylei	48
4.2.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'ye Karşı Mutant Bakterilerle Yürütölen Aktivite Deneylei.....	48
4.2.2. <i>Leishmania tropica</i> 'ye Karşı Mutant Bakterilerle Yürütölen Aktivite Deneylei.....	51
4.3. Biyoaktif Ekstraktların Anti-protozoal Aktivitesi	53
5. TARTIşMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	60
BİLİMSEL ETİK BEYANI	85
ÖZ GEÇMİş.....	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad Derece
µl	: mikrolitre
AIDS	: Edinilmiş Bağışık Eksikliği Sendromu
AK	: <i>Acanthamoeba</i> kreatiti
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
cm	: santimetre
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EPN	: Entomopatojen Nematod
FAS	: Yağ Asidi Sentetaz
FCS	: Fetal calf serumu
GAE	: Granülomatöz <i>Acanthamoeba</i> ensefaliti
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HR-MS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi
IC	: İnhibisyon konsantrasyonu
IJ	: İnfektif Juvenil
J3	: 3. Juvenil Evre
LB	: Luria-Bertani
ml	: mililitre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NRPS	: Ribozomal olmayan peptid sentetaz

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKS	: Poliketid sentetaz
PPTase	: Phosphopantetheinyl Transferase
PUFA	: Doymamış yağ asidi sentetaz
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: rotate per minute
RXP	: rhabdopeptide/xenortide benzeri peptid
SDF	: Scavenger Deterrent Factor
sRNA	: Küçük Ribonükleik Asit
tca	: toxin complex A
TCA	: Trans Cinnamic Asit
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TSB	: Tryptic Soy Broth
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
xcn	: Xenocumacine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Entomopatojen nematodlarda mutualistik bakterilerin taşındığı bölgeler	3
Şekil 1.2. Entomopatojen nematodların ve mutualistik bakterilerinin hayat döngüsü.....	4
Şekil 1.3. Hfq-RNA kompleksinin oluşumu (A) ve Hfq bağlanma yüzeyleri (B).....	6
Şekil 1.4. Sekonder metabolitlerin sentezlenmesine Phosphopantetheinyl Transferase enziminin etkisi	7
Şekil 1.5. <i>Photorhabdus</i> 'lar tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları.....	9
Şekil 1.6. <i>Xenorhabdus</i> 'lar tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları.....	10
Şekil 1.7. <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'nin yaşam döngüsü	15
Şekil 1.8. <i>Leishmania</i> türlerine ait Promastigot (A) ve Amastigot (B) yapılar.....	20
Şekil 1.9. <i>Leishmania tropica</i> 'nın yaşam döngüsü.....	21
Şekil 1.10. Kutanöz Leishmaniasis'in coğrafi dağılımı	22
Şekil 3.1. Ortamda L-arabinoz bulunduğu (A) ve bulunmadığı (B) durumlarda P _{BAD} promotörü.	30
Şekil 3.2. Promotor Değişim yönteminin Δhfq veya $\Delta PPTase$ suşlarına uygulanması	31
Şekil 3.3. Hücrelerinden arındırılmış bakteri supernatantların elde edilme aşamaları.	33
Şekil 3.4. Aktivite deneylerinin kurulumu.....	36
Şekil 4.1. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen hücreleri uzaklaştırılmış supernatantların %10 konsantrasyonda <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki etkisi.....	41
Şekil 4.2. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %5 konsantrasyonunda <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitlerine etkisi.....	42
Şekil 4.3. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %2.5 konsantrasyonunda <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitlerine etkisi.....	43

Şekil 4.4. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %1,25 konsantrasyonunda <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitlerine etkisi.....	44
Şekil 4.5. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %10 konsantrasyonunda <i>Leishmania tropica</i> promastigotlarına etkisi.....	45
Şekil 4.6. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %5 konsantrasyonunda <i>Leishmania tropica</i> promastigotlarına etkisi.....	46
Şekil 4.7. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %2,5 konsantrasyonunda <i>L. tropica</i> promastigotlarına etkisi.	47
Şekil 4.8. Farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türlerinden elde edilen supernatantların %1,25 konsantrasyonunda <i>Leishmania tropica</i> promastigotları etkisi.....	48
Şekil 4.9. Supernatantlardan ekstrakte edilen xenocoumacin saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi.	53
Şekil 4.10. Xenocoumacin molekülünün kimyasal yapısı.	53
Şekil 4.11. Supernatantlardan ekstrakte edilen fabclavin saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi.	54
Şekil 4.12. Fabclavin molekülünün kimyasal yapısı.....	54
Şekil 4.13. Supernatantlardan ekstrakte edilen PAX saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi	55
Şekil 4.14. PAX molekülünün kimyasal yapısı.....	55

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitine ait transmisyon elektron mikroskop görüntüsü	13
Resim 1.2. <i>Acanthamoeba castellanii</i> kistine ait transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.	14
Resim 1.3. Kutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu yara izleri (skar).....	18
Resim 1.4. <i>Phlebotomus papatasi</i>	19
Resim 3.1. <i>Galleria mellonella</i> kültürü.	27
Resim 3.2. NBTA besiyerinde üretilmiş <i>Xenorhabdus</i> (A) ve <i>Photorhabdus</i> (B) bakterileri.	28
Resim 3.3. Biyoaktivite deneylerinin kuruluşu.....	38
Resim 3.4. Deneylerin invert mikroskopta kontrolü.....	38
Resim 4.1. Deney kontrolünde görülen ölü (A) ve canlı (B) <i>Acanthamoeba castellanii</i> hücreleri.	40
Resim 4.2. Deney kontrolünde görülen canlı (A) ve ölü (B) <i>Leishmania tropica</i> hücreleri.	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Antiprotozoal aktivite testlerinde kullanılan yabancı tip <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> bakteri türleri.....	26
Çizelge 3.2. Oluşturulan mutant bakteri suşları.	29
Çizelge 4.1. Mutant bakterilerle <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'ye karşı yapılan aktivite deney sonuçları.	50
Çizelge 4.2. Mutant bakterilerle <i>Leishmania tropica</i> 'ya karşı yapılan aktivite deney sonuçları.....	52

ÖZET

İNSAN PARAZİTLERİ *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* VE *LEISHMANIA TROPICA*'YA KARŞI *XENORHABDUS* VE *PHOTORHABDUS* BAKTERİ SEKONDER METABOLİTLERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE ETKEN MADDELERİN BELİRLENMESİ

Gülşen Ş. H., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakteri sekonder metabolitlerinin, insan protozoan parazitleri *Acanthamoeba castellanii* ve *Leishmania tropica*'ya karşı biyoaktivitesinin tespit edilmesi.

Materyal ve Yöntem: Tez çalışması kapsamında 5 adet *Photorhabdus* ve 22 adet *Xenorhabdus* bakteri türü kullanılmıştır. Çalışmada yabancı tip bakterilerle biyoaktivite deneyleri tamamlandıktan sonra, en yüksek aktivite gösteren türlere ait promotor bölgesi değiştirilmiş mutant bakteriler elde edilmiştir. Bu bakteriler özel olarak tek bir sekonder metabolitin üretilmesinden sorumludur. Daha sonra mutant bakterilerle de biyoaktivite deneyleri tamamlanıp, antiprotozoal etkiden sorumlu maddelerin tespiti gerçekleştirilmiştir. XAD reçinesi yöntemi kullanarak bu maddelerin saflaştırılması da gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Test edilen bakterilerden *Photorhabdus*'larda herhangi bir antiprotozoal aktivite görülmemişken, *Xenorhabdus* cinsine ait bazı türlerde yüksek antiprotozoal etki tespit edilmiştir. Mutant bakterilerle yürütülen deneyler sonucu etken biyoaktiviteden sorumlu maddelerin fabclavinler, xenocoumacinler ve PAX peptidler olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, belirlenen bu antiprotozoal birleşiklerin, gelecekte insan parazitlerinin baskılanmasında alternatif, yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesi için önemli potansiyele sahip olduklarını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania tropica*, *Acanthamoeba castellanii*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, Sekonder metabolitler, Antiprotozoal maddeler.

ABSTRACT

THE EFFECTS OF *XENORHABDUS* AND *PHOTORHABDUS* BACTERIAL SECONDARY METABOLITES AGAINST HUMAN PARASITES *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* AND *LEISHMANIA TROPICA* AND DETERMINATION OF THE BIOACTIVE COMPOUNDS

Gülşen Ş. H., Aydın Adnan Menderes University, Institution of Natural and Applied Sciences, Biology Program, Dokorate Thesis, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

Objective: Determination of the bioactivity of bacterial secondary metabolites obtained from bacteria belonging to the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* against human protozoan parasites *Acanthamoeba castellanii* and *Leishmania tropica*.

Material and Methods: The antiprotozoal activity of 5 *Photorhabdus* and 22 *Xenorhabdus* wild-type bacteria were investigated in bioactivity experiments. Then promoter exchanged mutants belonging to the some bioactive species with the highest activity were generated so that specific genes in these bacteria induced with L-arabinose could be used to demonstrate the activity of the corresponding secondary metabolite. Purification of these substances was also carried out using the XAD resin method.

Results: Among the tested bacteria, *Xenorhabdus* species displayed high antiprotozoal activity against both protozoal parasites. No activity was observed in *Photorhabdus* species. Experiments with mutant bacteria revealed that the antiprotozoal bioactive compounds were fabclavins, xenocoumacins, xenorhabdins and PAX peptides.

Conclusion: The data indicate that these determined antiprotozoal compounds have great potential in the development of new, alternative and effective drugs in the suppression of human parasites in the future.

Keywords: *Leishmania tropica*, *Acanthamoeba castellanii*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, Secondary metabolites, Antiprotozoal substances.

1. GİRİŞ

Bulaşıcı hastalıklar, virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoonlar, nematodlar gibi patojenik organizmaların konağı istilasıyla meydana gelmektedir. Bunlardan özellikle protozoonların sebep olduğu parazitler hastalıklar dünya çapında genellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çok sayıda ölüme ve kronik hastalığa neden olmaktadır (Farrar vd., 2013; Despommier vd., 2017; WHO, 2019). Parazitler, doğrudan ya da dolaylı olarak temas, kontamine yiyecek veya su, enfekte insan ya da hayvanla temas ve vektörler yoluyla bulaşabilmektedir (Farrar vd., 2013). Yoksulluk, yetersiz sağlık önlemleri, hijyenik olmayan yaşam koşulları, yetersiz beslenme, iklim faktörleri, etkisiz vektör kontrol mücadeleleri, anti-parazitler ilaçların yetersizliği ve ilaç direnci gibi birçok neden parazitler hastalıklarla mücadeleyi oldukça zorlaştırmaktadır (Cheesbrough, 2009; Gupta ve Guin, 2010; Bhutta vd., 2014).

Protozoon parazitler, ökaryotik yapıda olduklarından memeli hücreleriyle fonksiyonel homoloji göstermektedirler. Bu nedenle, bu parazitlerin tedavisinde kullanılan ilaçlar genelde insan hücreleri için de toksiktir ve çok fazla yan etkiye sebep olurlar (Bendesky ve Menendez, 2001; Ohnishi vd., 2014). Bu istenmeyen etkiler ve ilaçlara karşı dirençli parazit suşlarının gelişimi dikkate alındığında, farklı etki mekanizmalarına ve konak hücreler için minimum toksisiteye sahip yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Singh vd., 2009; Bautista vd., 2011).

Doğal bileşikler, yeni ilaçların geliştirilmesi için önemli kaynaklardır. Bu konuda yapılan çalışmalar, benzersiz yapıda, yüksek aktiviteye ve seçiciliğe sahip yeni moleküllerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır (Newman ve Cragg, 2012). Doğadaki en önemli doğal bileşik kaynakları; mantarlar (Brian ve Hemming, 1947; Zhang vd., 2012), bitkiler (Cowan, 1999) ve bakterilerdir (Kirkup, 2006; Gillor ve Ghazaryan, 2007; Newman ve Cragg, 2016). Birçok bakteri ve mantar türü, aynı ortamda bulunduğu diğer organizmalarla rekabet etmek için sekonder metabolitler üretmektedir. Özellikle simbiyotik ilişki içerisinde yaşayan mikroorganizlarda, üretilen bu sekonder metabolitlerin çeşitliliği çok daha fazla olmakta ve daha geniş spektrumlu biyolojik aktivite görülmektedir (Piel, 2004).

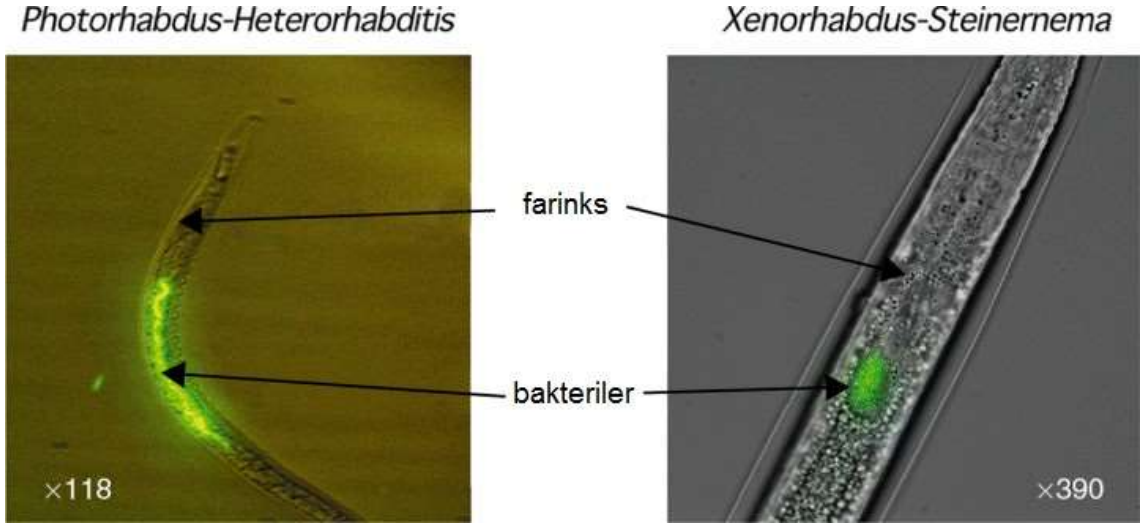
Parazitlere karşı yeni biyoaktif maddelerin önemli kaynaklarından biri de entomopatojen nematodlarla ilişkili bakteri türleri olan *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'lardır.

Çünkü bu bakteriler nematodların içerisinde çoğaldığı böcek kadavrasındaki ve çevredeki diğer mikroorganizmalarla mücadele etmek ve onların kadavrada üremesini engellemek zorundadır (Raja vd., 2021).

1.1. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* Bakteri Türleri

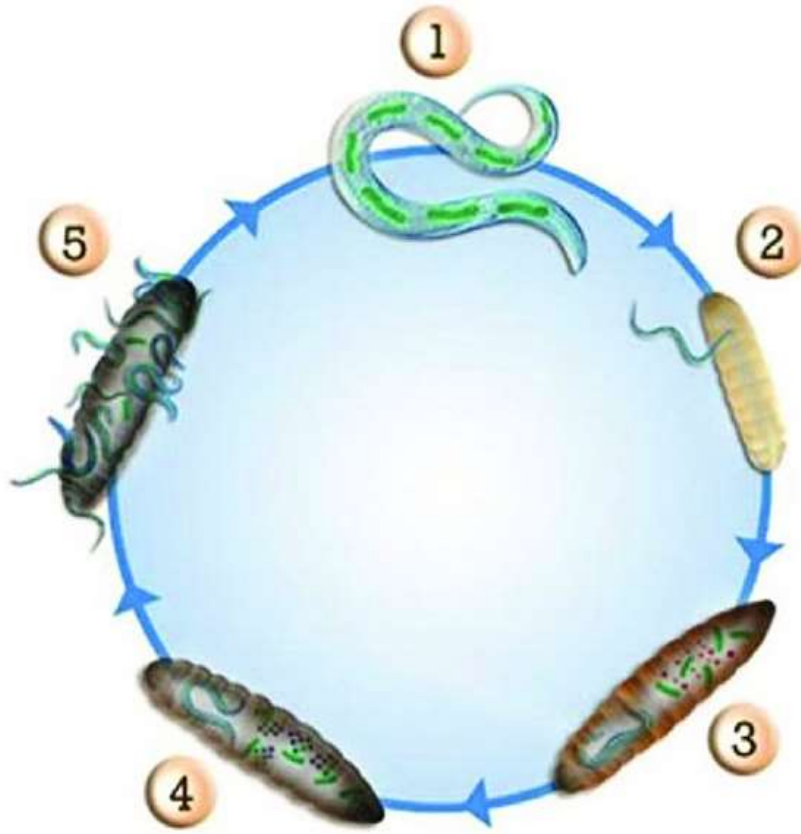
Xenorhabdus ve *Photorhabdus* bakterileri, sırasıyla zorunlu böcek paraziti nematod türleri olan *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinsleri ile mutualistik ilişkilidir (Boemare, 2002). Şimdiye kadar bu bakterilerin toprakta veya suda serbest yaşayabilen formlarına rastlanmamıştır (Forst vd., 1997). Bu iki cins de taksonomik olarak Gammaproteobacteria sınıfında ve Morganellaceae familyasında bulunan basil formda, peritriş flagellalı ve Gram negatif bakterilerdir (Tailliez vd., 2010; Adeolu vd., 2016). Bu iki bakteri cinsi katalaz testi ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. *Xenorhabdus* cinsi katalaz negatifken, *Photorhabdus* cinsi katalaz pozitif sonuç vermektedir. Ayrıca *Photorhabdus* cinsi bakteriler biyoluminesans yapabilme özelliğine sahip bilinen tek karasal bakteri türüdür (Peel vd., 1999).

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* bakterilerinin optimum üreme sıcaklıkları 28-30°C'dir (Forst vd., 1997). *Xenorhabdus* türleri, *Steinernema* cinsine ait nematodların üçüncü larva dönemleri olan infektif juvenil (IJ) evresinde, bağırsağın anterior kısmındaki geniş bir kesede muhafaza edilirken, *Photorhabdus*'lar ise *Heterorhabdit*'lerde bağırsak boyunca dağılmış şekilde bulunmaktadır (Martens ve Goodrich-Blair, 2005; Ciche vd., 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Entomopatojen nematodlarda mutualistik bakterilerin taşındığı bölgeler (Bakteriler floresan mikroskobu altında yeşil renkli olarak görülmektedir) (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007).

Nematodlar konak böceğin içerisine doğal açıklıkları olan ağız, anüs ve stigmalarını kullanarak giriş yaptıktan sonra mutualistik bakteriler böceğin hemosölüne salınmaktadır. *Xenorhabdus* bakterileri nematodların anüsünden, *Photorhabdus* bakterileri ise nematodların ağız açıklığından dışarı salınmaktadır. Böcek hemolenfi içerisine yerleşen bakteriler ve nematodlar tarafından salgılanan çeşitli toksinler ile enzimler nedeniyle konak böcek 48 saat içerisinde septisemi ve toksemia nedeniyle ölmektedir (Kaya ve Gaugler, 1993; Shapiro-Ilan vd., 2020) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Entomopatojen nematodların ve mutualistik bakterilerinin hayat döngüsü. (1) İnfektif juvenil evredeki nematod ve içerisindeki *Photorhabdus* veya *Xenorhabdus* bakterileri, (2) Nematod doğal açıklıklardan böceğin içerisine girer; (3) *Photorhabdus* veya *Xenorhabdus* bakterileri böceğin hemosölü içine salınır ve bakteriler çeşitli toksik bileşikler ve enzimler üreterek böceği öldürürler; (4) *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri kadavrayı korumak ve rekabetçi organizmaları uzaklaştırmak için bir dizi sekonder metabolit üretirler; (5) Hem bakteri hem de nematodlar böcek dokusuyla beslenir ve çoğalır. Daha sonra bakteriler tekrar nematodun içinde kolonize olarak yeni konukçu bulmak amacıyla nematodlar kadavrayı terkederler.

Nematodların bir böceği enfekte etmesinden yeni nesil nematodların üremesi ve kadavrayı terketmesi için gerekli olan süre 7-14 gün arasında değişmektedir. Bu süre içerisinde toprak ortamında bulunan kadavranın bütünlüğünün bozulmaması, yağmacı organizmalarca yenmemesi ve bakteri, fungus, protozoa, virüs gibi mikroorganizmalar tarafından istila edilmemesi gerekir. Bu korunma işlevleri *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri tarafından sentezlenen sekonder metabolitler sayesinde olmaktadır (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007; Chaston vd., 2011; Shi ve Bode, 2018). *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri toprak gibi rekabet açısından zengin bir ortamda yaşadıklarından ve yaşam

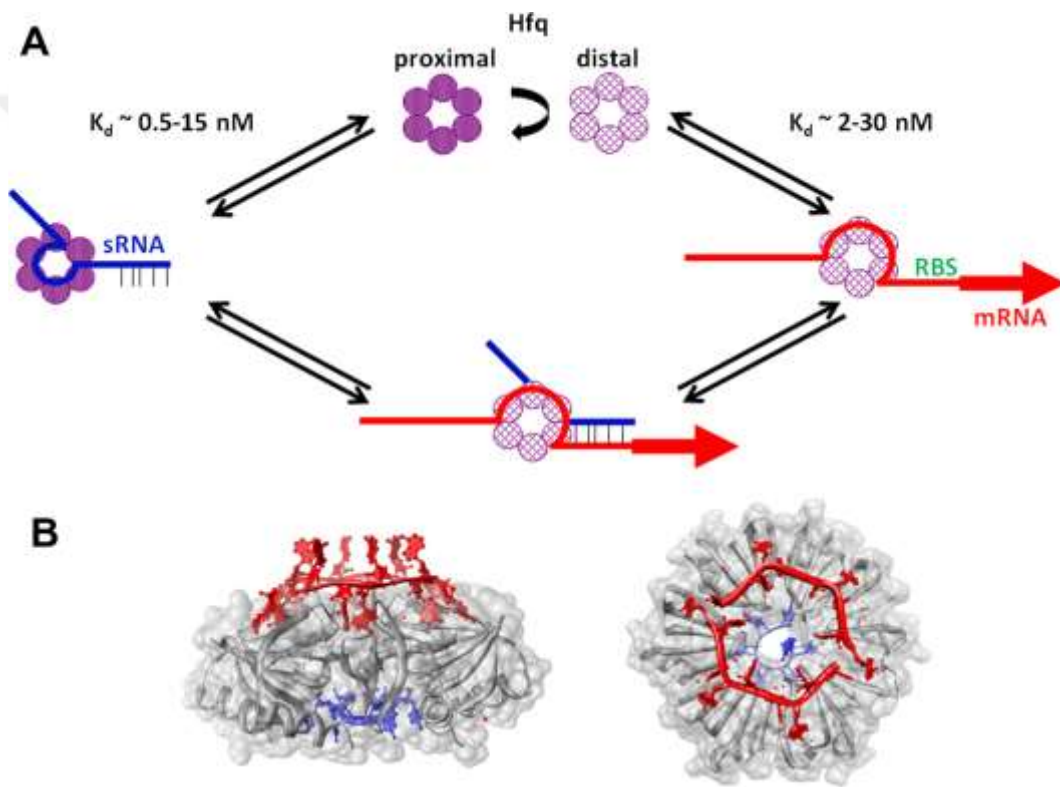
döngülerinde birçok farklı organizmayla karşılaştıklarından çok sayıda sekonder metabolit üreten gen kümesine sahiptirler (Bode, 2009; Cai vd., 2017). *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* türleri ürettiği sekonder metabolitler açısından farklılık göstermektedir. Hatta yapılan çalışmalar aynı türe ait farklı suşların dahi birbirinden farklı maddeler üretebildiğini göstermiştir (Tobias vd., 2017).

Photorhabdus ve *Xenorhabdus* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, antibakteriyel (Akhurst, 1980, 1982; Webster vd., 2002; Furgani vd., 2008; Reinheimer vd., 2018; Donmez-Ozkan vd., 2019), antifungal (Chen vd., 1994; Webster vd., 2002; Shapiro-Ilan vd., 2014; Fang vd., 2014; Hazir vd., 2016; Cimen vd., 2021) ve insektisidal (Sergeant vd., 2006; Mona ve Aly, 2009; Hinchliffe vd., 2010; Vitta vd., 2018; Silva vd., 2020; Shah vd., 2021) aktiviteleri tespit edilmiştir. Çok az sayıda olsa da antiprotozoal sekonder metabolitler üzerine de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Grundmann vd., 2014; Antonello vd., 2017; Zhao vd., 2018, 2020).

1.2. Sekonder Metabolitler ve Üretim Mekanizması

Sekonder metabolitler genellikle bir organizmanın üremesi, gelişmesi veya büyümesi ile doğrudan bağlantılı olmayan organik bileşikler olarak tanımlanır (Joyce vd., 2011). Sekonder metabolit çalışmalarında kullanılacak organizmaların kültüre edilebilir olması önemlidir. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri laboratuvar ortamında hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kolayca üretilebilmektedir (Clarke, 2008). Bakteriler, nematod IJ'lerinden izole edildiklerinde her zaman primer fazda bulunmaktadırlar. Fakat uzun süre boyunca kültüre edildiklerinde veya üreme ve gelişme için uygun olmayan ortamlarda bulduklarında bakterilerin sekonder faza geçiş yaptıkları gözlemlenmiştir (Han ve Ehlers, 2001; Eckstein ve Heermann, 2019). Sekonder faza geçen bakteriler boya absorbe etme, agar üzerinde yayılma, antimikrobiyal madde üretme, ekzoenzim üretme gibi yeteneklerini kaybetmektedirler. Daha önemlisi bu fazda primer metabolitler üretilmeye devam ederken, herhangi bir sekonder metabolit üretimi olmamaktadır (Boemare ve Akhurst, 2006). Bunun nedeni, primer metabolitler (proteinler, amino asitler, enzimler vs.) doğrudan normal büyüme, gelişme ve üremeye ilgilinken, sekonder metabolitlerin ekolojik işlevlerle ilgili olmasıdır (Demain ve Fang, 2000).

Bakterilerde, protein yapıdaki maddelerin üretilmesinde, amino asit, demir ve karbon metabolizmalarında ve hatta virülanslığın sağlanmasında, kodlayıcı olmayan, düzenleyici, küçük RNA (sRNA)'lar rol oynamaktadır (Masse ve Gottesman, 2002; Romby vd., 2006). sRNA'lar birçok mekanizma tarafından kontrol edilebilirler. Bunlara, protein üretiminde translasyonun inhibisyonu, translasyonun aktivasyonu ve transkripsiyon bozulma oranının değişmesi örnek gösterilebilir (Gottesman ve Storz, 2011; Bobrovskyy ve Vanderpool, 2013). sRNA'lar ile hedef molekül arasındaki etkileşim Hfq adı verilen RNA bağlanma proteini tarafından gerçekleştirilmektedir (Resim 1.3).



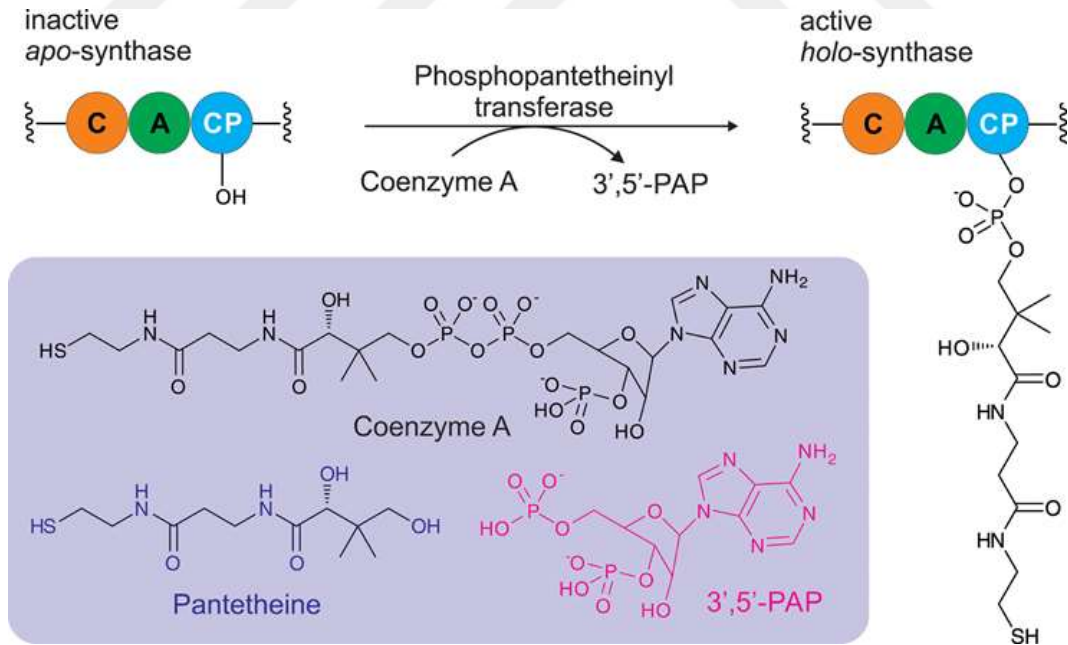
Şekil 1.3. Hfq-RNA kompleksinin oluşumu (A) ve Hfq bağlanma yüzeyleri (B) (Faner ve Feig, 2013).

Hfq birçok bakteri türünde yaygın olarak bulunan, hücresel süreçlerin kontrol edilmesinde rol oynayan ve sRNA, tRNA, mRNA, proteinler ve DNA'ya bağlanabilen bir proteindir (Moller vd., 2002; Sobrero ve Valverde, 2012). Hfq monomerleri, RNA moleküllerinde Adenin ve Urasil bakımından zengin dizilere bağlanarak homoheksamerik halkasal bir yapı oluştururlar ve sRNA'ların post-transkripsiyonel regülatör mekanizmalarına aracılık ederler (Schumacher vd., 2002). Hfq bölgesinin mutasyon sebebiyle aktif olmadığı

durumlarda, virülanslığın azalması, büyümede yavaşlama ve olumsuz koşullara karşı toleransta düşme meydana gelmektedir (Chao ve Vogel, 2010; Sobrero ve Valverde, 2012).

Xenorhabdus ve *Photorhabdus*'larda sekonder metabolitler çoğunlukla, Polyketid Sentetazlar (PKS) ve Ribozomal olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS) adı verilen özelleşmiş enzimler aracılığıyla stoplazmada sentezlenmektedir. Örneğin, antarakinonlar PKS ile sentezlenirken, xenematidler NRPS aracılığıyla sentezlenir. Buna ek olarak, xenocoumacinler ve fabclavinler gibi hem PKS hem de NRPS enzimlerinin ikisinin de varlığı durumunda sentezlenen sekonder metabolitler de bulunmaktadır (Cane ve Walsh, 1999; Fuchs vd., 2014).

PKS, NRPS ve Yağ Asidi Sentetaz (FAS) enzimlerinin işlevsel hale gelebilmeleri Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase) adı verilen bir enzimin katalitik etkisiyle olmaktadır (Beld vd., 2014). PPTase enzimleri ökaryotlar, prokaryotlar ve arkelerde hem primer hem de sekonder metabolizmada önemli rol oynamaktadır (Lambalot vd., 1996; Beld vd., 2014). PPTase'lar, koenzim A'dan korunmuş bir serin kalıntısına 4'-phosphopantetheine (PPT) prostetik grubunun transferini katalizleyerek bu işlevi yerine getirirler (Lambalot vd., 1996; Beld vd., 2014) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Sekonder metabolitlerin sentezlenmesine Phosphopantetheinyl Transferase enziminin etkisi (Beld vd., 2014).

Yapılan çalışmalar, PPTase'ları kodlayan gen bölgesinde oluşan mutasyon sonucunda *P. luminescens* türünde antibiyotik üretiminin durduğunu ve konukçusu olan nematodla aralarındaki mutualistik ilişkinin bozulduğunu göstermektedir (Ciche vd., 2001).

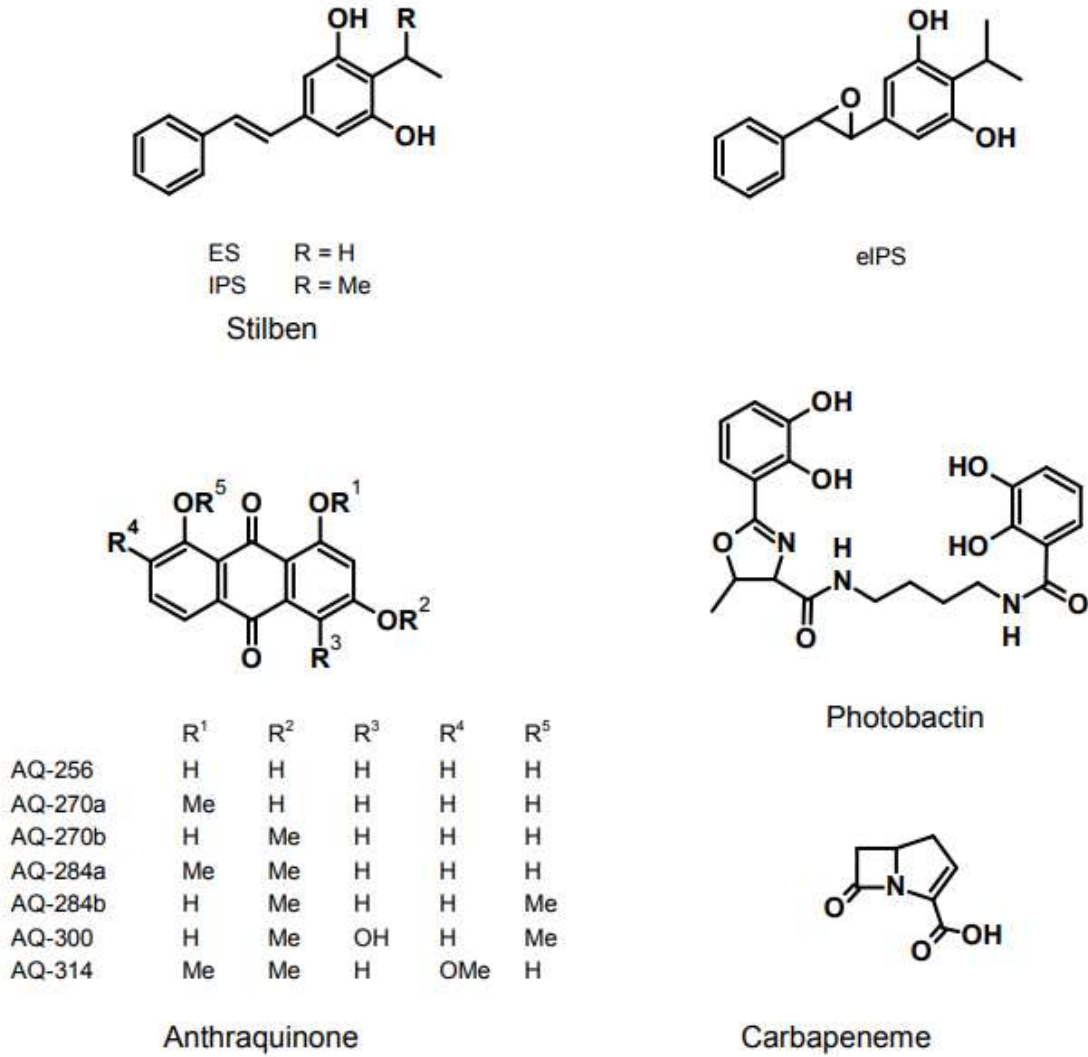
Günümüze kadar, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lardan antibakteriyel, insektisidal, nematisidal, antifungal ve sitotoksik etkiler gösteren ve yapısal olarak farklı olan çok çeşitli sekonder metabolitler izole edilmiştir. Genomlarının tamamı aydınlatılmış olan türlerde yeni bileşiklerin tespiti daha kolay olmaktadır. Bu türlerin genomları detaylı olarak çalışıldığında sekonder metabolitlerden sorumlu gen kümeleri ortaya çıkarılabilmektedir. Örneğin, *Streptomyces coelicolor*'un genomunun sadece %4,5'ini sekonder metabolitleri kodlayan genler oluştururken (Bentley vd., 2002), *Photorhabdus luminescens* (TT01)'de bu oran %5,9'a çıkmakta, hatta *Xenorhabdus nematophila* (ATCC 19061)'da %7,5'e ulaşmaktadır (Duchaud vd., 2003; Chaston vd., 2011).

1.2.1. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lar Tarafından Üretilen Bazı Önemli Sekonder Metabolitler

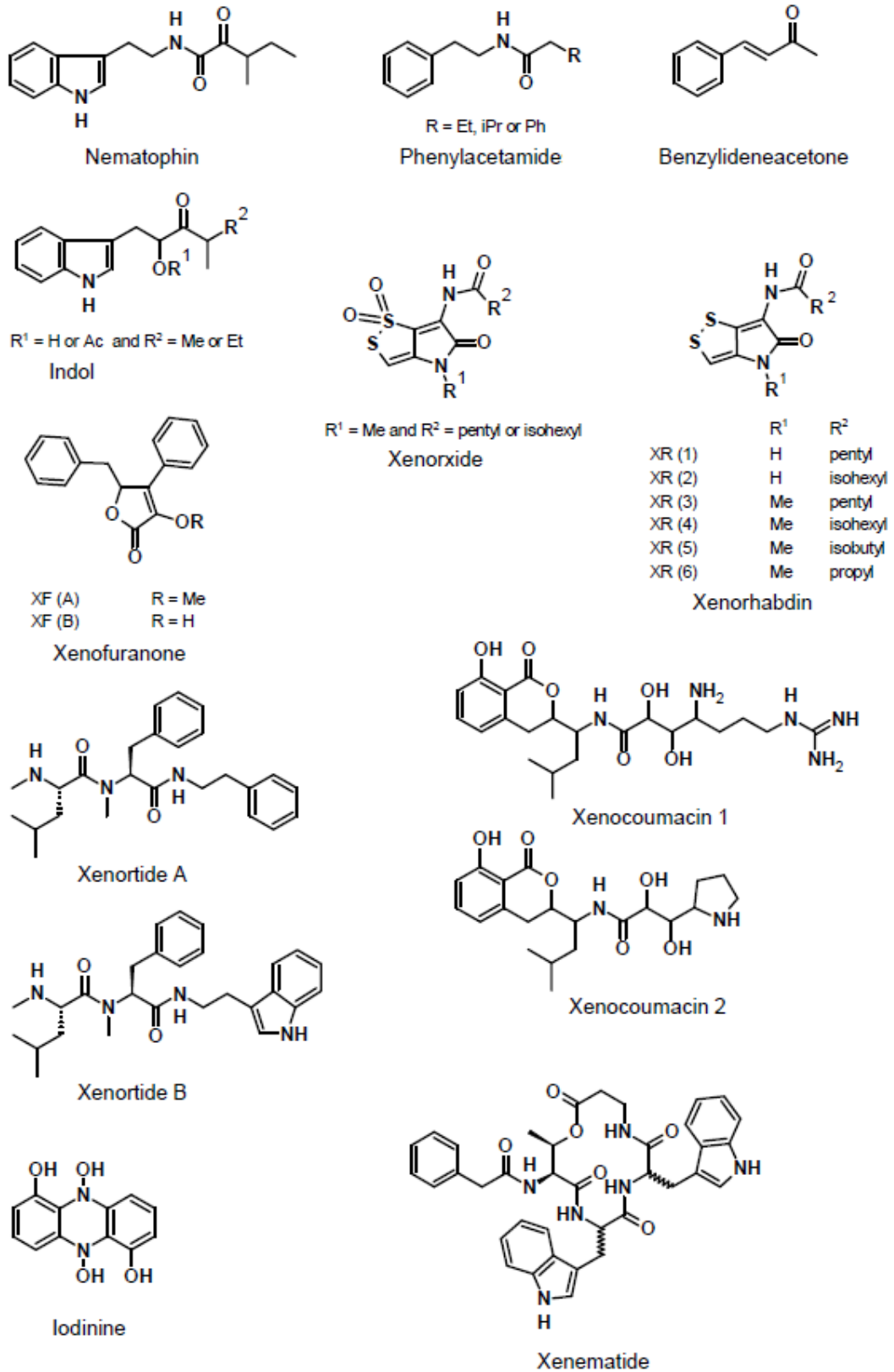
Xenorhabdus ve *Photorhabdus* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitler, çeşitli yöntemler kullanılarak tanımlanabilmektedir. Bu yöntemlerden en çok kullanılanı; yüksek miktarda sentezlenen moleküller için uygun olan Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemidir (Brachmann vd., 2006). Bunun yanı sıra, bu türlerin patojenitesinde ve mutualistik yaşamında öneme sahip olduğu düşünülen bazı maddelerin üretiminden sorumlu gen kümeleri sessiz veya kriptomik olduğundan laboratuvar koşullarında üretilmesi ve saptanması kolay olmamaktadır. Böyle bir durum söz konusu olduğunda, farklı yöntemlere başvurulabilmektedir. Bu yöntemlerden bazıları, promotor bölgenin değiştirilmesi (Brachmann vd., 2012; Bode vd., 2015), heterolog gen ekspresyonu (Brachmann vd., 2012; Dudnik vd., 2013; Schimming vd., 2014) ve büyüme ortamlarının doğal koşullara daha uygun şekilde oluşturulmasıdır (Scherlach ve Hertweck, 2009; Brachmann vd., 2012; Theodore vd., 2012).

Geçtiğimiz son 30 yılda, *Photorhabdus* (Şekil 1.5) ve *Xenorhabdus* 'lardan (Şekil 1.6) özgün yapıda ve biyo-çeşitlilikte 15'ten fazla sekonder metabolit grubu izole edilmiştir (Brachmann vd., 2008). Bunlardan ilk tanımlananlar, *Photorhabdus*'lara ait, bitkiler tarafından da sentezlendikleri bilinen, stilbenler grubundan 4 adet sekonder metabolittir (Paul

vd., 1981). Farklı stilben tiplerinden bazıları, nematodlarla kurulan mutualistik ilişkide rol alırken, bazıları antibakteriyel etkiye sahiptir (Joyce vd., 2008; Joyce vd., 2011). Ayrıca bunların üç farklı insan kanser hücre hattına karşı sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Hu vd., 2006).



Şekil 1.5. *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları.



Şekil 1.6. *Xenorhabdus*'lar tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları.

Photorhabdus'lar tarafından üretilen bir başka sekonder metabolit grubuna ise antrakininonlar adı verilmektedir (Richardson vd., 1988). Bu madde genellikle bitkiler tarafından üretilmektedirler. *Photorhabdus*'lar Gram negatif bakteriler arasında antrakininon üreten tek cinstir. Antrakininonların *Photorhabdus* bakterilerindeki işlevi henüz tam olarak açıklanamamıştır fakat kuş ve karıncaları enfekte kadavradan uzaklaştırıcı etkileri olduğunu düşünülmektedir (Fenton, 2011).

Bunların yanısıra *Photorhabdus* türlerinden izole edilen trans-cinnamic asit (TCA) (Bock vd., 2014) ve stilben türevleri (Joyce vd., 2008; Shi vd., 2017) yüksek antifungal etki göstermektedir. TCA, *P. luminescens* bakterisi dışında, tarçın, rezene ve nar gibi bitkilerde de bulunan (Clifford, 1999; Guzman, 2014) organik bir asittir. Anti-inflamatuar, antioksidan, antikanser, nöroprotektif, antimikrobiyal ve antidiyabetik özelliklere sahip olması sebebiyle tarım, gıda ve tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Clifford, 1999; Guzman, 2014; Ruwizhi ve Aderibigbe, 2020).

Bunlara ek olarak *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen, PirAB (Ahantarig vd., 2009) ve toxin complex a (tca) (Bowen vd., 1998) proteinleri insektisidal özellik göstermektedir (Ahn vd., 2013).

Xenorhabdus cinsine ait türlerden tanımlanan sekonder metabolitler de çok çeşitlilik göstermektedir. *Xenorhabdus nematophila*'dan izole edilen küçük ve ısıya dayanıklı benzylideneacetone adı verilen bir madde bulunmaktadır. Uzun süredir kozmetik ve gıda sektörlerinde katkı maddesi olarak kullanılmakta olan bu molekülün daha sonrasında bazı Gram negatif bitki patojeni bakterilere karşı biyoaktivite gösterdiği belirlenmiştir (Ji vd., 2004). Yine *X. nematophila* tarafından üretilen, nematophin maddesi ise hem antibakteriyel hem de antifungal etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar antibiyotiklere dirençli *Staphylococcus aureus* türüne karşı da biyoaktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Li vd., 1997a, 1997b).

İndol türevleri ve xenorhabdinlerin, *X. bovienii* ve *X. nematophila* tarafından ortak olarak sentezlendiği bilinmektedir (Sundar ve Chang, 1993). İndoller, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkiye sahiptirler ve etki mekanizmaları RNA sentezini inhibe etmektir (Seo vd., 2012). Bunun dışında tarımsal ve tıbbi fungal patojenlere karşı da biyoaktiviteleri mevcuttur (Sundar ve Chang, 1993; Li vd., 1995). Bunlara ek olarak *X. bovienii* türünün antifungal, antibakteriyel ve insektisidal aktivitesi bulunan xenorhadesleri de ürettiği bilinmektedir (McInerney vd., 1991a; Li vd., 1998).

Xenorhabdus nematophila ve *X. doucetiae* tarafından ortak olarak üretilen phenethylamidler, insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite göstermektedir (Paik vd., 2001). Bunun dışında xenocoumacinler adı verilen güçlü ve geniş spektrumlu antibiyotikler de yine bu iki tür tarafından üretilmektedir. Türevlerinden hem xenocoumacin 1 (Xnc1) hem de xenocoumacin 2 (Xnc2)'nin birçok Gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyel etki gösterdikleri bilinmektedir. Ayrıca bu iki türev de anti-ülser aktivitesine sahiptir ve antifungal etkileri olduğu da tespit edilmiştir (McInerney vd., 1991b; Yang vd., 2011; Guo vd., 2017).

Bir başka önemli sekonder metabolit grubu olan fabclavinler 2014 yılında *X. budapestensis* ve *X. szentirmaii* türlerinden izole edilerek tanımlanmıştır. Aynı zamanda fabclavinlerin sentezinden sorumlu 50 kb uzunluğunda olan biyosentez gen kümesi de tespit edilmiştir (Fuchs vd., 2014). Fabclavinler, Gram pozitif ve negatif bakteriler, funguslar ve protozoonlara karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedirler. Bu sebeple geçtiğimiz yıllarda fabclavinler üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır (Fuchs vd., 2014; Donmez-Ozkan vd., 2019; Cimen vd., 2021). Fabclavinler, non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) ve Poliketid sentetaz (PKS) tarafından sentezlenen, çoklu doymamış yağ asidi sentetazdan (PUFA) türemiş bir poliamin grubuna sahip olan heksapeptit/poliketid hibritleridir (Fuchs vd., 2014). Bu uzun yapıdaki fabclavinlerin yanı sıra daha kısa türevleri de tanımlanmıştır. Bu kısa fabclavinlerde biyosentez direkt olarak ikinci NRPS enzimi olan FclJ ile başlamaktadır ve sonucunda heksapeptit yerine bir dipeptit ortaya çıkmaktadır (Wenski vd., 2019). Fabclavinler, yapısal olarak *Serratia plymuthica* ve *Dickeya zea* bakterileri tarafından üretilen (pre)zeaminlere benzemektedirler (Masschelein vd., 2013; Zhou vd., 2011). Bununla birlikte, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* genomları üzerine yapılan biyoinformatik analizler, fabclavin veya benzeri bileşiklerin üretiminin bu türler arasında yaygın olabileceğini ortaya koymuştur (Wenski vd., 2019; Tobias vd., 2017).

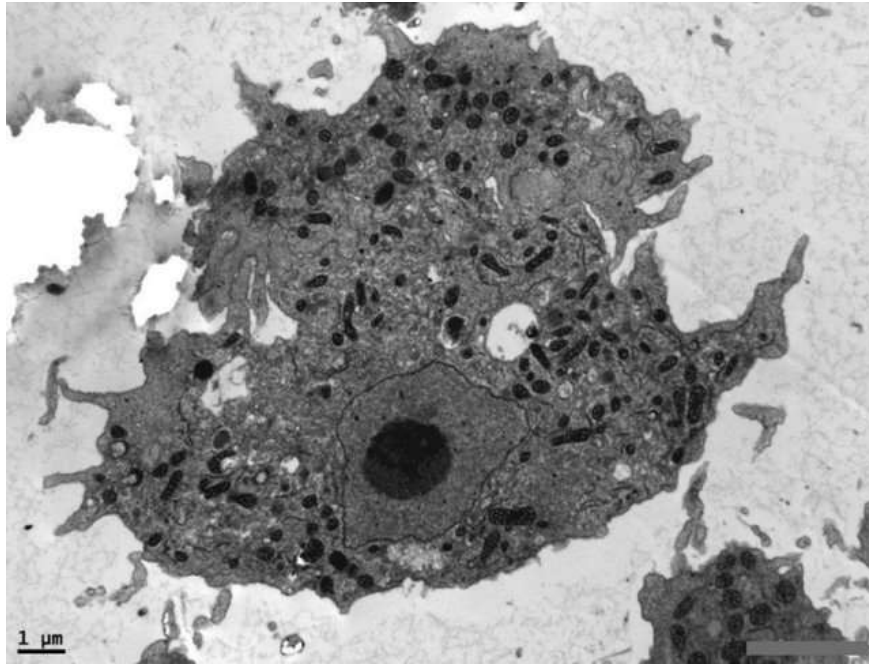
Daha önce de bahsedildiği gibi *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakteriler yaşadıkları rekabetçi toprak ortamında hayatta kalabilmek için birçok farklı ve etkili sekonder metabolit üretmektedirler. Ancak bunların antiprotozoal aktivitelerine yönelik yapılan çalışma sayısı oldukça azdır.

Protozoa gurubu içerisinde yer alan organizmalar genellikle mikroskobik tek hücreli ve ökaryotik organizmalardır. Tek hücreli olmalarına rağmen, çok hücrelilerde görülen yaşamsal işlevlerin birçoğunu yapabilirler. Protozoa gurubu içerisinde serbest yaşayan türlerin yanısıra paraziter yaşam sürdüren türler de mevcuttur. Dünya çapında her sene milyonlarca insan parazit kaynaklı hastalıklar veya bu hastalıklara bağlı komplikasyonlar sebebiyle yaşamını

kaybetmektedir. Bu hastalıklar çok bulaşıcı olduklarından dolayı toplum sağlığı için risk teşkil etmektedirler. Parazitlere karşı yapılan aşı çalışmaları çoğunlukla başarısız olmakta ve mevcut ilaçların uzun süredir kullanılıyor olması nedeniyle de ilaç direnci oluşmaktadır. Bu parazitlerden *Acanthamoeba castellanii* ve *Leishmania tropica* türleri insanlarda hastalık yapan önemli protozoalar arasındadır.

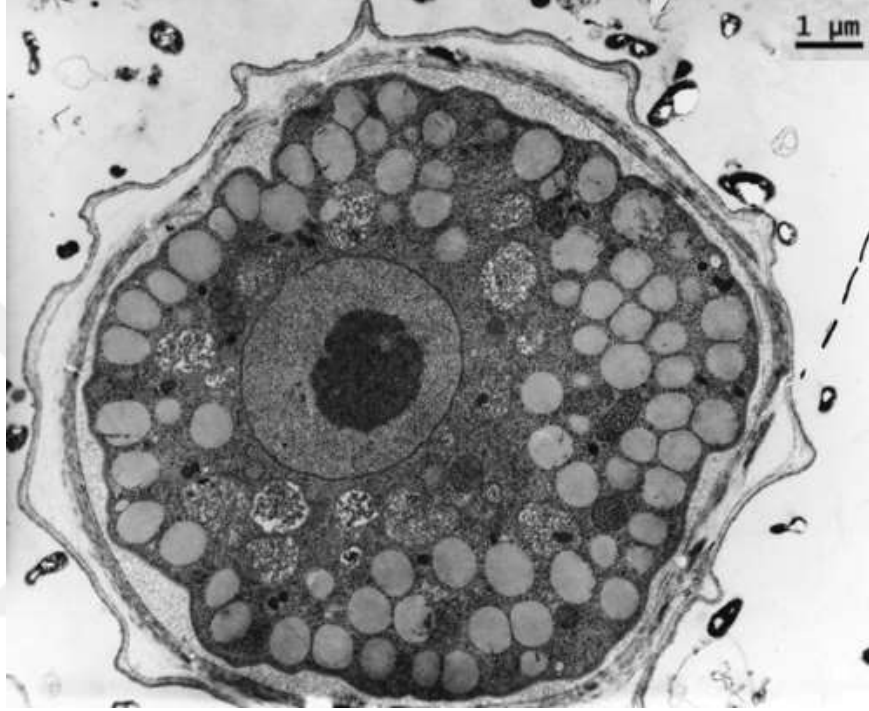
1.3. *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba castellanii, toprak ve suda serbest olarak yaşayan ameboid bir protozoandır. Havalandırma ve soğutma sistemleri, hatta şişelenmiş sular da dahil olmak üzere birçok insan yapımı ortamdan izole edilebilmektedirler (De Jonckheere, 1991). Trofozoitleri tipik olarak 15-30 µm uzunluğundadır. En belirgin morfolojik özellikleri, sitoplazmalarında çok sayıda büyük vakuollere ve acanthopod adı verilen ince uzun, sivri yapıdaki yalancı ayaklara sahip olmasıdır (Resim 1.1). Serbest yaşayan trofozoit formu bölünerek çoğalır ve birçok bakteri türü ve nispeten küçük yapıdaki ökaryotlarla beslenirler (Weekers vd., 1993, Gomez-Couso vd., 2007).



Resim 1.1. *Acanthamoeba castellanii* trofozoitine ait transmisyon elektron mikroskop görüntüsü (Cateau vd., 2014).

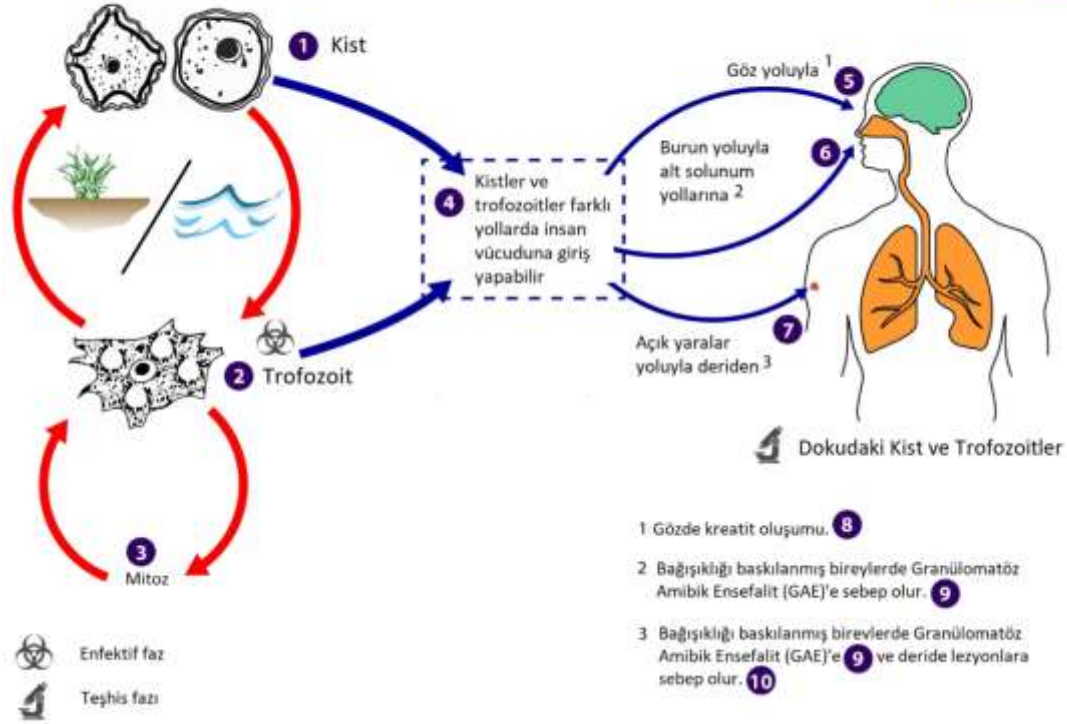
Trofozoitler, uygun olmayan çevre koşullarında kist oluşturabilmektedir. Bu oluşan kist formu, besinsizlik, kuruluk, aşırı pH ve sıcaklık ile mevcut birçok antimikrobiyal maddeye karşı oldukça dirençlidir (Aksozek vd., 2002, Coulon vd., 2010). Kistin morfolojik yapısı da oldukça belirgindir. İç kısmı düz ve yuvarlak, dış kısmı ise kıvrımlı olan iki adet hücre duvarına sahiptir (Pussard ve Pons, 1977) (Resim 1.2).



Resim 1.2. *Acanthamoeba castellanii* kistine ait transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. (Cateau vd., 2014).

Acanthamoeba ilk olarak 1930'da Castellani tarafından resmen tanımlanmış ve cinsi *Hartmanella* olarak belirlenmiştir (Culbertson vd., 1965). Kısa bir süre sonra ise revize edilerek *Acanthamoeba*'lar farklı bir cins olarak kabul edilmiştir.

Acanthamoeba patojenitesine ilişkin ilk gözlemler Culbertson tarafından yapılmıştır. Memeli doku kültüründe kontaminasyon olarak farkettilikten kısa süre sonra hem *in vitro* hem de *in vivo* patojenitesi üzerine çalışmalar yapmıştır (Culbertson vd., 1958, 1959). Takip eden yıllarda çok sayıda klinik vaka raporu ortaya çıkmaya başlamıştır. *Acanthamoeba* türleri iki farklı hastalığa yol açabilmektedir. Bunlar *Acanthamoeba* kreatiti (AK) ve Granüloamatöz *Acanthamoeba* ensefaliti (GAE) olarak adlandırılmaktadır (Jones vd., 1975; Martínez vd., 1977; Visvesvara vd., 1983; Gardner vd., 1991) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. *Acanthamoeba castellanii*'nin yaşam döngüsü (CDC'den alınarak modifiye edilmiştir).

Bu iki hastalığa da özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde fırsatçı enfeksiyonlar olarak rastlanmaktadır (Slater vd., 1994; Feingold vd., 1998; Steinberg vd., 2002; Tilak vd., 2008). Her geçen gün, kanser, HIV/AIDS gibi hastalıklara karşı kullanılan immün baskılayıcı tedavilerin çoğalması sebebiyle bu tür fırsatçı enfeksiyonlar için risk grubundaki insan sayısı artmaktadır (Friedland vd., 1992; Schwarzwald vd., 2003; Nachega vd., 2005).

Acanthamoeba kreatiti, şiddetli iltihaplanma, yoğun ağrı ve görme bozukluğuna neden olan ve tedavi edilmezse gözün kaybına yol açan bir kornea enfeksiyonudur. Enfeksiyon, trofozoitin kornea epiteline yapışmasıyla başlar ve gelişir. Hastalığın ileri aşamalarında, parazitler stromal tabakayı istila etmekte ve sonuçta ortaya çıkan opasite görme kaybı ve sonunda körlüğe yol açmaktadır (Jones vd., 1975; Awwad vd., 2007). Eğer kişide halihazırda kornea hasarı mevcutsa hastalığa yakalanma riski daha yüksektir. Bu nedenle AK enfeksiyonlarının %80'inden fazlasına kontakt lens kullanıcılarında rastlanmaktadır (Moore vd., 1985; Alizadeh vd., 2005; Gagnon ve Walter, 2006).

Hastalığın tanısı, korneadan alınan biyopsiden veya kontakt lensten *A. castellanii*'nin izole edilmesiyle koyulmaktadır. Hızlı teşhiste PCR tabanlı yöntemler de mevcuttur fakat yüksek maliyetli olduklarından daha az kullanılmaktadır (Mathers vd., 2000; Yera vd., 2007).

Standart AK tedavisi çok karmaşık ve uzundur, yüksek yoğunluklu poliheksametilen biguanid ve propamidin izetionat kullanılırsa, kornea nakline gerek kalmadan tedavi edilmesi mümkün olabilmektedir (Tien ve Sheu, 1999; Gooi vd., 2008).

Bunun yanısıra AK enfeksiyonuyla birlikte, bakteriyel ve fungal ikincil enfeksiyonlar da görülebilmektedir ve bu durum tedaviyi zorlaştırmaktadır (Rumelt vd., 2001; Rama vd., 2003; Lorenzo-Morales vd., 2007). Ek olarak, parazitin kist formuna geçmesi de tedavide sorun teşkil etmektedir. Bu durumda semptomlar hafiflemekte fakat enfeksiyon ileri bir tarihte yeniden ortaya çıkmaktadır (Peterson vd., 1990). Hastalığın en kesin tedavisi kornea nakli olarak kabul edilmektedir. Fakat kornea nakli yapıldığı durumlarda bile hastalığın nüksetme riski bulunmaktadır. Bu durumda kornea naklinin enfeksiyon tamamen ortadan kalkana kadar birkaç defa yapılması gerekmektedir (Peterson vd., 1990; Camposampiero vd., 2009).

Tüm bu zorlukların yanısıra, *A. castellanii*'nin sebep olduğu en şiddetli hastalık AK değildir. Granülomatöz *Acanthamoeba* ensefaliti (GAE), bağışıklığı baskılanmış bireylerde görülen, amiplerin nöral dokuya girerek nekroza ve şiddetli ensefalite sebep olan, oldukça fırsatçı bir enfeksiyondur (Martínez vd., 1977; Di Gregorio vd., 1992). Enfeksiyon pulmoner lezyonlar yoluyla veya amibin kist formunun burundan alınmasıyla meydana gelmektedir. Daha sonrasında trofozoitler kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemine ulaşmaktadır (Culbertson vd., 1959; Kidney ve Kim, 1998; Khan ve Siddiqui, 2009).

Hastalığın seyri yavaştır ve belirtiler arasında; baş ağrısı, ateş, kusma, davranış değişimleri, afazi, ataksi ve nöbetler bulunmaktadır. Tüm bu semptomlara birçok nörolojik rahatsızlıkta ortak olarak rastlandığından sıklıkla yavaş ve yanlış tanı konulmaktadır (Khan, 2007; Pemán vd., 2008; Bloch ve Schuster, 2005). Teşhisin doğrulanması için, parazit beyin omurilik sıvısından (BOS) izole edilip kültürde *in vitro* olarak üremesine bakılmaktadır. Bu yöntem hem çok uzun sürmekte hem de kesinliği bulunmamaktadır (Petry vd., 2006; Abd vd., 2009; da Rocha-Azevedo vd., 2009). Önerilen bir tedavi bulunmamakla birlikte, erken teşhiste birden fazla ilacın birlikte kullanımı prognozu iyileştirebilmektedir. Tercih edilen ilaçlara örnek olarak; ketokonazol, flukonazol, vorikonazol, sülfadiazin, miltelfosin, amfoterisin B, maksifloksasin, linezolid, meropenem azitromisin ve rifampin

verilebilmektedir (Ofori-Kwakye vd., 1986; Seijo Martinez vd., 2000; Aichelburg vd., 2008; Sheng vd., 2009; Lackner vd., 2010). Hastaların bağışıklığı zayıflamış durumda olmaları, teşhis ve tedavideki zorluklarla birleştiğinde, %90 gibi endişe verici derecede yüksek ölüm oranına yol açmaktadır (Bloch ve Schuster, 2005; Khan, 2005). Neyse ki, GAE enfeksiyonuna çok sık rastlanmamaktadır (Martinez ve Visvesvara, 1997). Bu sebeple büyük bir sorun gibi görülmemektedir. Fakat hastalığın teşhisinin zor olduğu unutmamalıdır. Sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu ve özellikle HIV vakalarının sık görüldüğü ülkelerde teşhis ve tedavi edilmemiş vakaların çok sayıda olması ihtimali de bulunmaktadır.

Acanthamoeba castellanii'nin neden olduğu her iki enfeksiyonun tedavisinde ayrı ayrı zorluklar vardır. Sadece bağışıklığı baskılanmış bireylerde görülen GAE; ölümcül, kesin bir tedavisi olmayan ve dünya çapında özellikle HIV vakaları arttıkça daha fazla insanın risk altına girdiği bir enfeksiyondur. Diğer yandan AK, sağlıklı bireylerde bile görülebilmektedir ve gözün kaybına kadar varan ciddi sonuçları bulunmaktadır. Tüm bu sebepler birlikte göz önünde bulundurulduğunda, *A. castellanii*'ye karşı yeni, etkili ve alternatif etken maddelerin keşfi çok büyük önem teşkil etmektedir.

1.4. *Leishmania tropica*

Leishmania türlerinin sebep olduğu Leishmaniasis, özellikle yoksul ülkelerde yaygın olarak görülen, ihmal edilmiş, vektör ve parazit kaynaklı tropikal bir enfeksiyondur (Pace, 2014). İhmal edilmiş hastalıklar sınıfında olmasının başlıca nedenleri; etkili, uygun fiyatlı ve kolay erişilebilir tedavi yöntemlerinin bulunmamasıdır. Özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde rastlandıklarından ilaç endüstrisi tarafından da göz ardı edilmektedirler (Yamey, 2002). Bununla birlikte uluslararası seyahatlerin artması, küresel ısınmayla vektörün aktivite alanının genişlemesi gibi nedenlerden dolayı vaka sayıları artmaktadır ve daha da artması beklenmektedir (Field vd., 2010). Bu durum, Leishmaniasis enfeksiyonlarının önlenmesi için yapılan çalışmaların artmasını gerektirmektedir.

Leishmania türleri protozoan parazitlerdir. Hastalık ve parazit ilk olarak 1903'te Leishman ve Donovan tarafından tanımlanmıştır (Murray, 2002). Leishmaniasis klinik ve epidemiyolojik olarak çok çeşitlilik göstermektedir ve paraziter hastalıklar arasında morbidite ve mortalite oranları en yüksek olanlardan biridir. Bu farklı kliniklerden biri olan Kutanöz leishmaniasis, *L. tropica* tarafından meydana getirilmektedir. Bu hastalık, ciltte bir veya daha

fazla yara ya da nodül oluşmasıyla sonuçlanmakta, bu nodüller birkaç ay sonra tedavi edilmese de kendiliğinden iyileşmekte fakat yara izi bırakmaktadır. Parazitin farklı türleri, iyileşmesi aylar ve hatta yıllar alan lezyonlara da sebep olabilmektedir (Reithinger vd., 2007) (Resim 1.3).



Resim 1.3. Kutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu yara izleri (skar) (WHO'nun web sitesinden alınmıştır).

Kutanöz Leishmaniasis bazı durumlarda kendi kendine iyileşme göstermeyip vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparak, Mukozal Leishmaniasis ve Diffüz kutanöz Leishmaniasis'e neden olabilmektedir (Zangger vd., 2014). Kutanöz Leishmaniasis'in iyileştikten sonra kişinin özellikle yüzünde bıraktığı yara izi ve lezyonlar nedeniyle bir çeşit psikolojik ve sosyal damgalanma söz konusu olmaktadır (Bern vd., 2005; Kebede vd., 2013). Leishmaniasis türleri arasından, Visseral Leishmaniasis en yüksek ölüm oranına sahipken, Kutanöz Leishmaniasis ise en yaygın görülen klinik durumdur (Kebede vd., 2013). Kutanöz Leishmaniasis'in son zamanlarda potansiyel olarak viskerotropik olduğu tespit edilmiştir (Jacobson, 2013). Visseral Leishmaniasis ise tedavi edilmediği takdirde ölümcül olan, *Leishmania donovani* ve *Leishmania infantum*'un neden olduğu sistemik bir hastalıktır (Mauricio vd., 2000; Lukes vd., 2007).

Leishmania türleri, baskın olarak memeli konakçıda makrofajları enfekte eden tripanozomatid protozoanlardır (Weigle ve Saravia, 1996). Paraziter hastalık hem yetişkinleri hem de çocukları etkileyebilmektedir (Murray, 2002). Parazit, tropikal ve subtropikal iklime

sahip ülkelerde endemiktir ve farklı coğrafi konumlarda türler arasında da çeşitlilik görülmektedir. *Leishmania* türlerinin kendi aralarında sınıflandırılması, parazitin, vektör olan dişi kum sineği *Phlebotomus* sp. (Diptera: Psychodidae) (Resim 1.4) bağırsaklarında olan gelişimindeki anatomik farklılıklara dayanmaktadır.

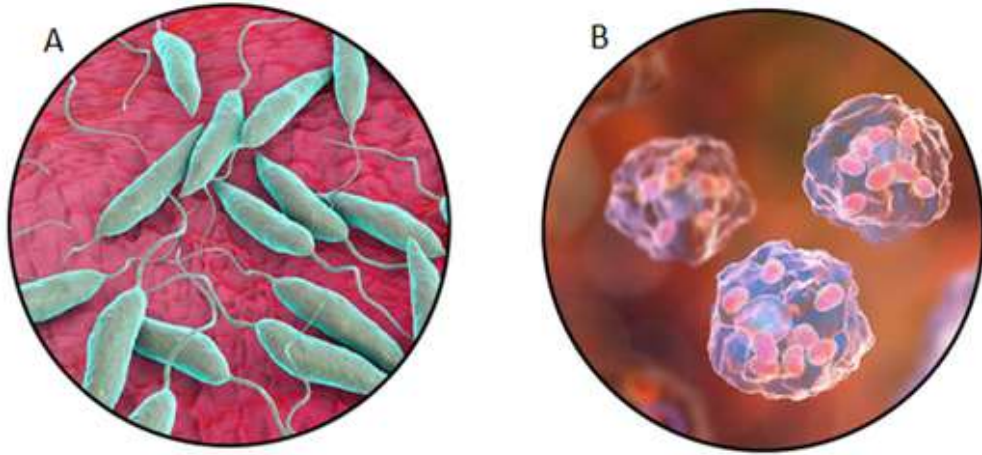


Resim 1.4. *Phlebotomus papatasi* (Fotoğraf CDC'nin sitesinden alınmıştır).

İnsan hastalıklarıyla ilgili olarak iki ana alt *Leishmania* cinsi bulunmaktadır. Bunlar Yeni Dünya Leishmaniasis'i (Amerika) ve Eski Dünya Leishmaniasis'i (Asya, Afrika ve Avrupa) olarak adlandırılmaktadır (Pace, 2014). Hastalığın epidemiyolojik özellikleri ve uygun kontrol yöntemleri birçok faktörden etkilenmektedir. Bunlar arasında, coğrafi konum, parazitin türü, rezervuar, konak ve vektörün biyolojik özellikleri yer almaktadır (Bern vd., 2008). Yetersiz beslenen, kötü koşullarda yaşayan ve bağışıklığı kötü olan insanlar yüksek risk altındadır. Bu durum özellikle yoksul ülkelerde yaşayanları ve HIV gibi sebeplerle bağışıklığı baskılanmış kişileri etkilemektedir (Guerin vd., 2002).

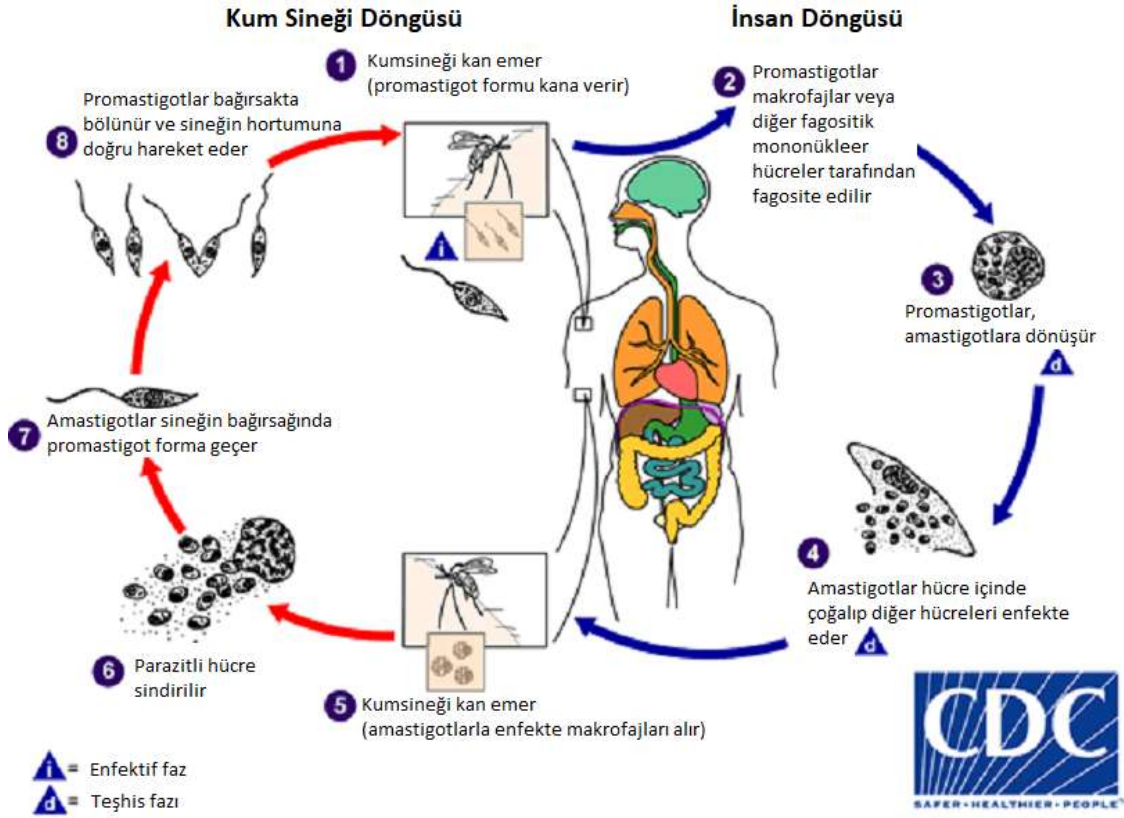
Leishmania türleri antroponotik ve zoonotik olabilir, hayatta kalmaları vektör ve rezervuar arasındaki bulaşmanın başarılı olmasına bağlıdır (Pace, 2014). Antroponotik vakalar genellikle kentsel kesimlerde görülür ve fazlasıyla yaygındır (Jacobson, 2013; Reithinger vd., 2003). Zoonotik vakalar ise kırsal alanlarda yaygındır ve ana rezervuar hayvanlardır (Jacobson, 2013).

Tüm kliniklerde, parazitin hastaya girişi vektör kum sineğinin deriyi ısırmasıyla olmaktadır (Murray, 2002). *Leishmania* türlerinin hayat döngülerinde iki farklı morfolojik form görülmektedir. Bunlardan biri olan promastigot form, 15-20 µm uzunluğunda, hücre dışı ve flagellalıdır. Parazitin bu formu vektör dışı kum sineklerinde görülmektedir (Bates, 2008). Diğer form ise amastigot olarak adlandırılır ve hücre içidir. Kamçısı bulunmaz ve memeli konağın makrofaj veya monositlerinde bulunur (Hommel, 1999) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. *Leishmania* türlerine ait Promastigot (A) ve Amastigot (B) yapıları.

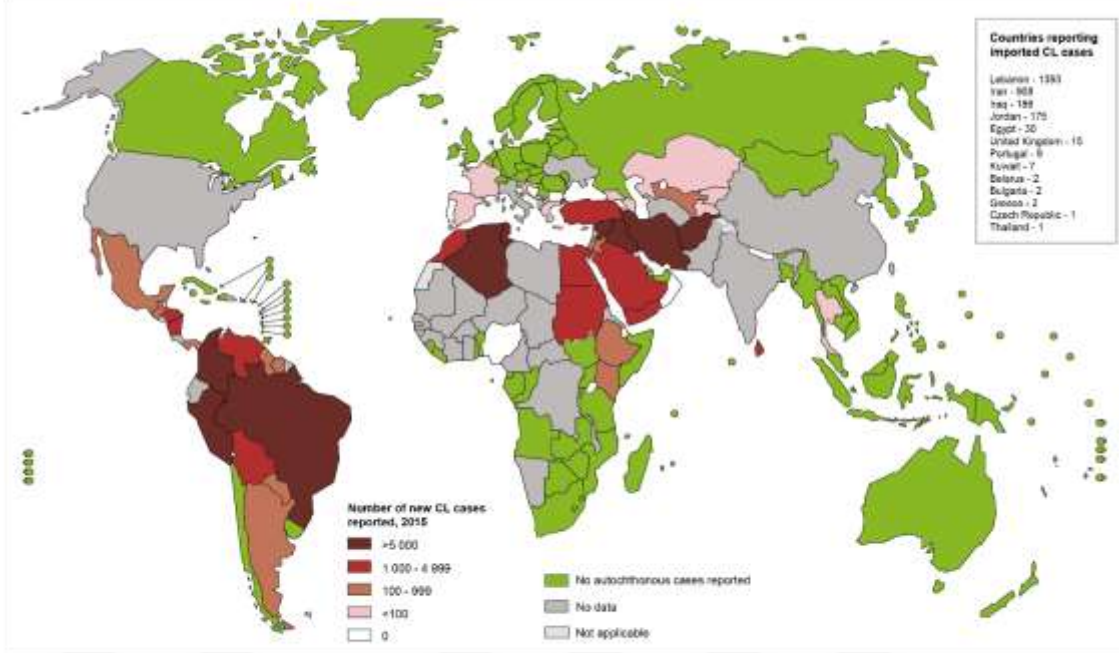
Amastigot form, fagositik hücre içinde gelişir ve çoğalır. Hücre lizise girdikten sonra diğer makrofajları enfekte etmek için ortama dağılır (Hommel, 1999). Hücre içi amastigotlar, Leishman-Donovan cisimcikleri olarak da adlandırılırlar ve teşhiste önemli rol oynarlar. Tipik özellikleri, enfekte klinik örneklerde çekirdekten ayrı olarak boyanabilen mitokondriyal DNA'dan oluşan kinetoplast adı verilen bir yapıya sahip olmalarıdır. *Phlebotom*'lar hasta bireyden kan emdikten sonra amastigotlar, yeniden kamçılı promastigot forma dönerler (Sunter ve Gull, 2017) (Şekil 1.9). Parazitin promastigot formunun *in vitro* kültürü yapılabilmektedir (Santarém vd., 2014).



Şekil 1.9. *Leishmania tropica*'nın yaşam döngüsü (CDC'den alınarak modifiye edilmiştir).

Parazitin genetik değişiminin, vektör dışı kum sineğinin içinde çok sayıda mutasyonun meydana gelmesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte *Leishmania* suşlarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Akopyants vd., 2009).

Leishmaniasis Dünya genelinde 98 ülkede yaygındır (Alvar vd., 2012). Yağmur ormanlarından çöllere, kırsaldan şehire; Avustralya ve Antartika dışında tüm kıtalarda görülmektedir. Ancak Kutanöz ve Visseral Leishmaniasis'in baskın oldukları ülkeler farklılık göstermektedir. Leishmaniasis'in yıllık küresel insidansı 2 milyonun üzerindedir. Bunlardan 1.2 milyonu, tez çalışmasının da hedef parazitlerinden biri olan *L. tropica*'nın sebep olduğunu Kutanöz Leishmaniasis vakalarıdır. Bu vakalar en yaygın olarak Güney Amerika, Afrika ve Güneybatı Asya'da görülür (Plourde vd., 2012). Hastalık aynı zamanda, içinde Türkiye'nin de bulunduğu bazı Akdeniz ülkelerinde de endemiktir (Pace, 2014). Küresel ısınma nedeniyle meydana gelen iklimsel ve diğer çevresel değişiklikler nedeniyle, gelecekte vektörün ve dolayısıyla Leishmaniasis'in coğrafi yayılımının daha da genişleyeceği düşünülmektedir (Patz vd., 2000) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Kutanöz Leishmaniasis'in coğrafi dağılımı (WHO, 2015).

Kutanöz Leishmaniasis için standart hale gelmiş teşhis prosedürleri bulunmaktadır. Deriden veya biyopsi yoluyla örnek alınarak, mikroskop altında ya da kültürde parazitin varlığı tespit edilebilmektedir. Fakat bu yöntemler kesinlik sağlamamaktadır (Kebede vd., 2013). Sistemik antikor tepkileri de olmadığından, serolojik yöntemler de yetersiz kalmaktadır (Herwaldt, 1999). Ayrıca bu testler *Leishmania* türünü ayırt etmek için de kullanılamaz (Kebede vd., 2013). Bu sebeplerden dolayı, Leishmaniasis tanısında yardımcı olarak moleküler teknikler de kullanılmaktadır. Parazite özgü DNA ve RNA'yı saptayabilen moleküler teknikler, analizin duyarlılığı ve saptama hızı açısından avantajlar sağlamaktadır (Wilson, 1995). *Leishmania*'nın farklı türlerini ayırt etmek için de biyokimyasal bir yöntem olan Multilokal enzim elektroforezi kullanılmaktadır. Farklı türlerin bir arada bulunduğu bölgelerde moleküler analizler büyük önem teşkil etmektedir (Foulet vd., 2007).

Şimdiye kadar Leishmaniasis'e karşı başarılı bir aşı geliştirilememiştir. Ayrıca seçenekler arasından en iyi tedavinin hangisi olduğu konusunda da fikir birliği sağlanamamıştır. Bu durum klinik çalışmalarının azlığından kaynaklanmaktadır (Gonzalez vd., 2008). Kutanöz Leishmaniasis genellikle kendi kendine iyileştiği için tedavi birçok faktöre göre şekillenmektedir. Bunların içinde, lezyonların sayısı, yeri, hastalığın etiyolojisi ve kişisel tercihler bulunmaktadır (Plourde vd., 2012). İlaç tedavisinde öncelikli olarak miltefosin, paromomisin ve beş değerli antimon bileşikleri lokal veya sistemik olarak kullanılmaktadır (Manzano vd., 2011; Wortmann vd., 2002). Bu yöntemin, tedavi ediciliği zayıf ve yan etkileri

çok fazla olmasına rağmen alternatifi bulunamadığı için 50 yıldır kullanılmaktadır (Santos vd., 2013). Bu denli uzun süre kullanımdan sonra bazı bölgelerde yüksek ilaç direnci görülmeye başlanmış ve tedavi geçerliliğini tamamen yitirmiştir (Manzano vd., 2011). Parazit ısıya duyarlı olduğundan, tedaviye yardımcı olmak amacıyla radyo frekansları kullanılarak lezyon bölgelerine sıcaklık uygulaması yapılabilmektedir (Plourde vd., 2012). Hali hazırda kullanılan tedaviler minimum dört hafta enjeksiyon gerektirdiğinden, etkili oral tedavi yöntemlerinin keşfi büyük önem taşımaktadır (Murray, 2001, 2002). *Leishmania tropica* ve *L. major*'a karşı tedavide oral yolla triazol (itrakonazol, flukonazol) ve miltefosin kullanımının yararlı olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Gonzalez vd., 2008; Plourde vd., 2012).

Leishmaniasis'in tamamiyle ortadan kaldırılması, kolay ulaşılabilen başarılı tedavinin yanı sıra etkili önleyici yöntemlerin geliştirilmesine de bağlıdır. Günümüzde uygulanmakta olan birkaç kontrol yöntemi bulunmaktadır. Bunlar, vektör kum sineğini ortadan kaldırmaya yönelik ilaçlama çalışmalarının yapılması ve rezervuarların itlaf edilmesidir. Bunlara ek olarak, böcek ilacı emdirilmiş cibinlikler ve köpek tasmaları gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Murray, 2002).

Protozoan parazitlere karşı ileri seviyeye ulaşan ilaç direnci ve istenmeyen yan etkileri nedeniyle yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu konuda yeni çalışmalar yürütülüyor olsa da bunların sayısı yeterli değildir.

Bu tez çalışması kapsamında bir ilk olarak, protozoan parazitlerden *Acanthamoeba castellanii* ve *Leishmania tropica*'ya karşı etkili olabilecek, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen antiprotozoal moleküllerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nollmann vd. (2012) araştırmalarını, *X. szentirmaii* tarafından üretilen ve yakın zamanda tanımlanmış bir depsi-peptid türü olan szentiamid üzerine yapmışlardır. Çalışmalarında biyoaktivite testleri de yapan araştırmacılar, szentiamid sekonder metabolitinin, bazı böcek türlerine ve sıtmaya neden olan *Plasmodium falciparum*'a karşı etkili olduğunu bulmuşlardır.

Grundman vd. (2013) çalışmalarında, *Xenorhabdus* sp. (PB30.3)'den xenobactin adı verilen yeni bir heksadepsi-peptid izole etmişlerdir. Kapsamlı 1D ve 2D NMR testleri yaparak molekülün yapısını aydınlatmış ve üç boyutlu şeklini modellemişlerdir. Daha sonra yaptıkları biyoaktivite testleriyle *P. falciparum*'a karşı yüksek antiprotozoal ve Gram pozitif bir bakteri olan *Micrococcus luteus*'a karşı antibiyotik etki gösterdiğini fakat aynı zamanda bu maddenin oldukça sitotoksik olduğunu keşfetmişlerdir.

Zhou vd. 2013'te *X. doucetiae* (DSM17909) ve *X. mauleonii* (DSM17908) türleri tarafından üretilen sekonder metabolitler üzerine yaptıkları çalışmada, halihazırda bilinen xenocoumacin ve xenorhabdin maddelerine ek olarak yeni bir peptid grubu olan xenoamicinleri tanımlamışlardır. Xenoamicinler, esas olarak hidrofobik amino asitlerden oluşan açillenmiş tridekadepsi-peptidlerdir. Çalışmada, *X. mauleonii*'den izole edilen ve ana türev olan xenoamicin A'nın yapısı detaylı 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak aydınlatılmış ve biyosentezden sorumlu gen kümesi tanımlanmıştır. Daha sonra yürütülen biyoaktivite testleri xenocoumacinin *P. falciparum*'a karşı etkili olduğunu ancak *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *M. luteus* ve *P. aeruginosa* bakteri türlerine karşı antibakteriyel etki göstermediğini ortaya koymuştur.

Fuchs vd. (2014) araştırmalarında, bir peptid-poliketid hibridi olan fabclavinlerin yapısını detaylı NMR ve MS yöntemleri kullanarak aydınlatmışlardır. Fabclavini iki farklı *Xenorhabdus* suşunda tanımlayarak biyosentez gen kümesinin de aydınlatılmasını sağlamışlardır. Fabclavinler bakteri, mantar ve diğer ökaryotik hücrelere karşı geniş spektrumlu aktivite gösterdiğinden, *Xenorhabdus* türlerinin nematod konağı ve onların böcek konukçusunun karmaşık hayat döngüsü boyunca, her türlü rekabete karşı "koruma faktörü" olarak fabclavin ürettiklerini öne sürmüşlerdir.

Grundman vd. (2014) Tayland'da yaptıkları çalışmada, *Xenorhabdus* sp. (PB61.4) türünden, Chaiyaphuminler adını verdikleri 4 adet (A-D) yeni depsipentapeptid izole etmişlerdir. Daha sonra bu peptidlerin yapılarını ayrıntılı olarak ortaya koymak için, 1D ve 2D NMR testleri yapmış, Marfey analizi ve ardından flaş hidrolizi uygulamışlardır. Sonrasında yapının doğrulamasını sağlamak için üç boyutlu modelleme yapılmıştır. Bu Chaiyaphuminler arasından, Chaiyaphumin A'nın sıtma ajanı *P. falciparum*'a karşı yüksek aktivite (IC₅₀ değeri 0.61 µM) gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Bode vd. 2015 yılındaki araştırmalarında, genlerin önündeki doğal promotorun, arabinoz ile indüklenebilen yapay bir promotor olan P_{BAD} ile değişimini entomopatojen bakterilerde, sekonder metabolit biyosentezinde yer alan gen kümelerini susturmak ve/veya aktive etmek için kullanmışlardır. Bu yöntem GameXPeptidlerin, xenoamicinlerin ve indigoidinin "isteğe bağlı" olarak üretimine izin vermiştir. Ayrıca bu yeni yaklaşımdan yararlanarak, xenorhabdinleri ve mevalagmapeptidleri tanımlamışlardır.

Zhao vd. 2018 yılında yaptıkları çalışmada, *Xenorhabdus innexi*'den (DSM 16336) yedi adet yeni rhabdopeptid/xenortide benzeri peptid (RXPs) izole etmişlerdir. Kimyasal yapılarını, yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HR-MS), tek boyutlu (1D) ve iki boyutlu (2D) NMR ile aydınlatmışlardır. Daha sonra bu maddelerin aktivitelerini protozoan parazitlere karşı denemiş ve ardından sıçan iskelet miyoblastında (L6 hücreler) sitotoksitelerini de değerlendirmişlerdir. Test edilen tüm bileşikler sırasıyla 0.07–6.25 ve 0.091–3.16 µM IC₅₀ değerleriyle *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *P. falciparum*'a karşı yüksek etki göstermiş ve bugüne kadar bilinen en aktif RXP türevleri oldukları tespit edilmiştir.

Antonello vd. (2019) çalışmalarında, Chagas hastalığındaki yetersiz tedavi yöntemlerine değinmiş ve *P. luminescens* ile *X. nematophila*'nın tropikal hastalıklara neden olan protozoanlara karşı biyoaktif metabolitler açısından önemli potansiyel kaynaklar olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle çalışmalarında, bu bakteriler tarafından üretilen metabolitlerin *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* aktivitesinin tespiti üzerine deneyler yapmışlardır. Sonuçta, *X. nematophila* ve *P. luminescens* bakterilerinin konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde antiprotozoal aktivite (IC₅₀ XN = 0.34 mg/mL, IC₅₀ PL = 1.0 mg/mL) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Öldürücü etkiden sorumlu bileşiğin, ısıya ve pH'a dayanıklılığını da test eden bilim insanları, bu iki bakterinin Chagas hastalığına karşı olası yeni ilaçlar için potansiyel kaynaklar olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Yabancı Tip ve Mutant Bakterilerin Eldesi

3.1.1. Yabancı Tip Bakterilerin Eldesi

Tez çalışması kapsamında 22 adet *Xenorhabdus* ve 5 adet *Photorhabdus* türü olmak üzere toplam 27 farklı bakteri türü kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Antiprotozoal aktivite testlerinde kullanılan yabancı tip *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakteri türleri.

1- <i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	15- <i>X. innexi</i> DSM 16336
2- <i>X. bovienii</i> SS-2004	16- <i>X. japonica</i> DSM 16522
3- <i>X. vietnamensis</i> DSM 22392	17- <i>X. khoisanae</i> SGI-197
4- <i>X. cabanillasii</i> JM26-1	18- <i>X. beddingii</i> DSM 4764
5- <i>X. szentirmaii</i> DSM 16338	19- <i>X. budapestensis</i> DSM 16342
6- <i>X. stockiae</i> DSM 17904	20- <i>X. miraniensis</i> DSM 17902
7- <i>X. ehlersii</i> DSM 16337	21- <i>X. hominickii</i> DSM 179903
8- <i>X. koppenhoferi</i> DSM 18168	22- <i>X. kozodoii</i> DSM 17907
9- <i>X. indica</i> DSM 17382	23- <i>Photorhabdus kayaii</i> DSM 15194
10- <i>X. maulenoi</i> DSM 17908	24- <i>P. namnaoensis</i> PB 45.5
11- <i>X. poinarii</i> G6	25- <i>P. laumondii</i> TTO1
12- <i>X. griffiniae</i> DSM 17911	26- <i>P. akhurstii</i> DSM 15138
13- <i>X. ishibashi</i> DSM 22670	27- <i>P. thracensis</i> DSM 15199
14- <i>X. doucetiae</i> DSM 17909	

Parazitlere karşı biyoaktivitesi test edilen bu yabancı tip bakteri türlerinden *X. khoisanae* dışındakilerin tamamı Max Planck Enstitüsü/Marburg-Almanya’da bulunan bilim insanı Prof. Dr. Helge B. BODE’den temin edilmiştir. *Xenorhabdus khoisanae* ise Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Omurgasız Hayvanlar Araştırma Laboratuvarında kültürleri sürdürülen *Steinernema beitlechemi* türü entomopatojen nematodlardan izole edilmiştir (Cimen vd., 2016).

Nematodlardan bakteri izole edilirken Büyük Bal Mumu Güvesi olarak da bilinen *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) türüne ait son dönem larvalar kullanılmıştır.

Galleria mellonella larvaları, laboratuvar ortamında, yapay besiyerinde (%22 buğday unu, %22 mısır unu, %11 süt tozu, %5,5 kuru maya, %17,5 balmumu, %11 bal ve %11 gliserin) (Han ve Ehlers, 2000) üretilmiştir (Resim 3.1). Kültür 28°C’de ve karanlık ortamda tutulmaktadır (Mohammad ve Coppel, 1983).



Resim 3.1. *Galleria mellonella* kültürü.

Yeterli büyüklüğe ulaşmış larvalar, içerisinde iki kat kurutma kağıdı bulunan 9cm’lik cam petrilere koyulmuş ve 1000 IJ/ml’lik nematod suspansiyonu ile enfekte edilmiştir. Petriler 36 saat boyunca karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında (24-25°C) tutulmuştur. Bu inkübasyon periyodu sonunda ölen larvalar yüzey sterilizasyonu amacıyla 5 dakika boyunca %95’lik etil alkol içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra steril küçük bir makas yardımıyla larvaların ikinci çift bacaklarından birisi kesilmiş ve çıkan hemolenf sıvısı steril bir öze yardımıyla alınarak NBTA (Nutrient Agar, 0,004% (w/v) Trifenil tetrazolium klorür ve 0,025% (w/v) Bromtimol mavisi) katı besiyerine ekilmiştir (Akhurst, 1980; Boemare, 2002; Tailliez vd., 2010) (Resim 3.2).



Resim 3.2. NBTAs besiyerinde üretilmiş *Xenorhabdus* (A) ve *Photorhabdus* (B) bakterileri.

Hazırlanan petri plakları 30°C’de 48 saatlik inkübasyonun ardından katalaz testi ve mikroskopik inceleme yapılarak bakteri türlerinin saf kültür olduğu ve faz I durumunda oldukları teyit edilmiştir (Orozco vd., 2013).

Hem laboratuvarındaki nematodlardan izole edilen hem de Almanya’dan temin edilen tüm bakteriler antiprotozoal aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere laboratuvarımızda bulunan -80°C’lik inkübatörde stok kültür olarak tutulmuştur. Stok kültürler hazırlanırken katı besiyerinde bulunan bakteriler steril bir öze yardımıyla Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson Company) sıvı besiyeri ortamına alınmış ve 24 saat boyunca 30°C ve 150 rpm’e ayarlı çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Üreyen bakteriler, %40’lık steril gliserin çözeltisi ile eşit oranda karıştırılmış ve 2 ml’lik cryo tüplere aktararak -80 °C’ye kaldırılmıştır (Orozco vd., 2013).

3.1.2. Mutant Bakterilerin Eldesi

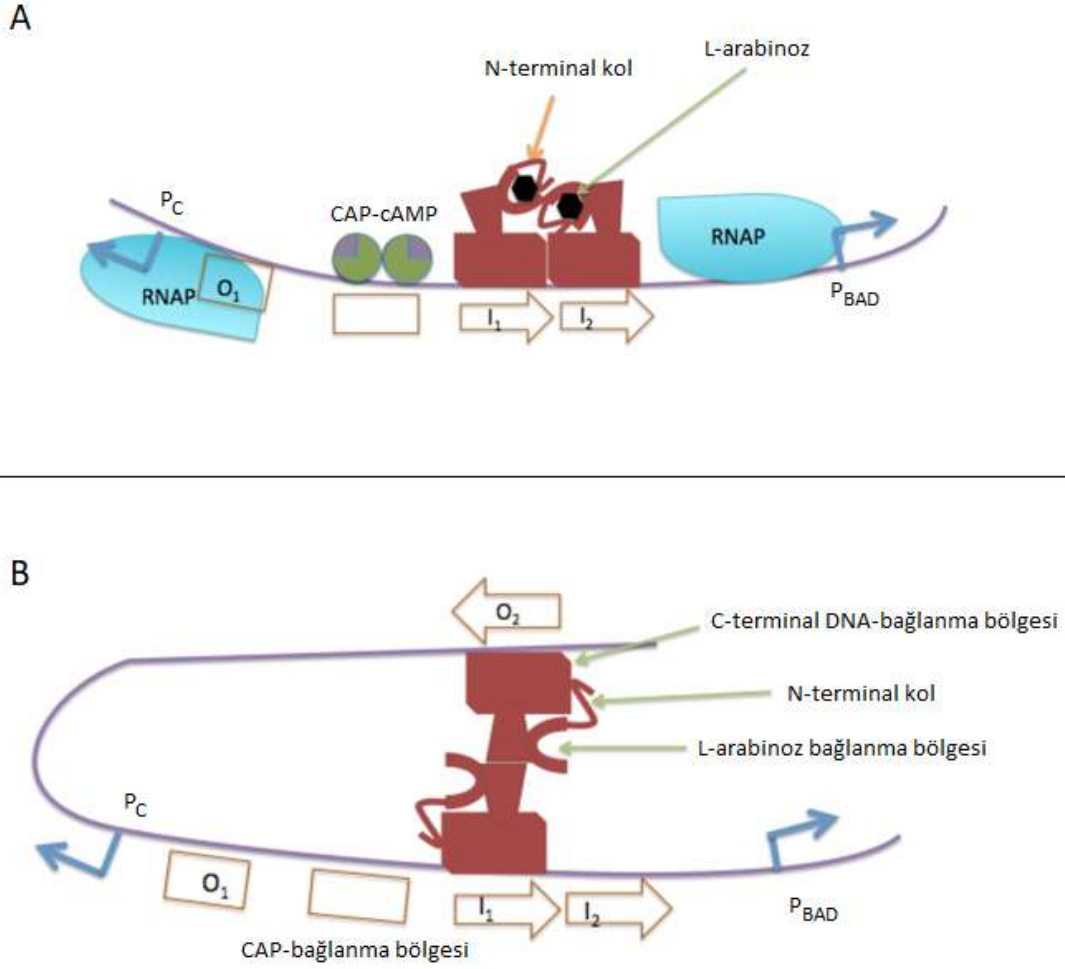
Çalışmanın ilk bölümünde belirtilen 27 adet yabancı tip bakteri türüyle denemeler tamamlandıktan sonra, bu bakterilerden yüksek biyoaktiviteye sahip olduğu belirlenen bazı türler seçilerek bu türlere ait promotor bölgesi değiştirilmiş mutant bakteriler elde edilmiştir. Bu türlerde etkili antiprotozoal maddeyi tespit edebilmek adına, her biri farklı tek bir sekonder metaboliti üreten çok sayıda mutant suş elde edilmiştir (Cai vd., 2017; Bode vd., 2019)

(Çizelge 3.2). Bu mutantlar kullanılarak bakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitlerden hangilerinin antiprotozoal madde olduğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.2. Oluşturulan mutant bakteri suşları.

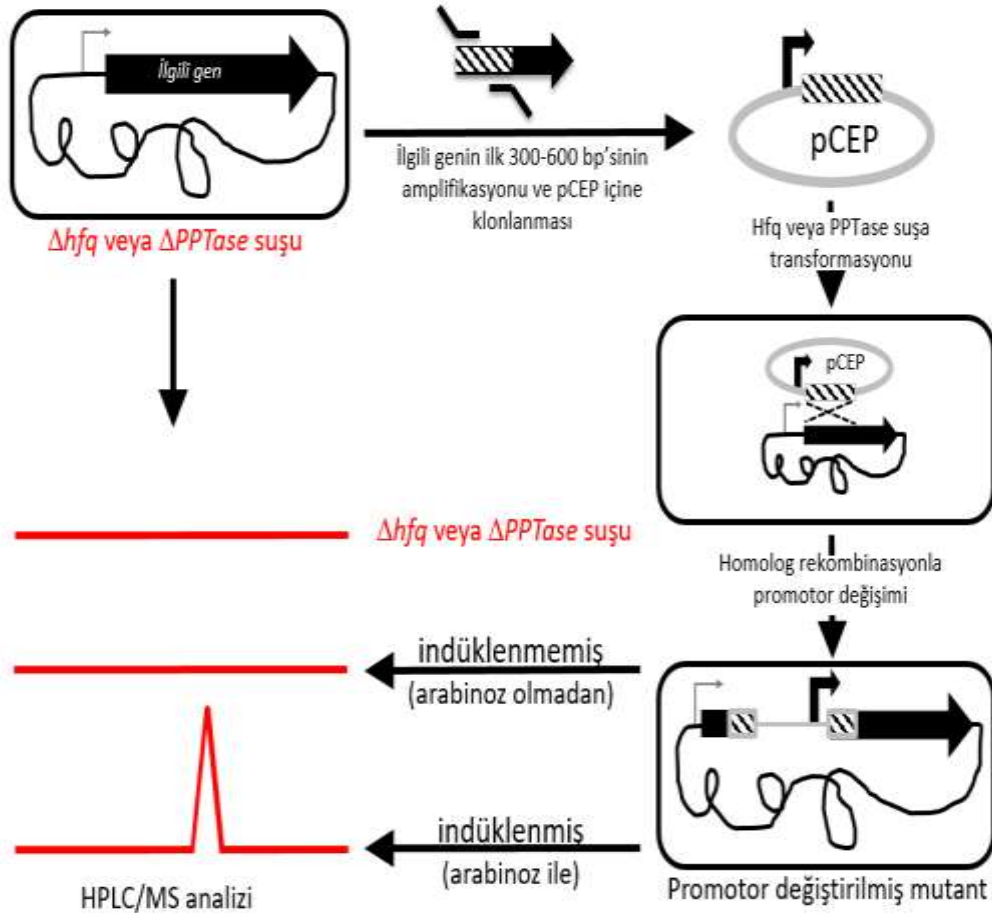
Bakteri Türü	Mutant İsmi	Sekonder metabolit	Bakteri Türü	Mutant İsmi	Sekonder metabolit
<i>X. szentirmii</i>	$\Delta hfq_pCEP_KM_0346$	GameXPeptide	<i>X. doucetiae</i>	$\Delta PPTase_P_{BAD_isnA}$	Rhabduscine
	$\Delta hfq_pCEP_KM_0377$	Pax-short		$\Delta hfq_P_{BAD_xcnA_km}$	Xenocoumacine
	$\Delta hfq_pCEP_KM_1979$	Szentirazin		$\Delta hfq_P_{BAD_xrdA_km}$	Xenorhabdin
	$\Delta hfq_pCEP_KM_3397$	Rhabdopeptide		$\Delta hfq_P_{BAD_xabA_km}$	Xenoamicin
	$\Delta hfq_pCEP_KM_3460$	Szentiamid		$\Delta hfq_P_{BAD_PAX_km}$	PAX peptid
	$\Delta hfq_pCEP_KM_3680$	Xenobactin		$\Delta hfq_P_{BAD_gxpS_km}$	GameXPeptid
	$\Delta hfq_pCEP_KM_3942$	Rhabduscin		$\Delta hfq_P_{BAD_prtA}$	Protegomycin
	$\Delta hfq_pCEP_KM_5118$	Pyrrolizixenamide		$\Delta hfq_P_{BAD_DC_km}$	Acylamide
	$\Delta hfq_pCEP_KM-fcIC$	Fabclavin		<i>X. cabanillasii</i>	$\Delta hfq_128-129$
	$\Delta hfq_pCEP_KM-xfSA$	Xenofuranone	<i>X. hominickii</i>	$\Delta hfq_130-131$	Fabclavine
<i>X. nematophila</i>	$\Delta hfq_pCEP_kan_XNC1_2022$	Xenotrapeptid	<i>X. budapestensis</i>	DSM16342_pCEP_fcIC	Fabclavine
	$\Delta hfq_pCEP_kan_XNC1_1711$	Xenocoumacin	<i>X. indica</i>	pCEP_kan_132/133	Fabclavine
	$\Delta hfq_P_{BAD_XNC1_xndA}$	Xenortide	<i>X. stockiae</i>	Δhfq_pCEP_fcIC	Fabclavine
	$\Delta hfq_pCEP_kan_XNC1_2783$	PAX peptid			
	$\Delta hfq_P_{BAD_XNC1_2228}$	Rhabdopeptide			
	$\Delta hfq_P_{BAD_XNC1_2713}$	Xenematide			
	$\Delta PPTase_P_{BAD_XNC1_isnA}$	Rhabduscine			
	$\Delta hfq_\Delta isnAB_P_{BAD_XNC1_2300}$	Xenortide			

Mutant bakteriler oluşturulurken, promotor değişim yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle bakterilerin ürettiği sekonder metabolitlerin işlevsel hale gelmesinde rol oynayan Hfq ve PPTase gen bölgesi delesyona uğratarak Δhfq ve $\Delta PPTase$ mutantları oluşturulmuştur. Hfq gen bölgesine sahip olmayan bu mutantlarda herhangi bir işlevsel sekonder metabolit üretimi olmamaktadır (Bode vd., 2015, 2019; Wenski vd., 2020). Daha sonra farklı sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde görev alan gen bölgelerinin önlerinde yer alan promotorlar değiştirilmiştir. Doğal şartlarla indüklenen promotor bölge ile ilgili gen arasına L-arabinoz maddesiyle yapay olarak indüklenebilen P_{BAD} promotoru yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Böylece ilgili gen bölgesinin sorumlu olduğu maddenin üretimi kontrol altına alınmıştır.



Şekil 3.1. Ortamda L-arabinoz bulunduğ (A) ve bulunmadığı (B) durumlarda P_{BAD} promotörü.

Doğal promotörün değiştirilmesi işleminde istenen gen bölgesinin ilk 300-600 baz çiftlik bölgesi PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile çoğaltılmış ve pCEP plazmitine yerleştirilmiştir. Plazmit, elektroporasyon yöntemi kullanılarak, *Escherichia coli* S17-1 λpir (F⁺) suşuna aktarıldıktan sonra konjugasyon yolu ile promotör bölge değişikliği yapılmak istenen bakteriye geçişi sağlanmıştır (Şekil 3.2) (Bode vd., 2015; Tobias vd., 2016). pCEP plazmitinde bulunan kanamisin direnç geni sayesinde, plazmiti alan dolayısıyla promotör bölgesi değiştirilmiş olan bakteriler kanamisin antibiyotiği eklenmiş seçici besiyeri kullanılarak kolayca tespit edilebilmektedir (Bode vd., 2015, 2019).



Şekil 3.2. Promotor Değişim yönteminin Δhfq veya $\Delta PPTase$ suşlarına uygulanması (Bode vd., 2015'ten şematize edilmiştir).

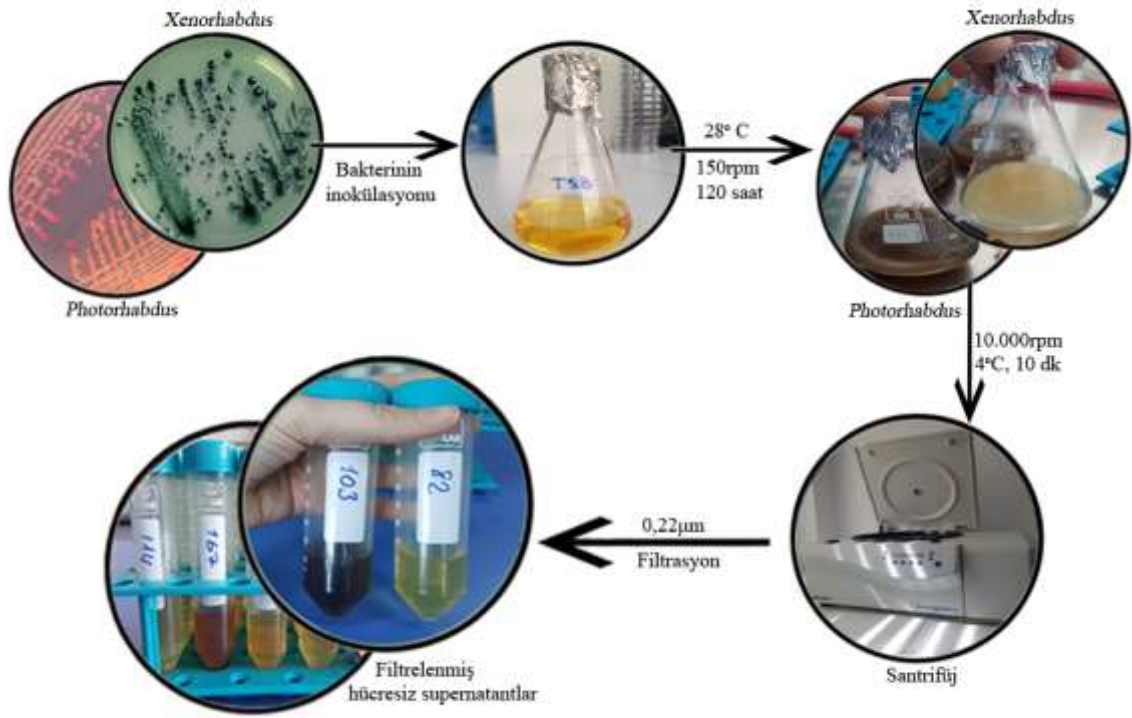
Yapılan tüm bu işlemler sonucunda bakteride bulunan doğal promotor bölgesi işlevsiz hale getirilmiş ve yerine tercih edildiğinde indüklenebilen yeni bir promotor eklenmiştir. Eklenen bu yeni promotor bakterinin üretimi aşamasında ortama indükleyici madde olan L-arabinoz eklenerek aktif edilebilmektedir ve ilgili sekonder metabolit üretimi yabancı tipe oranla daha fazla olmaktadır. Ortamda L-arabinoz bulunmadığı durumlarda ise promotor çalışmamakta ve sorumlu olduğu sekonder metabolit üretilmemektedir (Bode vd., 2015). Promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlar Almanya Max Planck Enstitüsü/Marburg Laboratuvarında elde edilmiştir.

3.2. Bakteri Supernatantlarının Eldesi

3.2.1. Yabancıl Tip Bakterilerden Supernatant Eldesi

Supernatantlar elde edilirken bakteriler stok kültürden steril bir öze yardımıyla alınarak Luria Bertani (LB) (Merck, Darmstad) katı besiyerine ekilmiş ve 30°C'de 24 saat boyunca üremeye bırakılmıştır. Üreyen bakterilerden tek koloni seçilip 10ml'lik steril LB sıvı besiyerinde 30°C ve 150rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick) 24 saat boyunca üretilerek gecelik kültür hazırlanmıştır. Üreyen bakterilerin spektrofotometre (Shimadzu UV1280) ile ölçümü yapılarak hücre yoğunluğu OD₆₀₀'de 1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Cimen vd., 2021). Daha sonra gecelik kültürlerden 1 ml alınarak 100ml steril TSB besiyerine aktarılmış ve 120 saat boyunca 30°C ve 150 rpm'de üremeye bırakılmıştır. Yabancıl tip bakterilerde en fazla sekonder metabolit üretiminin 120 saatin sonunda olduğu bildirilmiştir (Furgani vd., 2008; Donmez Ozkan vd., 2019).

Bakteri hücrelerinden arındırılmış supernatantların eldesi için, üreyen bakteriler steril falcon tüplerine (Corning, NY) aktarılmış, 4°C ve 10,000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (Eppendorf, Centrifuge 5810 R) (Gülcü, 2010; Hazir vd., 2016). Üstte kalan supernatantlar dikkatlice toplanıp yeni falcon tüplerine aktarıldıktan sonra por çapı 0,22 µm olan steril şırınga ucu filtreden (Sartorius Minisart® Syringe Filter) geçirilmiştir (Houard vd., 2013) (Şekil 3.3). Filtreleme işleminin ardından elde edilen supernatantların bakteri hücrelerinden tamamen arındığına emin olmak adına NBTA agar besiyerine ekim yapılarak üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir (San-Blas vd., 2012). Supernatantlar üretimden sonra ya hemen kullanılmış ya da deney kurulumuna kadar maksimum iki hafta olmak üzere 50 ml'lik steril falcon tüplerinde, -20°C'de saklanmıştır (Ng ve Webster, 1997; Muangpat vd., 2017).



Şekil 3.3. Hücrelerinden arındırılmış bakteri supernatantların elde edilme aşamaları.

3.2.2. Mutant Bakterilerden Supernatant Eldesi

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutant bakterilerden supernatant elde edilirken yabani tipten farklı olarak bir indükleme işleminin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla mutant bakteriler, öncelikle Kanamisin (50 µg/ml) içeren seçici LB katı besiyerine ekilerek, 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen bakterilerden alınan tek koloni, 50 µg/ml Kanamisin eklenmiş LB sıvı besiyerine aktarılmış ve gecelik kültür hazırlanmıştır. Üreyen bakteri kültüründeki hücre yoğunluğu spektrofotometrede ölçülerek son konsantrasyonu OD₆₀₀’de 0.1 olacak şekilde 100 ml LB sıvı besiyeri (pH 7.0) içeren erlenlere aktarılmıştır. Çalkamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm’de 1 saat inkübasyona bırakılan mutant bakteri kültürünü indüklemek amacıyla %0,2 oranında L-arabinoz (Roth) eklenmiştir (Bode vd., 2015; 2019; Cimen et al., 2021). Her bir bakteri türünün hem indüklenmiş hem de indüklenmemiş halleri test edileceğinden son basamakta aynı işlem L-arabinoz eklemeyen de yapılmıştır. Hazırlanan kültürler 48 saat boyunca çalkamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm’de üremeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kültürler hücrelerinden arındırılmak amacıyla öncelikle 50ml’lik steril falcon tüplerine aktararak 10,000 rpm ve 4°C’de 10 dakika boyunca

santrifüjlenmiştir. Daha sonra ise 0.22 µm'lik steril filtrelerden (Thermo scientific, NY) geçirilmiştir (Hazir vd., 2016). Hazırlanan hücrelerinden arındırılmış supernatantlar -20°C'de muhafaza edilmiş ve en geç iki hafta içerisinde kullanılmıştır (Muangpat vd., 2017).

3.2.3. Hfq Mutantlarına Ait Supernatantlardan Saf Madde Eldesi

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutantlardan, en yüksek anti-protozoal etkinin meydana gelmesinden sorumlu olanlardan xenocoumacin, PAX ve fabclavin mutantları seçilmiş ve ürettikleri sekonder metabolitler saflaştırılmıştır. Bu işlemde önce mutant suşların indüklenmiş bakteri supernatantları, içinde %2 oranında XAD reçinesi (Sigma) bulunan 6 litrelik LB besiyerinde 3 gün boyunca 130rpm, 30°C'de üretilmiştir. Daha sonra XAD bir filtre yardımıyla süzülerek toplanmış ve oda sıcaklığında metanol (3 x 2L) ile ekstrakte edilmiştir. Sekonder metaboliti elde etmek için metanol ekstraktı, düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Elde edilen ekstrakte edilmiş bileşik ilk olarak DMSO içinde çözülmüş ve daha sonra distile su ile konsantrasyonu 208 µg/ml olan bir stok çözelti hazırlanmıştır (Bode vd., 2019).

3.3. Parazit Kültürlerinin Oluşturulması

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Acanthamoeba castellanii*'ye ait trofozit ve *Leishmania tropica*'ya ait promastigot kültürlerinin üretimi, stoklanması ve antiprotozoal aktivite deney kurulumları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. *Acanthamoeba castellanii* Trofozoit Kültürü

Çalışmada kullanılan *A. castellanii* (ATCC 30010) satın alma yoluyla elde edilmiştir. Trofozoitlerin üretiminde PYG (proteaz, pepton, yeast extract, glukoz) besiyeri kullanılmış ve ortama kontaminasyonu engellemek amacıyla penisilin G (500 U/ml) ve streptomisin (50 µg/ml) antibiyotikleri eklenmiştir (Perez-Serrano vd., 2000). Kültürler 30°C'de inkübe

edilmiş ve haftada bir kez kültürden 500 µL alınarak taze besiyerine aktarılmıştır (Axelsson-Olsson vd., 2009; Heredero-Bermejo vd., 2012). Deney kurulumundan önce, logaritmik büyüme fazındaki *A. castellani* trofozoitleri, 5 dakika boyunca 4°C, 3000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Hücre canlılık durumları mikroskopta (Leica DM IL LED) doğrudan sayım yapılarak değerlendirilmiş ve hücre konstanrasyonu 5×10^5 parazit/mL⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır (Debnath vd., 2014).

3.3.2. *Leishmania tropica* Promastigot Kültürü

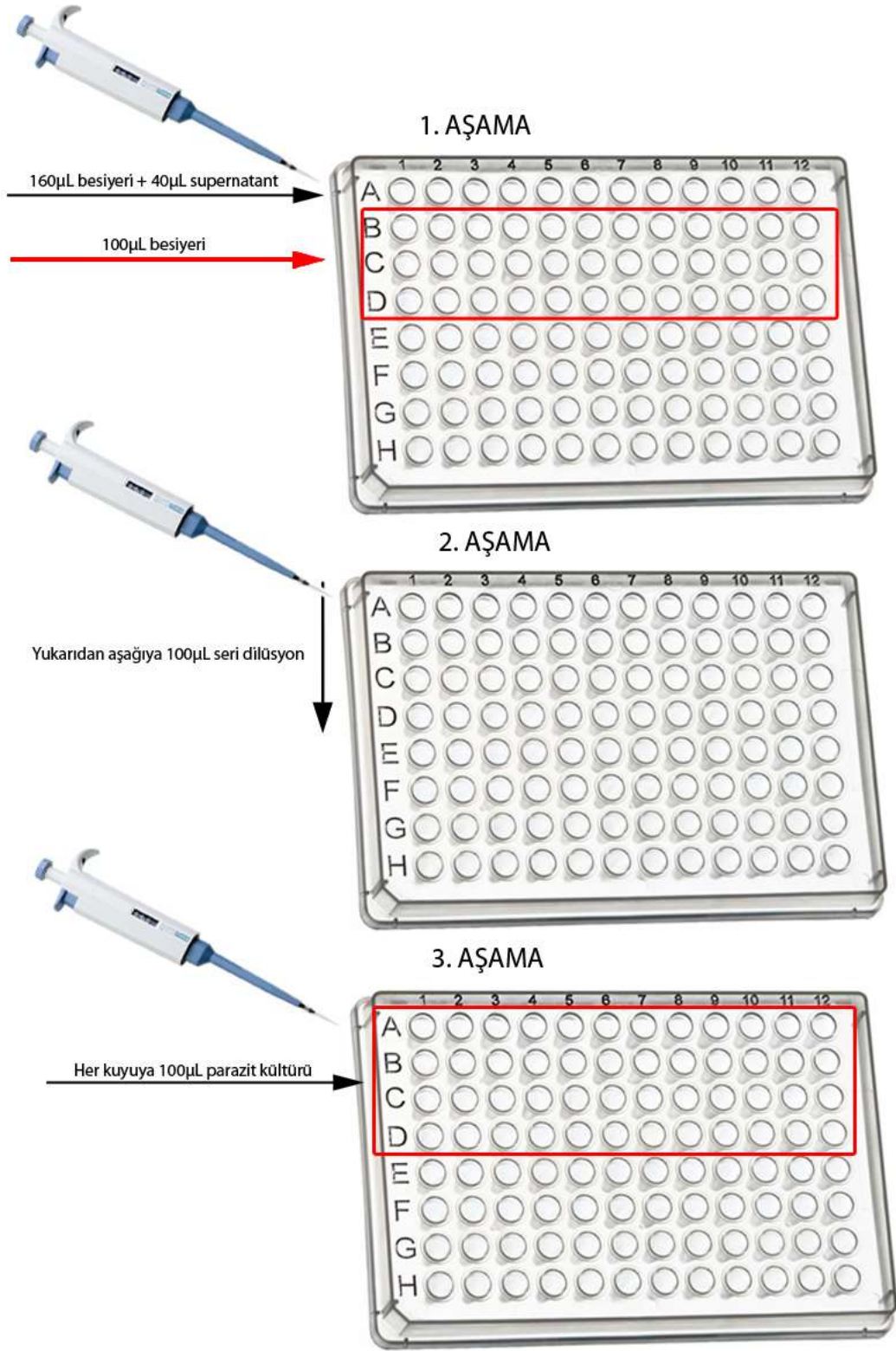
Çalışmada kullanılan *Leishmania tropica* (ATCC 50129) kültürü satın alma yoluyla temin edilmiştir. *Leishmania tropica*’nın promastigot kültürü 27°C’de, %10 Fetal calf serumu (FCS) ve glukantim ile takviye edilmiş RPMI-1640 besiyerinde üretilmiştir. Kültürler inkübasyonun dördüncü gününde pasajlanmış ve büyüme durumları invert mikroskopta (Leica DM100 LED) günlük olarak gözlemlenmiştir. Promastigotların ileri logaritmik/durgun fazı deneylerde kullanılmak üzere, RPMI-1640 besiyerinde konsantrasyon 1×10^6 parazit/mL⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır (Mahmoudvand vd., 2016).

3.4. *In vitro* Antiprotozoal Aktivite Deneyleri

Tez çalışması kapsamındaki biyoaktivite denemeleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Deneyler *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak iki negatif, bir pozitif kontrol grubu kullanılmış ve deneyler farklı zamanlarda beş kez tekrar edilmiştir.

3.4.1. *Acanthamoeba castellanii*’ye Karşı Aktivite Deneyleri

Deneyler, 96 kuyucuklu steril hücre plaklarında, seri dilüsyon yöntemi kullanılarak kurulmuştur (Şekil 3.4).



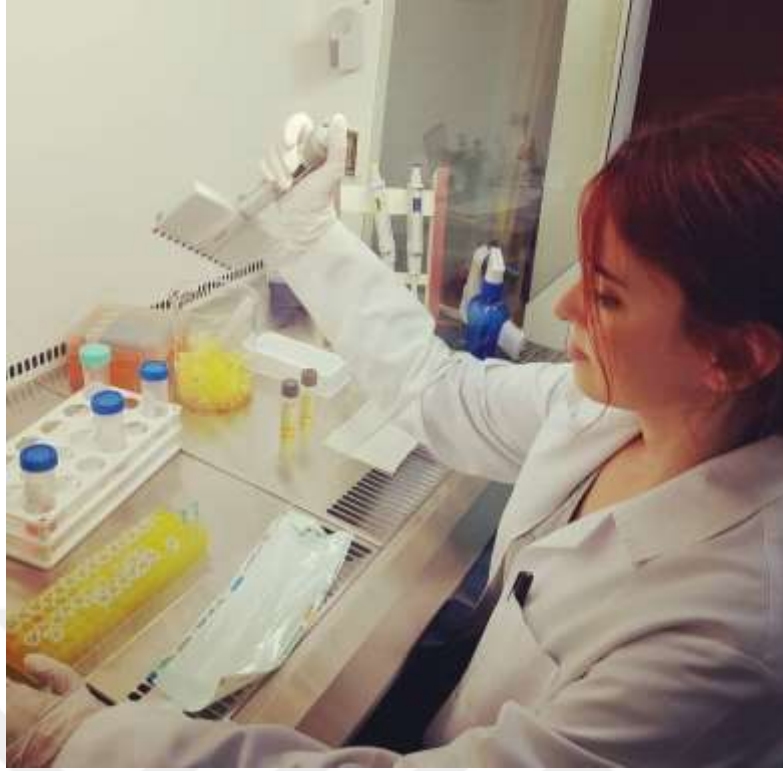
Şekil 3.4. Aktivite deneylerinin kurulumu.

Plağın en üst sırasına (A sırası) 160 µL besiyeri ve 40 µL test edilecek supernatant, aşağıdaki sıralara ise (B, C, D) 100'er µL besiyeri eklenmiştir. Daha sonra A sırasından 100'er

μL çekilerek B sırasına, B sırasından C sırasına ve en son da C sırasından D sırasına ilave edilerek seri dilüsyon işlemi uygulanmıştır. En son işlem olarak her kuyuya 100'er μL 5×10^5 parazit/ mL^{-1} konsantrasyonunda parazit kültürü eklenmiştir. Böylece deneyler bakteri supernatantlarının son konsantrasyonları %10, %5, %2,5 ve %1,25 olacak şekilde kurulmuştur. Negatif kontroller olarak bakterilerin üretildiği besiyeri (TSB) ve parazitin üretildiği PYG besiyeri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise %10 konsantrasyonda Klorheksidin (Sigma, Spain) kullanılmıştır. Her deneme ve konsantrasyon için 3'er kuyucuk kullanılmıştır. Hazırlanan hücre kültür kapları 26°C 'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda, *Acanthamoeba* hücreleri 0,1% oranında Tripan Mavisi (ThermoFisher) ile boyanarak, invert mikroskopta canlı-ölü hücre sayımı yapılmıştır (Baig vd., 2013). Deneyler farklı zamanlarda 5 kez tekrar edilmiştir.

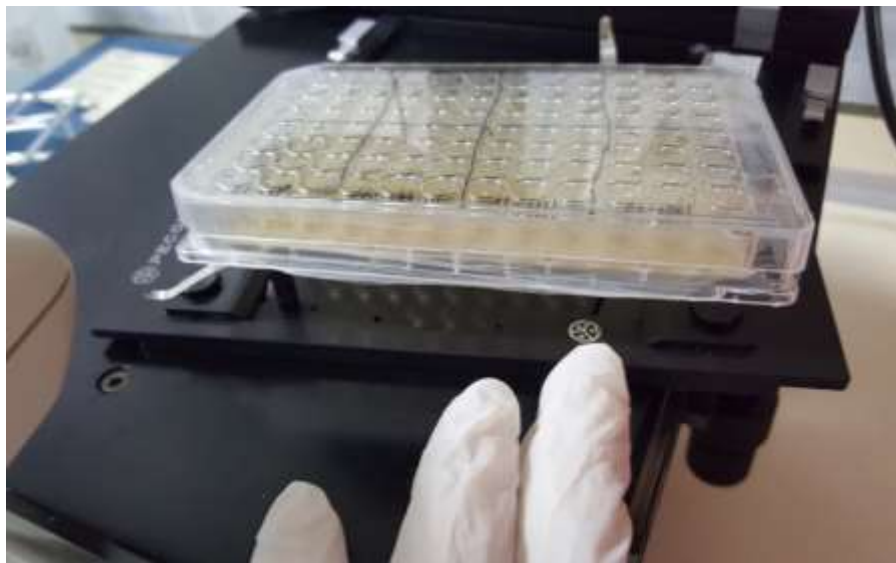
3.4.2. *Leishmania tropica*'ya Karşı Aktivite Deneyleeri

Leishmani tropica promastigotlarının yoğunluğu 1×10^6 hücre/ mL^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır. Yukarıda *A. castellanii* için anlatılan deney düzeneği *L. tropica* için de uygulanmıştır. Negatif kontroller olarak bakterilerin üretildiği besiyeri (TSB) ve parazitin üretildiği RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise N-metil meglumine (Glucantime™, Rhone Poulenc, France) kullanılmıştır. Her deneme ve dilüsyon için 3'er kuyucuk kullanılmıştır ve deneyler farklı zamanlarda 5 kez tekrar edilmiştir (Resim 3.3).



Resim 3.3. Biyoaktivite deneylerinin kuruluđu

Hazırlanan plaklar 27°C’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda parazitlerin canlılık durumları, 20 µL Alamar Blue (ThermoFisher) eklenerek invert mikroskopta değerlendirilmiştir (Resim 3.4) (Raz vd., 1997; Allahverdiyev vd., 2011).



Resim 3.4. Deneylerin invert mikroskopta kontrolü.

3.5. İstatistik Analiz

Test edilen bakteri türlerine ait süpernatantların antiprotozoal aktivitesi tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile belirlenmiştir. P değerleri < 0.05 olanlar istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir (SPSS, 2013).



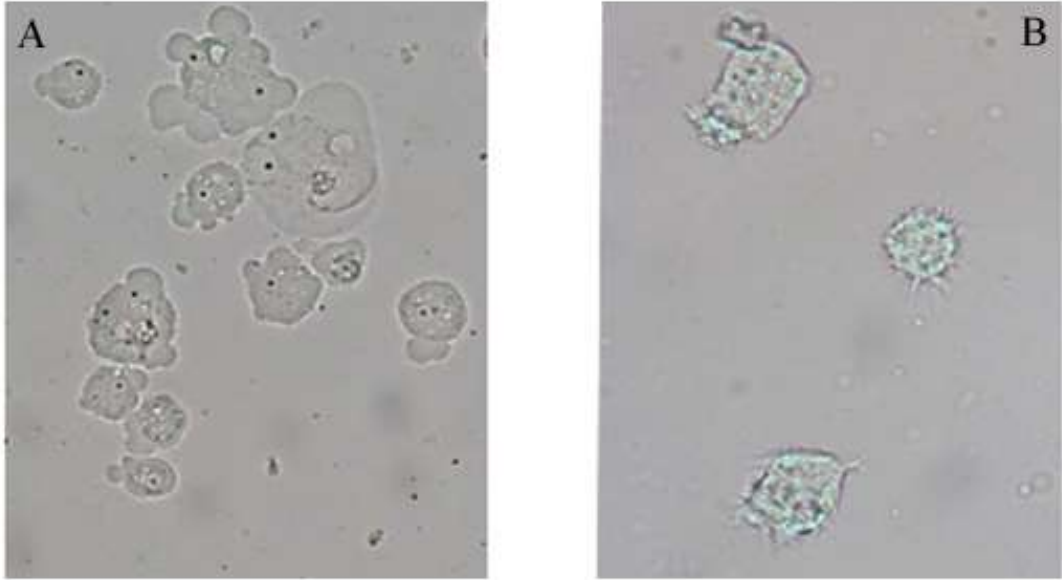
4. BULGULAR

4.1. Yabancıl Tip Bakterilerle Yapılan *In vitro* Antiprotozoal Aktivite Deneylei

4.1.1. *Acanthamoeba castellanii*'ye Karşı Yabancıl Tip Bakterilerle Yürütölen Aktivite Deneylei

Acanthamoeba castellanii trofozoitlerine karşı yürütölen *in vitro* aktivite deneylei sonucunda, *Xenorhabdus* cinsine ait 22 türden 12 tanesinin yüksek antiprotozoal etki gösterdiği, ancak *Photorhabdus* türlerinin herhangi bir aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir.

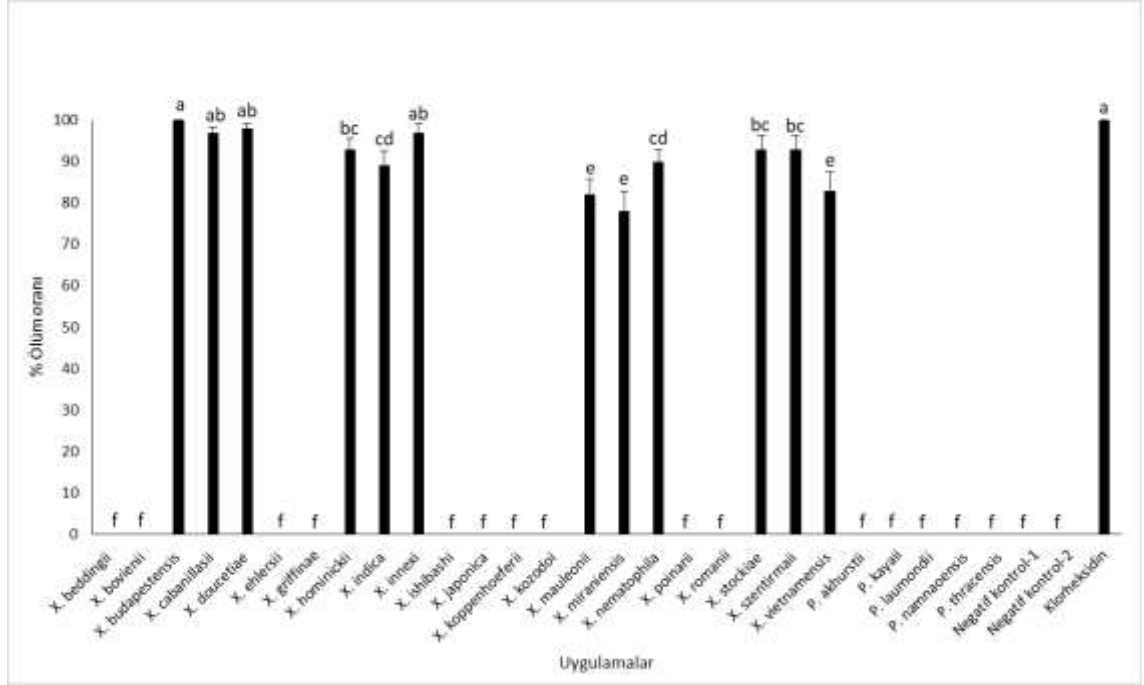
Acanthamoeba castellanii'de %10 supernatant konsantrasyonunda denenen 22 *Xenorhabdus* supernatantından 12 tanesi, negatif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli miktarda trofozoit ölümüne neden olmuştur (F=1828.80; df= 28, 232; P<0.0001) (Resim 4.1).



Resim 4.1. Deney kontrolünde görölen ölü (A) ve canlı (B) *Acanthamoeba castellanii* hücreleri.

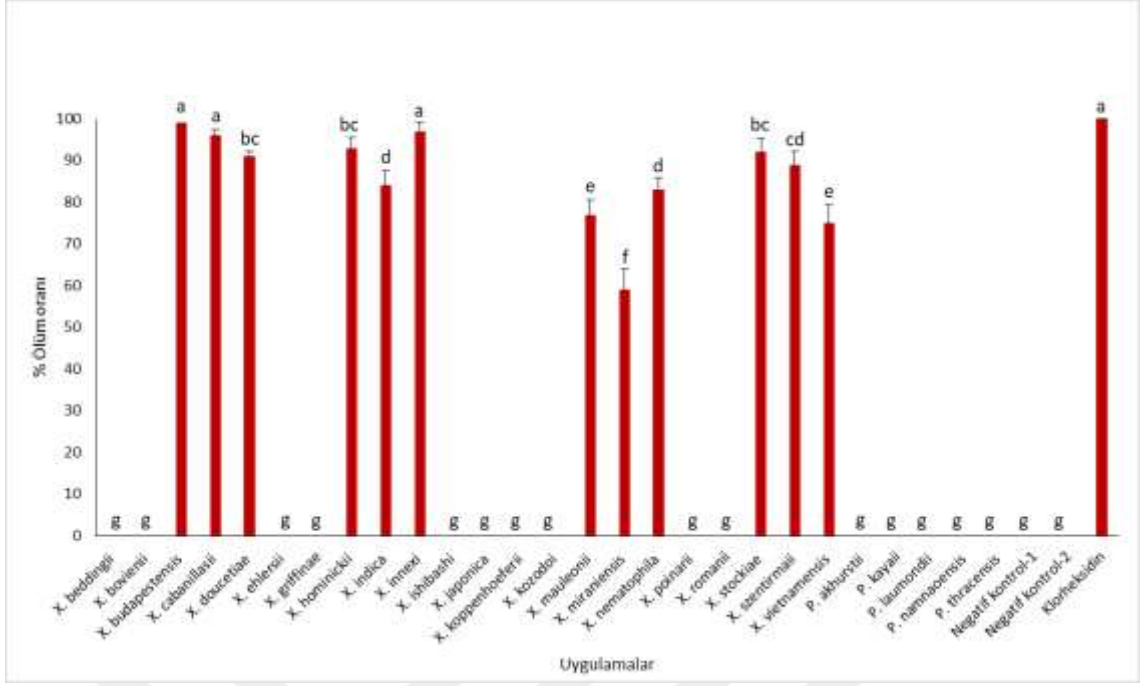
Hücre ölüm oranı, *Xenorhabdus* türüne bağılı olarak, %78 ila %99 arasında değışim göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ve %100 ölüm meydana gelen klorheksidin

uygulamasını ile *X. budapestensis*, *X. cabanillasii*, *X. doucetiae*, *X. innexii* ve *X. szentirmaii* süpernatantları arasında istatistiksel fark olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.1).



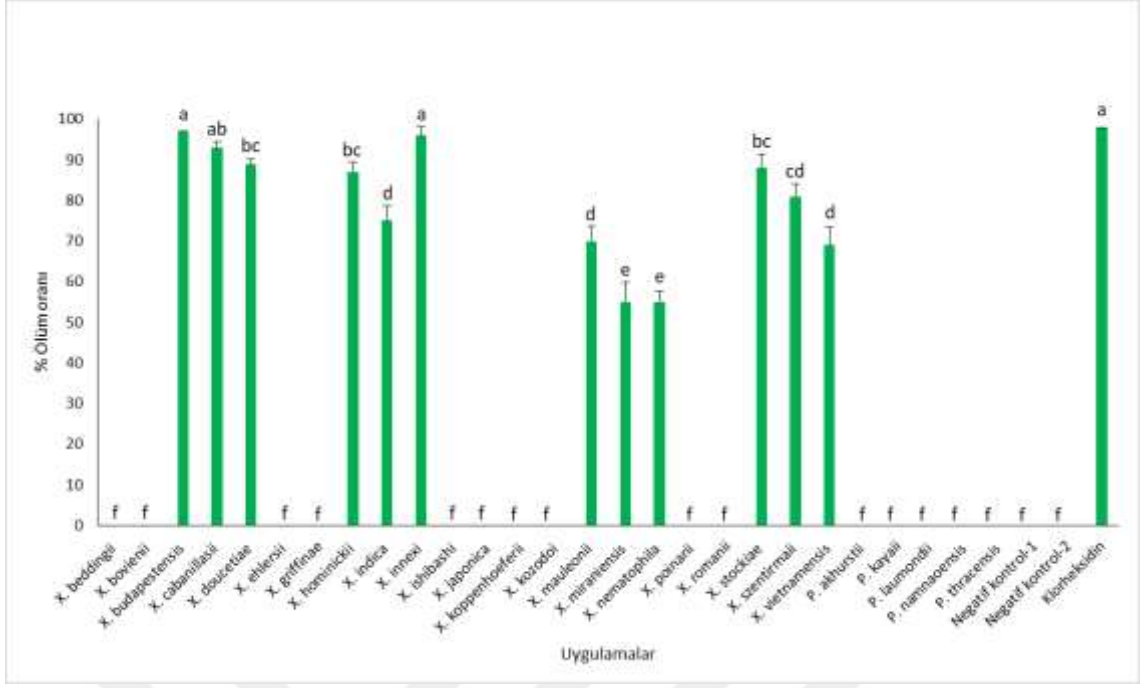
Şekil 4.1. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen hücreleri uzaklaştırılmış süpernatantların %10 konsantrasyonda *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri üzerindeki etkisi.

Süpernatant konsantrasyonu %5'e düştüğünde, en yüksek ölüm oranına (>%95) *X. budapestensis*, *X. cabanillasii*, *X. innexii* ve klorheksidin sebep olmuş ve yapılan analizler sonucunda bu gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Antiprotozoal aktiviteye sahip tüm *Xenorhabdus* türleri, negatif kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ölüm meydana getirmiştir ($F = 1357.38$; $df = 28, 232$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.2).



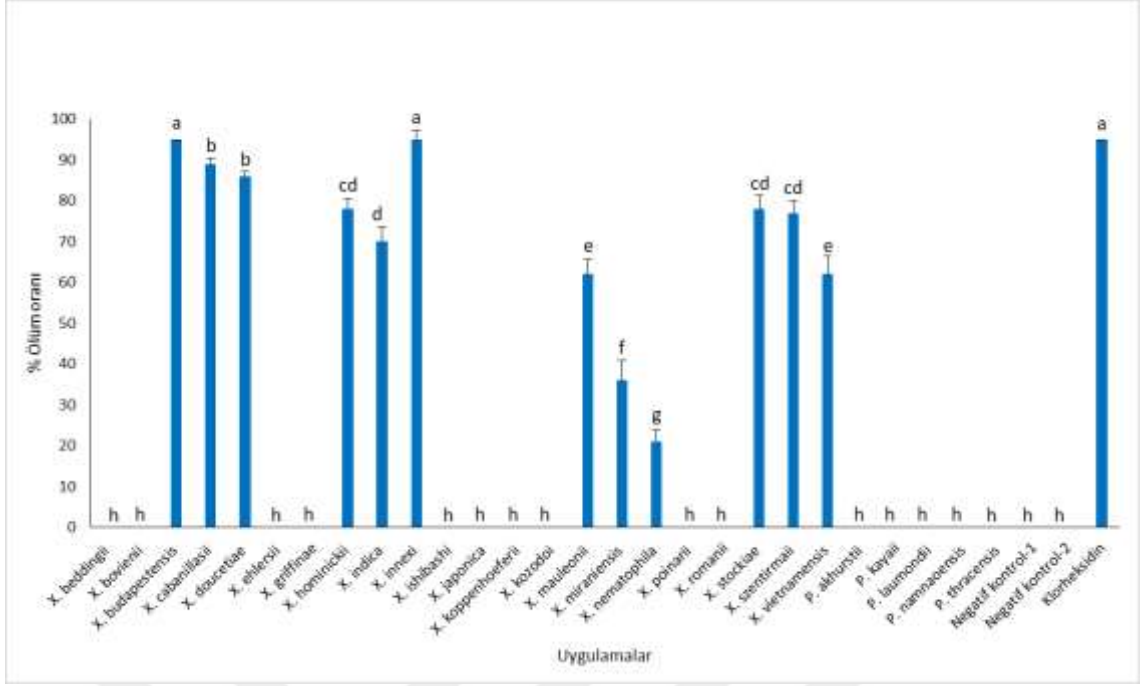
Şekil 4.2. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların %5 konsantrasyonunda *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine etkisi.

Takip eden konsantrasyon olan %2,5’de, *X. budapestensis*, *X. cabanillasii* ve *X. innexii* bakterilerine ait süpernatantlar, *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde %90’ın üzerinde ölüm meydana getirmiş ve yine bu gruptaki bakteri süpernatantları ile pozitif kontrol olarak kullanılan klorheksidin arasında istatistiki açıdan bir farkın olmadığı saptanmıştır. *Xenorhabdus miraniensis* ve *X. nematophila* süpernatantları bu konsantrasyonda, aktif olan bakteriler arasında en düşük trofozoit ölüm oranına (%55) neden olmuşlardır. Ölüm oranları genel olarak konsantrasyonla birlikte düşüş gösterse de, etkili 12 *Xenorhabdus* süpernatantı ile negatif kontrol grupları arasında hala önemli derecede fark olduğu saptanmıştır ($F = 653.63$; $df = 28, 232$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların %2.5 konsantrasyonunda *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine etkisi.

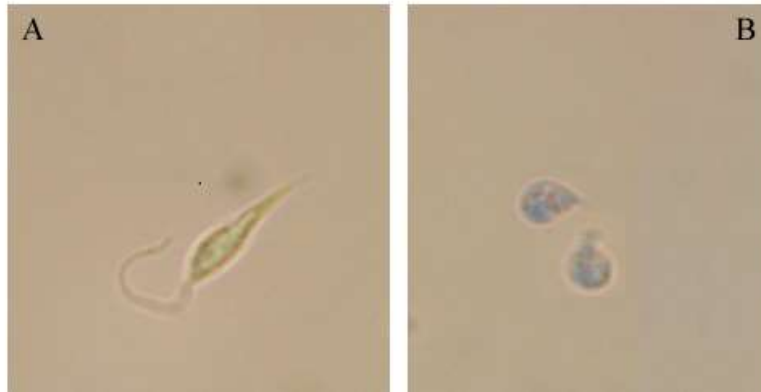
Test edilen en düşük konsantrasyon olan %1,25’de ise, *X. budapestensis* ve *X. innexii* türlerine ait supernatantlar, klorheksidin ile eşit oranda ölüm meydana getirmiştir (Şekil 4.4). Bu grubu takiben *X. cabanillasii*, *X. doucetiae*, *X. hominickii*, *X. stockiae* ve *X. szentirmaii* süpernatantları diğerlerine göre nispeten daha yüksek antiprotozoal aktivite sergilemiştir (F= 550.64; df = 28, 232; P <0.0001).



Şekil 4.4. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların % 1,25 konsantrasyonunda *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine etkisi.

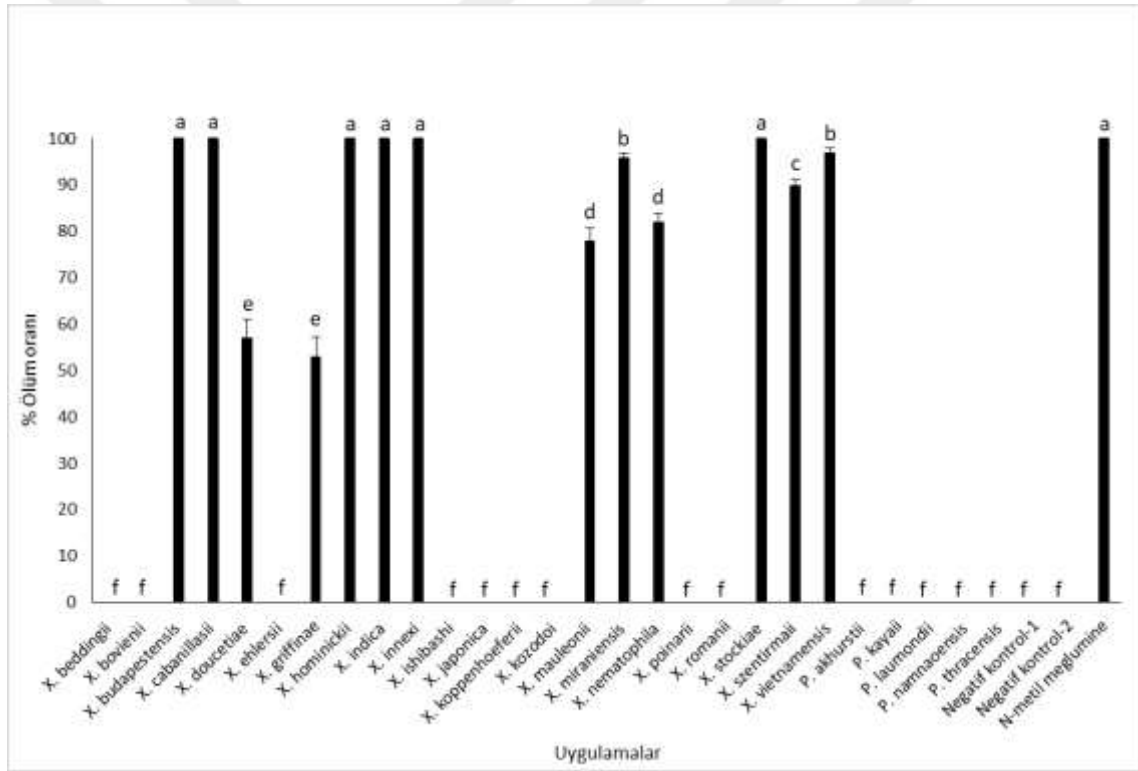
4.1.2. *Leishmania tropica*'ya Karşı Yabancı Tip Bakterilerle Yürütülen Aktivite Deneşleri

Leishmania tropica'ya karşı yürütölen deneşler sonucunda, *Xenorhabdus* cinsine ait 22 türden 13 tanesinin yüksek oranda promastigot ölümeüne sebep olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.2). *Photorhabdus* türlerinde ise herhangi bir etkiye rastlanmamıştır.



Resim 4.2. Deneş kontrolünde görölen canlı (A) ve ölü (B) *Leishmania tropica* hücreleri.

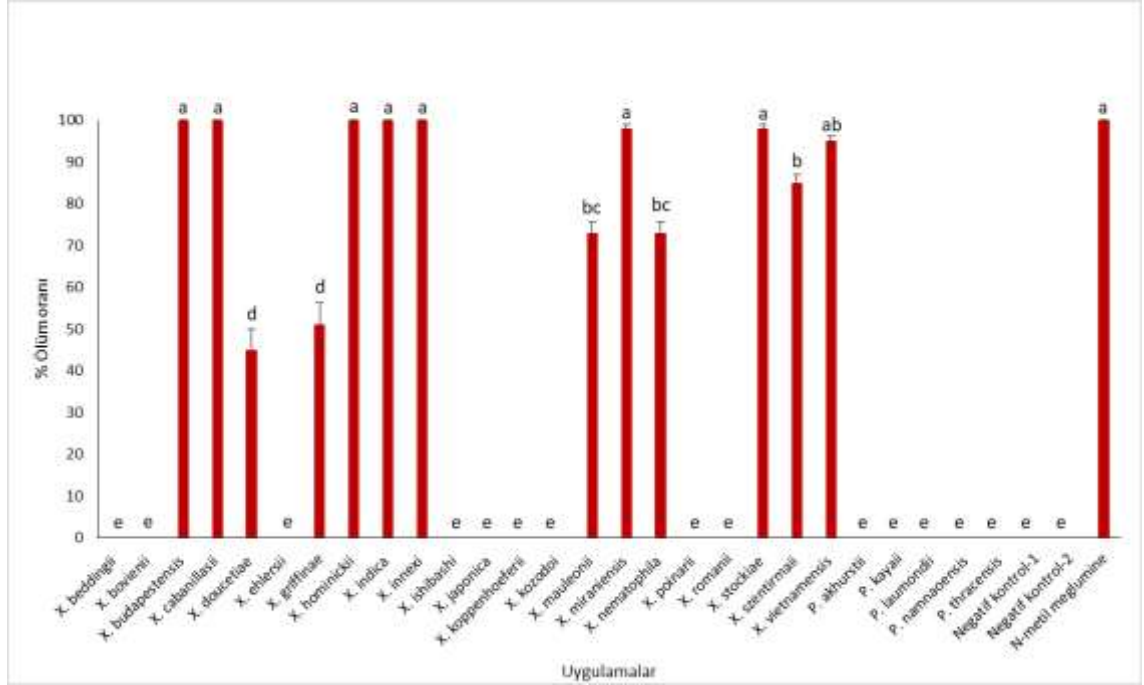
Leishmania tropica'nın promastigot formuna karşı test edilen en yüksek konsantrasyon olan % 10'da, *X. cabanillasii*, *X. budapestensis*, *X. hominickii*, *X. stockiae*, *X. indica* ve *X. innexii* bakteri supernatantlarında %100 ölüm ortaya çıkmıştır. Bu supernatantlar ve pozitif kontrol olan N-metil meglumine arasında etkinlik bakımından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmadığı saptanmıştır. Yine yüksek oranda antiprotozoal aktivite gösteren, *X. miraniensis*, *X. vietnamensis* ve *X. szentirmai* supernatantları ise sırasıyla, % 96, 93 ve 90 oranlarında ölüme sebep olmuştur. Bunları takip eden bakteriyel supernatantlar ise %53 ile %82 arasında mortalite göstermiştir. Tüm bu etkili supernatantlar ile negatif kontrol grupları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (F = 880,33; df = 29, 240; P <0.0001) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların %10 konsantrasyonunda *Leishmania tropica* promastigotlarına etkisi

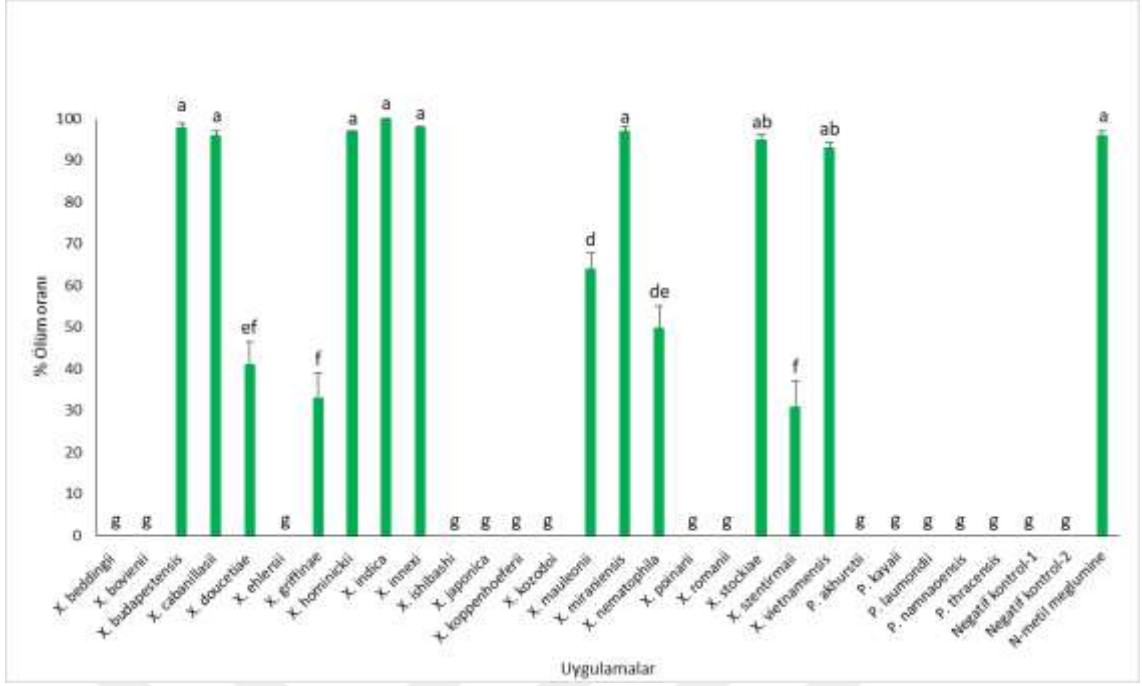
Benzer şekilde, %5 konsantrasyonda *X. cabanillasii*, *X. budapestensis*, *X. hominickii*, *X. stockiae*, *X. innexii*, *X. miraniensis*, *X. vietnamensis*, *X. indica* ve N-metil meglumine, %100 ile %97 arasında promastigot ölümüne sebep olmuştur. Antiprotozoal etki gösteren türler arasında en düşük ölüm oranına (%45) sahip olan *X. doucetiae* supernatantı bile negatif

kontrol gruplarından istatistiksel olarak daha etkili bulunmuştur ($F=232.16$; $df= 29, 240$; $P<0.0001$) (Şekil 4.6).



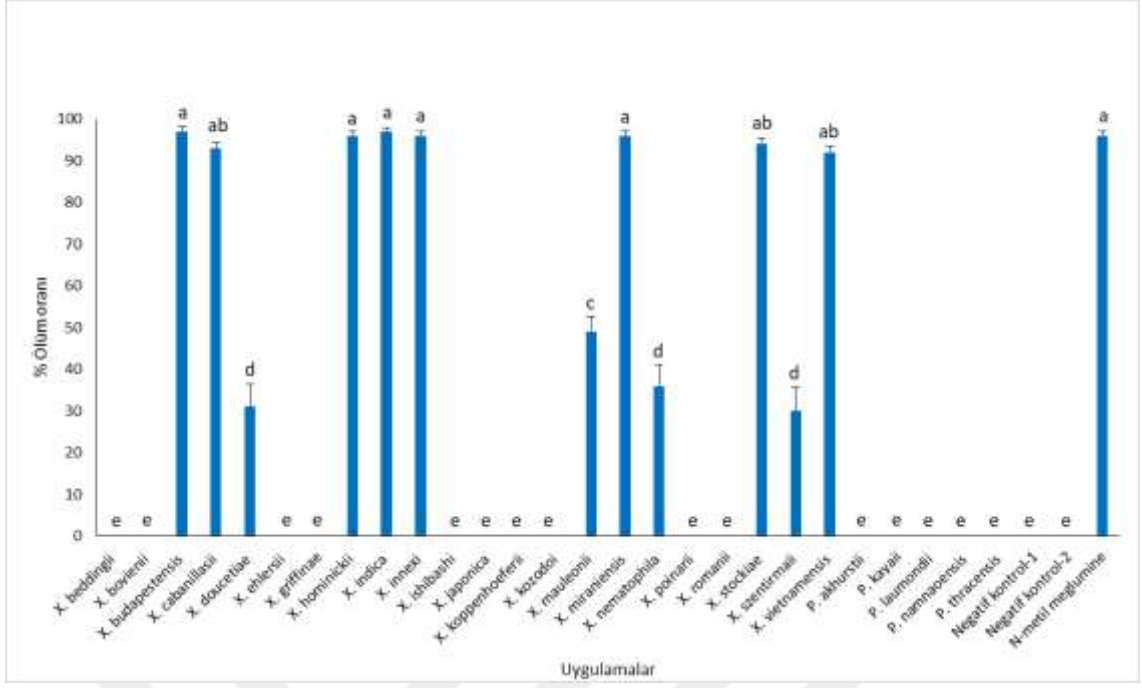
Şekil 4.6. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların %5 konsantrasyonunda *Leishmania tropica* promastigotlarına etkisi.

Supernatant konsantrasyonu %2,5'a düşürüldüğünde en yüksek etkinliği *X. cabanillasii*, *X. budapestensis*, *X. hominickii*, *X. stockiae*, *X. indica*, *X. innexii*, *X. miraniensis* ve *X. vietnamensis* göstermiş ve ölüm oranları %99 ile %97 arasında değişmiştir (Şekil 4.7). En düşük mortaliteye (41-30%) sahip olan türler ise *X. doucetiae*, *X. griffinae* ve *X. szentirmaii* türleri olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol gruplarıyla etkili tüm supernatantlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir ($F=425.10$; $df= 29, 240$; $P<0.0001$).



Şekil 4.7. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların %2,5 konsantrasyonunda *L. tropica* promastigotlarına etkisi.

Xenorhabdus stockiae ve *X. indica* bakteriyel supernatantları, en düşük konsantrasyonda (%1,25) bile pozitif kontrol grubu olan N-metil meglumine kadar etkili sonuç vermiştir. Bunun yanı sıra, diğer aktif türlere göre en düşük etkiyi gösteren (%19) *X. griffinae* türüne ait supernatant ile negatif kontrol grupları arasında dahi fark önemli bulunmuştur (F=393.67; df=29, 240; P<0.0001) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden elde edilen supernatantların % 1,25 konsantrasyonunda *Leishmania tropica* promastigotları etkisi

4.2. Mutant Bakterilerle Yapılan *In vitro* Antiprotozoal Aktivite Deneyleri

Tez çalışması kapsamında yabancı tip bakterilerle yürütülen deneyler sonucunda, en yüksek aktivite gösterdiği belirlenen türlerden promotör bölgesi değiştirilmiş mutant bakteriler elde edilerek antiprotozoal aktiviteden sorumlu sekonder metabolit/ler belirlenmiştir.

4.2.1. *Acanthamoeba castellanii*'ye Karşı Mutant Bakterilerle Yürütülen Aktivite Deneyleri

Yapılan deneyler sonucunda, *X. szentirmai* mutantları arasında fabclavin üretiminden sorumlu Δ hfq_pCEP_KM_fclC suşu L-arabinoz ile indüklendiğinde %10, 5 ve 2,5'lik konsantrasyonlarda tüm *A. castellanii* hücrelerini öldürürken, %1,25 lik konsantrasyonda %92 oranında ölüm meydana getirmiştir. Ancak bakteri üreme ortamına L-arabinoz ilave edilmediğinde yani fabclavin maddesinin üretiminden sorumlu olan gen indüklenmediğinde ise hiç bir antiprotozoal aktivite tespit edilmemiştir. Diğer yandan yabancı tip bakteri

süpernatantı %10, %5, %2,5 ve 1,25'lik konsantrasyonlarda sırasıyla %93, 89, 81 ve 77 oranlarında hücre ölümleri meydana getirmiştir (Çizelge 4.1).

Xenorhabdus szentirmaii dışında sadece fabclavin mutanı oluşturulan *X. cabanillasii*, *X. hominickii*, *X. budapestensis*, *X. indica* ve *X. stockiae* türlerinin tamamında *A. castellanii*'ye karşı yüksek etki görülmüştür. Bu bakterilerin yabancı tiplerine ait süpernatantlarında konsantrasyona bağlı olarak %100 ile %70 arasında antiprotozoal aktivite görülürken, fabclavin geni indüklenmiş bakterilerde bu oran %100 ile %90 arasında değişmiştir. *Xenorhabdus szentirmaii* türünde olduğu gibi bu bakteri türlerinde de L-arabinoz bulunmayan ortamlardaki bakteri süpernatantlarında hiç bir antiprotozoal aktiviteye rastlanmamıştır (Çizelge 4.1).

Yapısında fabclavin üretim geni bulunmayan ancak antiprotozoal aktivite gösteren tür olan *X. nematophila*'da ise aynı etkiyi xenocoumacin maddesi göstermiştir. Xenocoumacin üretiminden sorumlu $\Delta hfq_pCEP_kan_XNC1_1711$ mutanı L-arabinoz ile indüklendiğinde konsantrasyona bağlı olarak %98, 81, 58 ve 34 oranlarında *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde ölüm meydana getirmiştir. Xenocoumacin geni indüklenmediğinde hiç bir aktivite görülmezken, yabancı tipteki antiprotozoal aktivite oranları %90, 83, 55 ve 21 olarak tespit edilmiştir. *Xenorhabdus nematophila* türünde xenocoumacin dışındaki diğer hiçbir maddede antiprotozoal aktivite tespit edilememiştir (Çizelge 4.1).

Bir çok farklı mutant suşu kullanılan *X. doucetiae* türünde ise, antiprotozoal aktiviteden sorumlu birden fazla madde tespit edilmiştir. Bu türe ait oluşturulan mutantlardan xenocoumacin ($\Delta hfq_PBAD_xcnA_km$), xenorhabdin ($\Delta hfq_PBAD_xrdA_km$) ve PAX ($\Delta hfq_PBAD_PAX_km$) sekonder metabolitlerini üreten türlerde indüklenme sonucunda yüksek biyoaktivite görülmüştür. Test edildikleri konsantrasyonlara bağlı olarak Xenocoumacin %87-22, Xenorhabdin %64-44 ve PAX %98-33 oranlarında antiprotozoal aktivite göstermişlerdir. Daha önceki bakterilere benzer şekilde bu genler indüklenmediğinde herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mutant bakterilerle *Acanthamoeba castellanii*'ye karşı yapılan aktivite deney sonuçları.

		antiprotozoal aktivite (%)				
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100
		Düşük		Yüksek		
Bakteri türü	Mutant ismi	Sekonder metabolit	<i>A. castellanii</i>			
			Supernatant konsantrasyonu (%)			
			10	5	2.5	1.25
<i>X. szentirmaii</i>	DSM 16338	Yabani Tip	93	89	81	77
	Δ hfq_pCEP_KM_0346	GameXPepitide				
	Δ hfq_pCEP_KM_0377	Pax-short				
	Δ hfq_pCEP_KM_1979	Szentirazin				
	Δ hfq_pCEP_KM_3397	Rhabdopeptide				
	Δ hfq_pCEP_KM_3460	Szentiamid				
	Δ hfq_pCEP_KM_3680	Xenobactin				
	Δ hfq_pCEP_KM_3942	Rhabduscin				
	Δ hfq_pCEP_KM_5118	Pyrrrolizixenamide				
Δ hfq_pCEP_KM_fcIC	Fabclavine +	100	100	100	92	
	Fabclavine -					
	Δ hfq_pCEP_KM_xfsA	Xenofuranone				
<i>X. nematophila</i>	ATCC 19061	Yabani Tip	90	83	55	21
	Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_2022	Xenotrapeptide				
	Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_1711	Xenocoumacin +	98	81	58	34
		Xenocoumacin -				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_xndA	Xenortide				
	Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_2783	PAX				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_2228	Rhabdopeptide				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_2713	Xenematide				
Δ PPase_P _{BAD} _XNC1_isnA	Rhabduscin					
Δ hfq_ΔisnAB_P _{BAD} _XNC1_2300	Xenortide					
<i>X. doucetiae</i>	DSM 17909	Yabani Tip	98	91	89	86
	Δ PPase_P _{BAD} _isnA	Rhabduscin				
	Δ hfq_P _{BAD} _xcnA_km	Xenocoumacin +	87	82	53	27
		Xenocoumacin -				
	Δ hfq_P _{BAD} _xrdA_km	Xenorhabdin +	64	62	52	44
		Xenorhabdin -				
	Δ hfq_P _{BAD} _xabA_km	Xenoamicin				
	Δ hfq_P _{BAD} _PAX_km	PAX +	98	94	68	33
		PAX -				
Δ hfq_P _{BAD} _gxpS_km	GameXPepitide					
Δ hfq_P _{BAD} _prtA	Protegomycin					
Δ hfq_P _{BAD} _DC_km	Acylamide					
<i>X. cabanillasii</i>	JM26-1	Yabani Tip	97	96	93	89
	Δ hfq_128-129	Fabclavine +	100	100	100	100
	Fabclavine -					
<i>X. hominickii</i>	DSM 179903	Yabani Tip	93	93	87	78
	Δ hfq_130-131	Fabclavine +	100	100	96	91
	Fabclavine -					
<i>X. budapestensis</i>	DSM 16342	Yabani Tip	100	99	97	95
	Δ hfq_pCEP_fcIC	Fabclavine +	100	100	97	92
	Fabclavine -					
<i>X. indica</i>	DSM 17382	Yabani Tip	89	84	75	70
	Δ hfq_pCEP_kan_132-133	Fabclavine +	100	100	99	96
	Fabclavine -					
<i>X. stockiae</i>	DSM 17904	Yabani Tip	93	92	88	78
	Δ hfq_pCEP_fcIC	Fabclavine +	100	100	98	90
	Fabclavine -					

4.2.2. *Leishmania tropica*'ye Karşı Mutant Bakterilerle Yürütülen Aktivite Deneyleri

Mutant bakterilerle yürütülen çalışmalar sonucunda *L. tropica*'ya karşı antiprotozoal aktiviteden sorumlu olan maddeler tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Leishmania tropica deneylerinin sonucunda da, *A. castellanii*'ye benzer şekilde fabclavin üreten tüm mutant suşların (*X. szentirmaii*, *X. cabanillasii*, *X. hominickii*, *X. budapestensis*, *X. indica*, *X. stockiae*) yüksek antiprotozoal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen konsantrasyonlara bağlı olarak *X. szentirmaii* türünde görülen ölüm oranları %96-44, *X. cabanillasii* türünde %100, *X. hominickii* türünde %100-92, *X. budapestensis* türünde %100-98, *X. indica* türünde %100-99 ve *X. stockiae* türünde ise %100-98 olarak tespit edilmiştir. L-arabinoz ile indüklenmeyen mutant sularının hiçbirinde biyoaktivite gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Xenorhabdus nematophila türünün farklı mutantları arasında anti-protozoal aktiviteyi sadece xenocoumacin üretiminden sorumlu Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_1711 mutanı göstermiştir. Yabancıl tip *X. nematophila* süpernatantı %82-36 arasında promastigotlar üzerinde ölüm oranı meydana getirirken, indüklenmiş xenocoumacin mutantına ait süpernatantlarda bu oran %100 ile %62 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2).

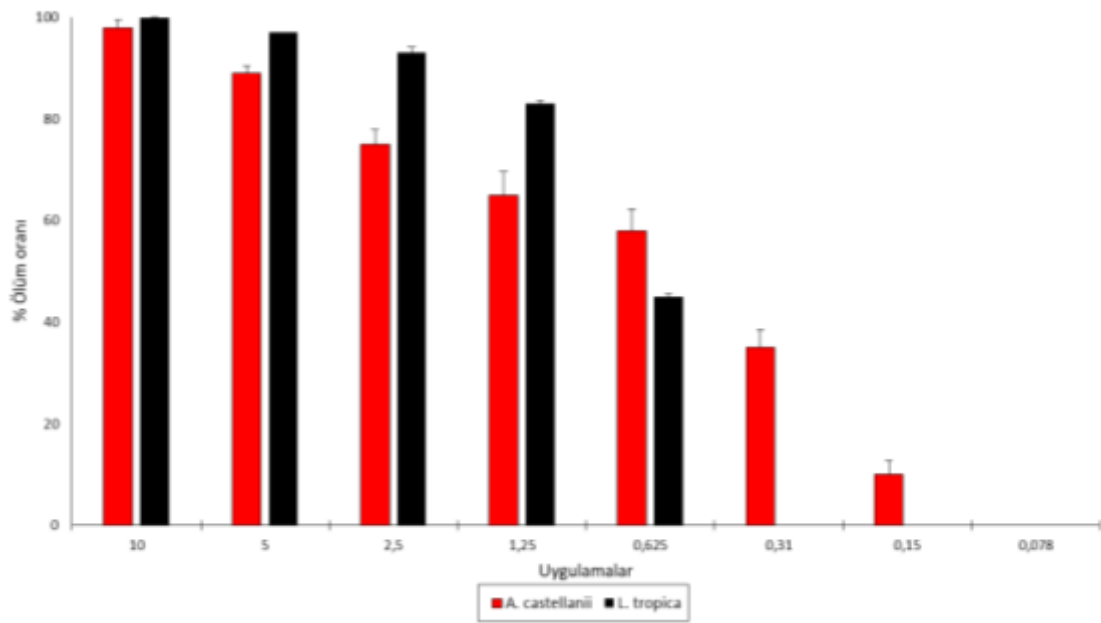
Mutantları test edilen bir başka tür olan *X. doucetiae*'da ise asıl antiprotozoal aktiviteyi xenocoumacin maddesi (%86-54) gösterirken xenorhabdin maddesinde de *L. tropica*'ya karşı yüksek dozlarda düşük de olsa bir antiprotozoal etki tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Mutant bakterilerle *Leishmania tropica*'ya karşı yapılan aktivite deney sonuçları.

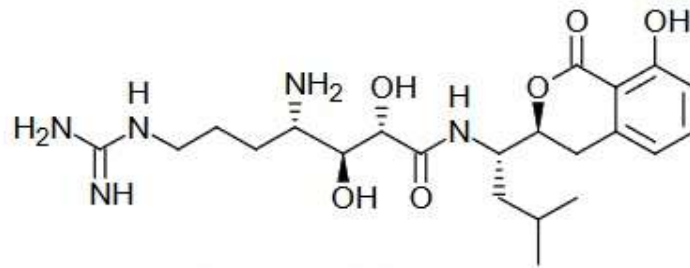
		antiprotozoal aktivite (%)				
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100
		Düşük				Yüksek
Bakteri türü	Mutant ismi	Sekonder metabolit	<i>L. tropica</i>			
			Supernatant konsantrasyonu (%)			
			10	5	2.5	1.25
<i>X. szentirmajii</i>	DSM 16338	Yabani Tip	90	85	81	80
	Δ hfq_pCEP_KM_0346	GameXPepitide				
	Δ hfq_pCEP_KM_0377	Pax-short				
	Δ hfq_pCEP_KM_1979	Szentirazin				
	Δ hfq_pCEP_KM_3397	Rhabdopeptide				
	Δ hfq_pCEP_KM_3460	Szentiamid				
	Δ hfq_pCEP_KM_3680	Xenobactin				
	Δ hfq_pCEP_KM_3942	Rhadduscin				
	Δ hfq_pCEP_KM_5118	Pyrrrolizoxenamide				
Δ hfq_pCEP_KM_fcIC	Fabclavine +	96	86	58	44	
	Fabclavine -					
	Δ hfq_pCEP_KM_xfsA	Xenofuranone				
<i>X. nematophila</i>	ATCC 19061	Yabani Tip	82	73	50	38
	Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_2022	Xenotrapeptide				
	Δhfq_pCEP_kan_XNC1_1711	Xenocoumacin +	100	94	78	62
		Xenocoumacin -				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_xndA	Xenortide				
	Δ hfq_pCEP_kan_XNC1_2783	PAX				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_2228	Rhabdopeptide				
	Δ hfq_P _{BAD} _XNC1_2713	Xenematide				
Δ PPTase_P _{BAD} _XNC1_isnA	Rhadduscin					
Δ hfq_ΔisnAB_P _{BAD} _XNC1_2300	Xenortide					
<i>X. doucetiae</i>	DSM 17909	Yabani Tip	57	45	41	31
	Δ PPTase_P _{BAD} _isnA	Rhadduscin				
	Δhfq_P_{BAD}_xcnA_km	Xenocoumacin +	86	82	68	54
		Xenocoumacin -				
	Δhfq_P_{BAD}_xrdA_km	Xenorhabdin +	55	52		
		Xenorhabdin -				
	Δ hfq_P _{BAD} _xabA_km	Xenoamicin				
	Δhfq_P_{BAD}_PAX_km	PAX +				
		PAX -				
	Δ hfq_P _{BAD} _gxpS_km	GameXPepitide				
	Δ hfq_P _{BAD} _prtA	Proteogomycin				
	Δ hfq_P _{BAD} _DC_km	Acylemide				
<i>X. cabanillasii</i>	JM26-1	Yabani Tip	100	100	96	93
	Δhfq_128-129	Fabclavine +	100	100	100	100
		Fabclavine -				
<i>X. hominickii</i>	DSM 179903	Yabani Tip	100	100	97	96
	Δhfq_130-131	Fabclavine +	100	100	100	92
		Fabclavine -				
<i>X. budapestensis</i>	DSM 16342	Yabani Tip	100	100	98	97
	Δhfq_pCEP_fcIC	Fabclavine +	100	100	100	98
		Fabclavine -				
<i>X. indica</i>	DSM 17382	Yabani Tip	100	100	100	97
	Δhfq_pCEP_kan_132-133	Fabclavine +	100	100	100	99
		Fabclavine -				
<i>X. stockiae</i>	DSM 17904	Yabani Tip	100	98	95	94
	Δhfq_pCEP_fcIC	Fabclavine +	100	100	100	98
		Fabclavine -				

4.3. Biyoaktif Ekstraktların Anti-protozoal Aktivitesi

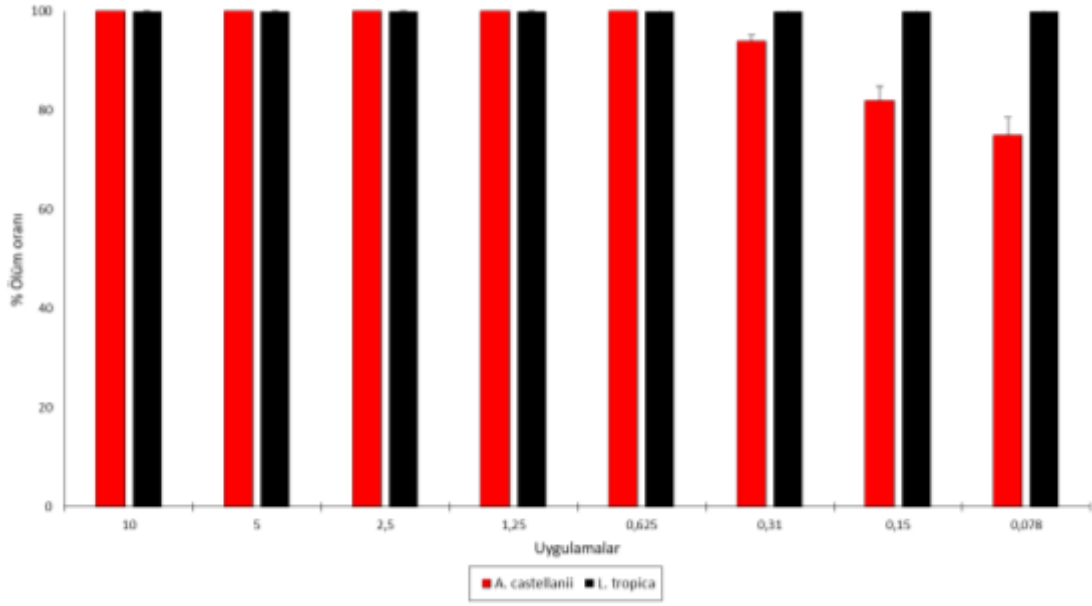
Promotor bölgesi değiştirilmiş Hfq mutantlarından elde edilmiş supernatantlardan XAD reçinesi kullanılarak saflaştırılan, xenocoumacin (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10), fabclavine (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) ve PAX (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14) ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda, özellikle fabclavin maddesinin çok düşük konsantrasyonlarda bile yüksek antiprotozoal etki gösterdiği belirlenmiştir.



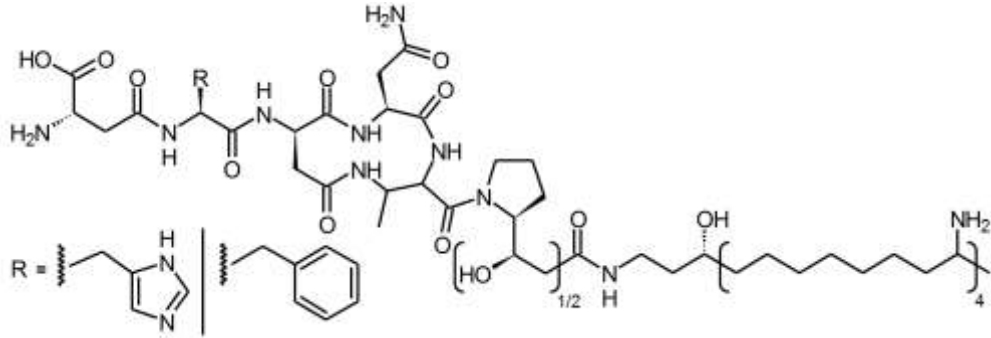
Şekil 4.9. Supernatantlardan ekstrakte edilen xenocoumacin saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi.



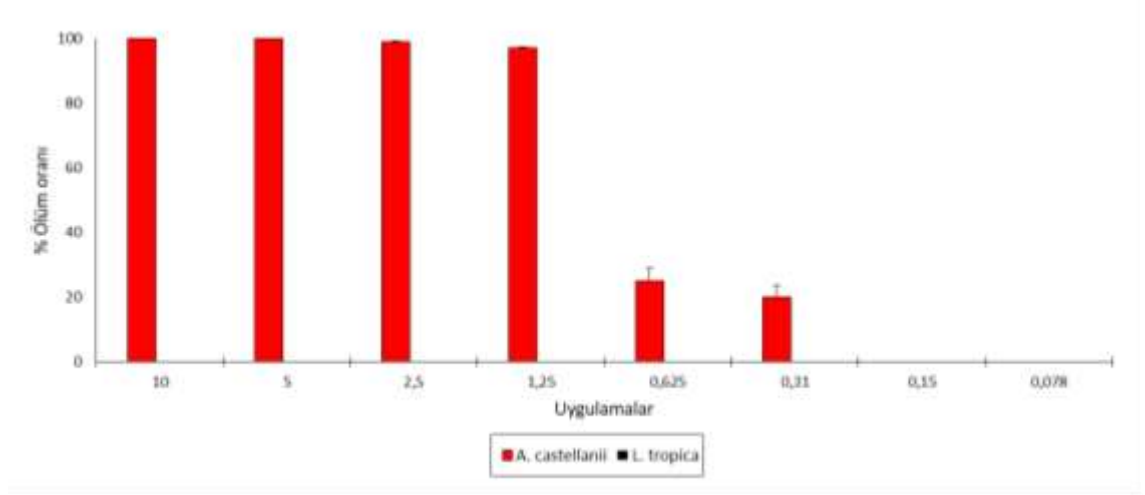
Şekil 4.10. Xenocoumacin molekülünün kimyasal yapısı.



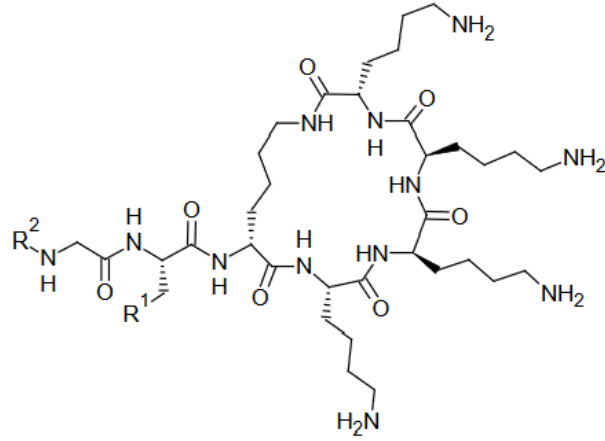
Şekil 4.11. Supernatantlardan ekstrakte edilen fabclavin saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi.



Şekil 4.12. Fabclavin molekülünün kimyasal yapısı.



Şekil 4.13. Supernatantlardan ekstrakte edilen PAX saf maddesinin anti-protozoal aktivitesi.



Şekil 4.14. PAX molekülünün kimyasal yapısı.

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler, bazı *Xenorhabdus* türü bakterilerin, insan patojeni *A. castellanii* ve *L. tropica* üzerinde öldürücü etkisi olan sekonder metabolitler ürettiklerini ortaya koymuştur. Ancak, *Photorhabdus* cinsine ait türler ile yapılan deneylerde benzer bulgulara rastlanmamıştır. Bu durum *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsleri tarafından üretilen sekonder metabolitler açısından farklılıklar olduğunu göstermektedir. Hatta elde edilen veriler ışığında, *Xenorhabdus* cinsine ait türler arasında dahi sekonder metabolit üretimi açısından farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda da *Xenorhabdus* cinsine ait bakterilerin enfekte ettikleri böcek kadavrasını diğer organizmalardan korumak amacıyla birçok sekonder metabolit ürettiğini ortaya konmuştur. Bu metabolitlerin antibakteriyel (Akhurst, 1980; Webster vd., 2002; Furgani vd., 2008; Reinheimer vd., 2018), antifungal (Chen vd., 1994; Webster vd., 2002; Fang vd., 2014; Shapiro-Ilan vd., 2014; Hazir vd., 2016; Cimen vd., 2021), insektisidal (Sergeant vd., 2006; Hinchliffe vd., 2010; Vitta vd., 2018; Shah vd., 2021), nematisidal (Grewal vd., 1999; Hu vd., 1999; Samaliev vd., 2000; Fallon vd., 2004; Abebew vd., 2022), akarisidal (Bussaman vd., 2006, 2009, 2012; Eroglu vd., 2019; Nermut vd., 2019; Cevizci vd., 2020; İncedayi vd., 2021) ve antiprotozoal (Grundmann vd., 2014; Zhao vd., 2018, 2020) etkileri olduğu bilinmektedir.

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarla yapılan deneyler sonucunda, *X. budapestensis*, *X. cabanillasii*, *X. hominickii*, *X. stockiae* ve *X. szentirmaii* türlerinde antiprotozoal aktiviteden sorumlu maddenin fabclavinler olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal olarak fabclavinler, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) üreten enzimlerle benzerlik gösteren bir yağ asidi/poliketid sentetaz yoluyla sentezlenen poliamin parçasına bağlanan peptid/poliketid hibritleridir (Fuchs vd., 2014; Wenski vd., 2019, 2020). Yapısal farklılıklara sahip fabclavin türevlerinin, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma brucei* ve *Trypanosoma cruzi* gibi farklı organizmalara karşı geniş spektrumlu bir biyoaktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Fuchs vd. 2014). Yapılan son çalışmalar, fabclavinlerin bakteri, fungus, protozoa ve diğer ökaryotik hücrelere karşı son derece toksik olduğunu göstermiştir. Bu

özellikleriyle böcek kadavrasının korunmasına ve *Xenorhabdus* monokültürünün kurulmasında etkilerinin büyük olduğu düşünülmektedir. Fabclavinlerin, *Xenorhabdus* türleri ve nematod konakları arasındaki simbiyozun başarısını da olumlu etkilediği düşünülmektedir (Wenski vd., 2019).

Fabclavinlerin etki mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte, *Serratia plymuthica* türü tarafından üretilen ve geniş spektrumlu biyoaktivite gösteren zeaminlere yapısal olarak çok benzemektedirler. Zeaminlerin yapay bakteriyel ve ökaryotik model membranları geçirgen hale getirebildiği gösterilmiştir (Masschelein vd., 2015). *Xenorhabdus innexi* tarafından üretilen ve yapısı henüz tam olarak bilinmeyen bir fabclavin türevinin ise, bazı sivrisinek hücre hatlarında, düşük konsantrasyonda bile membran degradasyonunu indüklediği ve apoptozise yol açtığı tespit edilmiştir (Kim vd., 2017).

Fabclavine üretimi *Xenorhabdus* cinsine ait türlerde yaygınken, *Photorhabdus asymbiotica* dışındaki diğer *Photorhabdus* türlerinde görülmemektedir (Tobias vd., 2017). Bu durumun, test edilen *Photorhabdus* suşlarından hiçbirinin *A. castellanii* ve *L. tropica*'ya karşı antiprotozoal aktivite göstermemesinin nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, fabclavin ürettiği bilinen *X. bovienii*'de de herhangi bir biyoaktivite görülmemiştir. Bu durum, *X. bovienii*'de biyosentetik gen kümesinin, yalnızca poliamin grubun biyosentezinden sorumlu genleri kodlamasından kaynaklanmaktadır Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda 32 çeşit fabclavin türü tanımlanmıştır. Bazı türler, tam uzunluktaki fabclavin yapılarına sahipken, *X. bovienii* örneğinde olduğu gibi, bazı türlerde NRPS ve PKS genleri bulunmamaktadır. Bu durum fabclavinin yapısını ve dolayısıyla da biyoaktivitesini etkilemektedir (Wenski vd., 2020).

Yüksek antiprotozoal aktivite gösteren türlerden, *X. nematophila* ve *X. doucetiae* fabclavin üretmemektedir (Tobias vd., 2017). Promotor bölgesi değiştirilmiş mutantlarla yapılan denemelerden elde edilen sonuçlara göre, bu iki türün sebep olduğu antiprotozoal aktiviteden farklı sekonder metabolitlerin sorumlu olduğu görülmektedir. Bunlardan biri olan xenocoumacinler, amino asit zincirinde benzopiran içerirler ve kolineer olmayan hibrid PKS ve NRPS multienzim (xcnA-N) yoluyla sentezlenen altı transkripsiyonel alt birimden oluşmaktadırlar (Reimer vd., 2009). Xenocoumacine 1 (Xcn1) ve Xenocoumacine 2 (Xcn2), peptid yapıdadırlar, suda çözünürler ve *X. nematophila* tarafından üretilen en önemli antibiyotiklerdir (McInerney vd., 1991). Bu iki xenocoumacine türünün (Xcn1 ve Xcn2) de, enfekte böcek kadavrasının hemosolünde üretildiği bilinmektedir (Maxwell vd., 1994). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar Xcn1'in Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, ayrıca

çeşitli fungus türlerine karşı aktif olduğunu, Xcn2'nin ise bakterilere karşı daha az etkili ve denenen fungus türlerine karşı ise etkisiz olduğunu göstermektedir (McInerney vd., 1991). Nematod-bakteri ilişkisinde, Xcn1'in böceğin bağırsağında yaşayan veya kadavrayı besin kaynağı olarak kullanan mikroorganizmaların öldürülmesinde ve nematodun gelişiminde etkisi olduğu düşünülmektedir. Xcn1 aynı zamanda bu sekonder metabolit üreten bakteri suşu için de toksik olduğundan, XcnMN tarafından detoksifikasyona uğramakta ve bir pirrolidin halka oluşumu meydana getirmektedir. Bu yolla Xcn1 daha az aktif olan Xcn2'ye dönüştürülmekte ve self-toksisite önlenmektedir (Reimer, 2013). Zhou vd. (2014), xenocoumacin'in böcek bağırsağında yaygın olarak görülen *B. subtilis*'in mRNA transkripsiyonuna etkisini incelemiş ve aminoasit, yağ asidi, antibiyotik üretimi gibi aktivitelerden sorumlu genlerin daha az ifade edilmesine sebep olduğunu bulmuşlardır. Xenocoumacinlerin biyoaktiviteleri, uyku hastalığı, Chagas hastalığı, Leishmaniasis ve sıtma gibi parazit kaynaklı hastalıkların etkenleri olan *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *L. donovani* ve *P. falciparum* türlerine karşı da test edilmiştir. *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *P. falciparum*'a karşı yüksek seviyede aktivite gözlemlenmiştir (Zhao vd., 2018).

Elde ettiğimiz verilere göre, *X. doucetiae* tarafından üretilen xenorhabdin ve PAX peptid maddeleri, uygulanan protozoan parazitlere karşı etki gösteren diğer sekonder metabolitlerdir. Xenorhabdinler, ditiolopirrolon bileşiklerinin özelliği olan tipik bir heterobisiklik pirolinonoditiyol çekirdeğine sahiptir (Challinor ve Bode, 2015). Antibakteriyel, antifungal ve insektisidal etkileri olduğu bilinmektedir (McInerney vd., 1991; Li vd., 1995). Xenocoumacinler gibi, xenorhabdinlerin de etki mekanizmalarının RNA sentezinin inhibisyonu olduğu düşünülmektedir (Joshi vd., 1982; Oliva vd., 2001).

PAX peptitler, lizin açısından zengin siklo-lipopeptitlerdir. Gualtieri vd. (2009) ilk olarak *X. nematophila*'dan 5 farklı PAX peptid tanımlamışlardır. Ardından, Fuchs vd. (2011) 8 adet daha PAX peptidi tanımlamış ve yapılarını açıklığa kavuşturmuştur. PAX peptitlerin biyosentezinden 3 NRPS geni (paxABC) sorumlu olup antifungal ve antibakteriyel aktiviteye sahiptirler (Dreyer vd., 2018). Çalışmalar, fırsatçı insan patojeni *Fusarium oxysporum*'a ve bazı bitki patojeni funguslara karşı güçlü antifungal aktivite sergilediklerini göstermiştir (Gualtieri vd., 2009).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin *A. castellanii* ve *L. tropica*'ya karşı aktiviteleri kapsamlı olarak incelenmiştir. Kullanılan parazitler, yabancıl tip ve mutant bakteri çeşitliliği açısından çalışmanın daha önceden yapılmış bir benzeri yoktur.

Yapılan denemeler sonucunda, yüksek aktivite gösterdiği belirlenen biyoaktif bileşikler, fabclavin, xenocoumacin, xenorhabdin ve PAX önemli parazitik hastalıkların tedavisi için yeni fırsatlar sunabilir ve yeni antiprotozoal ajanların geliştirilmesinde öncü bileşikler olarak değerlendirilebilirler.

KAYNAKLAR

- Abd, H., Saeed, A., Jalal, S., Bekassy, A., Sandström, G. (2009). Ante mortem diagnosis of amoebic encephalitis in a haematopoietic stem cell transplanted patient. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 41, 619-22.
- Abebew, D., Sayedain, F.S., Bode, E., Bode, H.B. (2022). Uncovering nematicidal natural products from *Xenorhabdus* bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(2), 498–506.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., Gupta R.S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599.
- Ahantari, A., Chantawat, N., Waterfield, N.R., French-Constant, R., Kittayapong, P. (2009). PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 4627–4629.
- Ahn, J.Y., Lee, J.Y., Yang, E.J., Lee, Y.J., Koo, K.B., Song, K.S., Lee, K.Y. (2013). Mosquitocidal activity of anthraquinones isolated from symbiotic bacteria *Photorhabdus* of entomopathogenic nematode. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16, 317–320.
- Aichelburg, A., Walochnik, J., Assadian, O., Prosch, H., Steuer, A., Perneczky, G., Visvesvara, G., Aspöck, H., Vetter, N. (2008). Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1743-6.
- Akhurst, R.J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *The Journal of General Microbiology*, 121, 303-309.

- Akhurst, R.J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *The Journal of General Microbiology*, 128(12), 3061-3065.
- Akopyants, N. S., Dobson, D. E., Beverley, S. M., Kimblin, N. L., Secundino, N., Patrick, R., Sacks, D. (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 324(5924), 265-268.
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology*, 88(3), 621-3.
- Alizadeh, H., Neelam, S., Hurt, M., Niederkorn, J. (2005). Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infection and Immunity*, 73, 1061-8.
- Allahverdiyev, A.M., Abamor, E.S., Bagirova, M., Ustundag, C.B., Kaya, C., Kaya, F., Rafailovich, M. (2011). Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2705-2714.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5).
- Antonello, A.M., Sartori, T., Silva, M.B., Prophiro, J.S., Pinge-Filho, P., Heermann, R., da Silva, O.S., Romão, P.R.T. (2019). Anti-*Trypanosoma* activity of bioactive metabolites from *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila*. *Experimental Parasitology*, 204, 107724.
- Awwad, S., Heilman, M., Hogan, R., Parmar, D., Petroll, W., McCulley, J., Cavanagh, H. (2007). Severe reactive ischemic posterior segment inflammation in *Acanthamoeba* keratitis: a new potentially blinding syndrome. *Ophthalmology*, 114, 313-20.
- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Ellström, P., Waldenström, J., Olsen, B. (2009). A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species. *Parasitology Research*, 104, 935-937.

- Baig, A.M., Iqbal, J., Khan, N.A. (2013). *In vitro* efficacies of clinically available drugs against growth and viability of an *Acanthamoeba castellanii* keratitis isolate belonging to the T4 genotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3561-3567.
- Bates, P. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: Progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 340-344.
- Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., Burkart, M.D. (2014). The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Natural Product Reports*, 31, 61-108.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
- Bern, C., Hightower, A.W., Chowdhury, R., Ali, M., Amann, J., Wagatsuma, Y., Maguire, J.H. (2005). Risk factors for Kala-Azar in Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 655.
- Bhutta, Z.A., Sommerfeld, J., Lassi, Z.S., Salam, R.A., Das, J.K. (2014). Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. *Infectious Diseases of Poverty*, 3, 21.
- Bloch, K. & Schuster, F. (2005). Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amebic encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3003-6.
- Bobrovskyy, M., Vanderpool, C.K. (2013). Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 47, 209– 232.
- Bock, C.H., Shapiro-Ilan, D.I., Wedge, D., Cantrell, C.H. (2014). Identification of the antifungal compound, transcinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide. *Journal of Pest Science*, 87, 155–162.

- Bode, E., Brachmann, A.O., Kegler, C., Simsek, R., Dauth, C., Zhou, Q., Kaiser, M., Klemmt, P., Bode, H.B. (2015). Simple "on-demand" production of bioactive natural products. *Chembiochem*, 16(7), 1115-9.
- Bode, E., Heinrich, A.K., Hirschmann, M., Abebew, D., Shi, Y.N., Vo, T.D., Wesche, F., Shi, Y.M., Grün, P., Simonyi, S., Keller, N., Engel, Y., Wenski, S., Bennet, R., Beyer, S., Bischoff, I., Buaya, A., Brandt, S., Cakmak, I., Çimen, H., Eckstein, S., Frank, D., Fürst, R., Gand, M., Geisslinger, G., Hazir, S., Henke, M., Heermann, R., Lecaudey, V., Schäfer, W., Schiffmann, S., Schüffler, A., Schwenk, R., Skaljac, M., Thines, E., Thines, M., Ulshöfer, T., Vilcinskas, A., Wichelhaus, T.A., Bode, H.B. (2019). Promoter activation in *Δhfq* mutants as an efficient tool for specialized metabolite production enabling direct bioactivity testing. *Angewandte Chemie International Edition*, 58, 18957.
- Boemare, N., Akhurst, R. (2006). The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (pp. 451–494). New York, USA: Springer.
- Boemare, N.E. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In R. Gaugler (Ed), *Entomopathogenic Nematology* (pp 35–56). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., ffrench-Constant, R.H. (1998). Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280, 2129–2132.
- Brachmann, A.O., Forst, S., Furgani, G.M., Fodor, A. Bode, H.B. (2006). Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. *Journal of Natural Products*, 69, 1830-1832.
- Brachmann, A.O., Kirchner, F., Kegler, C., Kinski, S.C., Schmitt, I., Bode, H.B. (2012). Triggering the production of the cryptic blue pigment indigoidine from *Photorhabdus luminescens*. *Journal of Biotechnology*, 157, 96-99.
- Brachmann, A.O., Schwär, G., Bode, H.B. (2008). *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: potent secondary metabolite producers. *IOBC wprs Bulletin*, 31, 151-156.

- Brian, P.W. ve Hemming, H.G. (1947). Production of antifungal and antibacterial substances by fungi; preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti. *Microbiology*, 1(2), 158-167.
- Bussaman, P., Sa-Uth, C., Rattanasena, P., Chandrapatya, A. (2012). Acaricidal activities of whole cell suspension, cell-free supernatant, and crude cell extract of *Xenorhabdus stokiae* against mushroom mite (*Luciaphorus* sp.). *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(4), 261-266.
- Bussaman, P., Sermswan, R.W., Grewal, P.S. (2006). Toxicity of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* to the mushroom mite (*Luciaphorus* sp.; Acari: Pygmephoridae). *Biocontrol Science and Technology*, 16(3), 245-256.
- Bussaman, P., Sobanboa, S., Grewal, P.S., Chandrapatya, A. (2009). Pathogenicity of additional strains of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) to the mushroom mite *Luciaphorus perniciosus* (Acari: Pygmephoridae). *Applied Entomology and Zoology*, 44(2), 293-299.
- Cai, D., Zhu, C., Chen, S. (2017). Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 84.
- Camposampiero, D., Caramello, G., Indemini, P., Gerten, G., Franch, A., Birattari, F., Donisi, P., Paolin, A., Ferrari, S., Ponzin, D. (2009). Two red eyes and one asymptomatic donor. *Lancet*, 374, 1792.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 6, 319-325.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H. (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 87(3), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>
- Cevizci, D., Ulug, D., Cimen, H., Touray, M., Hazir, S., Cakmak, I. (2020). Mode of entry of secondary metabolites of the bacteria *Xenorhabdus szentirmaii* and *X. nematophila* into *Tetranychus urticae*, and their toxicity to the predatory mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 174, 107418.
- Chao, Y., Vogel, J. (2010). The role of Hfq in bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 24-33.

- Chaston, J.M., Suen, G., Tucker, S.L., Andersen, A.W., Bhasin, A., Bode, E., Bode, H.B., Brachmann, A.O., Cowles, C.E., Cowles, K.N., Darby, C., de León, L., Drace, K., Du, Z., Givaudan, A., Herbert-Tran, E.E., Jewell, K.A., Knack, J.J., Krasomil-Osterfeld, K.C., Kukor, R., Lanois, A., Latreille, P., Leimgruber, N.K., Lipke, C.M., Liu, R., Lu, X., Martens, E.C., Marri, P.R., Médigue, C., Menard, M.L., Miller, N.M., Morales-Soto, N., Norton, S., Ogier, J.C., Orchard, S.S., Park, D., Park, Y., Quorollo, B.A., Sugar, D.R., Richards, G.R., Rouy, Z., Slominski, B., Slominski, K., Snyder, H., Tjaden, B.C., van der Hoeven, R., Welch, R.D., Wheeler, C., Xiang, B., Barbazuk, B., Gaudriault, S., Goodner, B., Slater, S.C., Forst, S., Goldman, B.S., Goodrich-Blair, H. (2011). The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One*, 6(11), e27909.
- Cheesbrough, M. (2009). *District laboratory practice in tropical countries* Part 1. (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Chen, J., Ding, M., Pederson, D.S. (1994). Binding of TFIID to the CYC1 TATA boxes in yeast occurs independently of upstream activating sequences. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91(25), 11909-13.
- Ciche, T.A., Bintrim, S.B., Horswill, A.R., Ensign, J.C. (2001). A phosphopantetheinyl transferase homolog is essential for *Photorhabdus luminescens* to support growth and reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Bacteriology*, 183, 3117-3126.
- Ciche, T.A., Kim, K.S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2275-2287.
- Cimen, H., Puza, V., Nermut, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., Faktorova, L., Hazir, S. (2016). *Steinernema beitlechemi* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. *Nematology*, 18, 439-453.
- Cimen, H., Touray, M., Gulsen, S.H., Erincik, O., Wenski, S.L., Bode, H.B., Shapiro-Ilan, D., Hazir, S. (2021). Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*

species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 5517–5528.

Clarke, D.J. (2008). *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*, 10(11), 2159-67.

Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G. and Thomas, V. (2010). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2689-97.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-82.

Culbertson C.G., Holmes, D.H., Overton, W.M. (1965). *Hartmanella castellani* (*Acanthamoeba* sp): Preliminary report on experimental chemotherapy. *American Journal of Clinical Pathology*. 43, 361-4.

Culbertson, C.G., Smith, J. W., Cohen, H.K. and and Minner, J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *The American Journal of Pathology*, 35(1), 185-232.

Culbertson, C.G., Smith, J.W. and Minner, J.R. (1958). *Acanthamoeba*: Observations on Animal Pathogenicity. *Science*, 127(3313), 1506-1506.

Da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H., Marciano-Cabral, F. (2009). Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 251406.

De Jonckheere, J.F. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(5), 385-387.

Debnath, A., Tunac, J.B., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Shibayama, M., McKerrow, J.H. (2014). *In vitro* efficacy of corifungin against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1523-1528.

Demain, A.L., Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69, 1-39.

- Despommier, D., Griffin, D.O., Gwadz, R., Hotez, P., Knirsch, C. (2017). *Parasitic Diseases* (6th ed). New York: Parasites without borders.
- Di Gregorio, C., Rivasi, F., Mongiardo, N., De Rienzo, B., Wallace, S., Visvesvara, G. (1992). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 116, 1363-5.
- Dönmez-Özkan, H., Cimen, H., Ulug, D., Wenski, S., Yigit-Ozer, S., Telli, M., Aydin, N., Bode, H., Hazir, S. (2019). Nematode-associated bacteria: Production of antimicrobial agent as a presumptive nominee for curing endodontic infections caused by *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2672.
- Dreyer, J., Malan, A., Dicks, L. (2018). Bacteria of the genus *Xenorhabdus*, a novel source of bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21, 1307-1313.
- Dudnik, A., Bigler, L., Dudler, R. (2013). Heterologous expression of a *Photorhabdus luminescens* syrbactin-like gene cluster results in production of the potent proteasome inhibitor glidobactin A. *Microbiological Research*, 168(2), 73-76.
- Eckstein, S., Heermann, R. (2019). Regulation of phenotypic switching and heterogeneity in *Photorhabdus luminescens* cell populations. *Journal of Molecular Biology*, 431(23), 4559-4568.
- Eroglu, C., Cimen, H., Ulug, D., Karagoz, M., Hazir, S., Cakmak, I. (2019). Acaricidal effect of cell-free supernatants from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 1(160), 61-66.
- Fallon, D., Kaya, H., Gaugler, R., Sipes, B. (2004). Effect of *Steinernema feltiae*-*Xenorhabdus bovienii* insect pathogen complex on *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 6(5), 671-680.

- Faner, M.A., Feig, A.L. (2013). Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions. *Methods*, *63*, 144-159.
- Fang, X., Zhang, M., Tang, Q., Wang, Y., Zhang, X. (2014). Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* in vitro and in planta. *Scientific Reports*, *4*, 4300.
- Farrar, J., Hotez, P.J., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., White, N. (2013). *Manson's tropical diseases* (23rd ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Feingold, J., Abraham, J., Bilgrami, S. (1998). *Acanthamoeba meningoencephalitis* following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, *22*, 297–300. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701320>
- Fenton, A., Magoolagan, L., Kennedy, Z., Spencer, K.A. (2011). Parasite-induced warning coloration: a novel form of host manipulation. *Animal Behaviour*, *81*, 417-422.
- Field, V., Gautret, P., Schlagenhauf, G., Burchard, E., Caumes, M., Jensenius, F. (2010). Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. *BMC Infectious Diseases*, *10*(1), 330.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, *51*, 47–72.
- Foulet, F., Botterel, F., Buffet, P., Morizot, G., Rivollet, D., Deniau, M., Pratlong, F., Costa, J.M., Bretagne, S. (2007). Detection and Identification of *Leishmania* Species from Clinical Specimens by Using a Real-Time PCR Assay and Sequencing of the Cytochrome b Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(7), 2110- 2115.
- Friedland, L., Raphael, S., Deutsch, E., Johal, J., Martyn, L., Visvesvara, G., Lischnher, H. (1992). Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *11*, 404-7.
- Fuchs, S., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., Bode, H. (2014). Fabclavines: Bioactive peptide-polyketide-polyamino hybrids from *Xenorhabdus*. *Chembiochem* *15*(4), 512–516.
- Furgani, G., Böszörményi, E., Fodor, A., Mathe-Fodor, A., Forst, S., Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M., Stackebrandt, E., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Wolf, S.L. (2008).

- Xenorhabdus* antibiotics: A comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 745-58.
- Gagnon, M. ve Walter, K. (2006). A case of *Acanthamoeba* keratitis as a result of a cosmetic contact lens. *Eye & Contact Lens*, 32, 37-8.
- Gardner, H.A.R., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., Sotrel, A. (1991). Granulomatous amebic encephalitis in an AIDS patient. *Neurology*, 41(12).
- Gillor, O. ve Ghazaryan, L. (2007). Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2, 115-22.
- Gómez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., Ares-Mazás, E. (2007). *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitology research*, 100(5), 1151-1154.
- Gonzlez, U., Pinart, M., Reveiz, L., Alvar, J. (2008). Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4.
- Goodrich-Blair, H. ve Clarke, D.J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*, 64(2), 260-8.
- Gooi, P., Lee-Wing, M., Brownstein, S., El-Defrawy, S., Jackson, W., Mintsoulis, G. (2008). *Acanthamoeba* keratitis: persistent organisms without inflammation after 1 year of topical chlorhexidine. *Cornea*, 27, 246-8.
- Gottesman, S., Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, a003798.
- Grewal, P.S., Lewis, E.E, Venkatachari, S. (1999). Allelopathy: a possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1, 735-743.
- Grundmann, F., Kaiser, M., Kurz, M., Schiell, M., Batzer, A., Bode, H.B. (2013). Structure determination of the bioactive depsipeptide xenobactin from *Xenorhabdus* sp. PB30.3. *RSC Advances*, 3(44), 22072-22077.
- Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Batzer, A., Kurz, M., Thanwisai, A., Chantratita, N., Bode, H. (2014). Antiparasitic chaitophumines from entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. *Journal of Natural Products*, 77(4), 779-83.

- Gualtieri, M., Aumelas, A., Thaler, J.O. (2009). Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of Antibiotics*, 62, 295–302.
- Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K., Bryceson, A.D.M. (2002). Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8), 494-501.
- Gülcü, B. (2010). *Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodlar Üzerine Araştırmalar* Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Guo, S., Zhang, S., Fang, X., Liu, Q., Gao, J., Bilal, M., Wang, Y., Zhang, X. (2017). Regulation of antimicrobial activity and xenocoumacins biosynthesis by pH in *Xenorhabdus nematophila*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–14.
- Gupta, I. ve Guin, P. (2010). Communicable diseases in the South-East Asia Region of the World Health Organization: towards a more effective response. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(3),199-205.
- Guzman, J.D. (2014). Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, 19(12), 19292–19349.
- Han, R. ve Ehlers, R.U. (2000). Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75, 55–58.
- Han, R., Ehlers, R. (2001). Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 239-247.
- Hazir, S., Shapiro-Ilan, D., Bock, C., Hazir, C., Leithe, L.G., Hotchkiss, M.W. (2016). Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 369–381.

- Heredero-Bermejo, I., Martin, C., Soliveri, J., Copa-Patiño, J., Pérez-Serrano, J. (2012). *Acanthamoeba castellanii*: In vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. *Parasitology Research*, 110, 2563-2567.
- Herwaldt, B. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354(9185), 1191-1199.
- Hinchliffe, S.J., Hares, M.C., Dowling, A.J., French-Constant, R.H. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal*, 3, 83–100.
- Hommel, M. (1999). Visceral leishmaniasis: Biology of the parasite. *Journal of Infection*, 39(2), 101-111.
- Houard, J., Aumelas, A., Noël, T., Pages, S., Givaudan, A., Fitton-Ouhabi, V., Villain-Guillot, P., Gualtieri, M. (2013). Cabanillasin, a new antifungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasi* JM26. *The Journal of Antibiotics*, 66, 617–620.
- Hu, K., Li, J., Webster, J. M. (1999). Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes, *Nematology*, 1(5), 457-469.
- Hu, K.J., Li, J.X., Li, B., Webster, J.M., Chen, G.H. (2006). A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 4677-4681.
- Incedayi, G., Cimen, H., Ulug, D., Touray, M., Bode, E., Bode, H.B., Orenlili Yaylagul, E., Hazir, S., Cakmak, I. (2021). Relative potency of a novel acaricidal compound from *Xenorhabdus*, a bacterial genus mutualistically associated with entomopathogenic nematodes. *Scientific Reports*, 11, 11253.
- Jacobson, R. (2003). *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a perplexing parasite. *Folia Parasitologica*, 50(4), 241-250.
- Ji, D., Yi, Y., Kang, G.H., Choi, Y.H., Kim, P., Baek, N.I., Kim, Y. (2004). Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 241-248.

- Jones, B., McGill, J., Steele, A. (1975b). Recurrent suppurative keratouveitis with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellanii*. *Transactions of the Ophthalmological Societies of UK*, 95, 210-3.
- Jones, D.B., Visvesvara, G.S., Robinson, N.M., (1975a). *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Transactions of the Ophthalmological Societies of UK*, 95(2), 221-232.
- Joshi, A., Verma, M., Chakravorty, M. (1982). Thiolutin-resistant mutants of *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22, 541–547.
- Joyce, S.A., Brachmann, A.O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D.J., Bode, H.B. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 1942-1945.
- Joyce, S.A., Lango, L., Clarke, D.J. (2011). The regulation of secondary metabolism and mutualism in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Advances in Applied Microbiology*, 76, 1-25.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38, 181-206.
- Kebede, N., Oghumu, S., Worku, A., Hailu, A., Varikuti, S., Satoskar, A. (2013). Multilocus microsatellite signature and identification of specific molecular markers for *Leishmania aethiopia*. *Parasites & Vectors* 6(1), 160.
- Khan, N. (2005). Granulomatous Amoebic Encephalitis: Clinical Diagnosis and Management. *American Journal of Infectious Diseases*, 1, 79-83.
- Khan, N. (2007). *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *International Journal of Parasitology*, 37, 131-8.
- Khan, N. ve Siddiqui, R. (2009). *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *International Journal of Parasitology*, 39, 1611-6.
- Kidney, D. ve Kim, S. (1998). CNS infections with free-living amebas: neuroimaging findings. *American Journal of Roentgenology*, 171, 809-12.
- Kim, I.H., Ensign, J., Kim, D.Y., Jung, H.Y., Kim, N.R., Choi, B.H., Park, S.M., Lan, Q., Goodman, W.G. (2017). Specificity and putative mode of action of a mosquito

larvicidal toxin from the bacterium *Xenorhabdus innexi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 21-28.

- Kirkup, B.C. Jr. (2006). Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Current Medicinal Chemistry*, 13(27), 3335-50.
- Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis, C., Auer, H., Walochnik, J., Schmutzhard, E. (2010). Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocritical Care*, 12, 91-4.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C.T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, 3, 923-936.
- Li, J., Chen, G., Webster, J.M. (1995). Antimicrobial metabolites from a bacteria symbiont. *Journal of Natural Products*, 58, 1081-1086.
- Li, J.X., Chen, G., Webster, J.M. (1997a). Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 770-773.
- Li, J.X., Chen, G.H., Webster, J.M. (1997b). Synthesis and antistaphylococcal activity of nematophin and its analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 7, 1349-1352.
- Li, J.X., Hu, K., Webster, J.M. (1998). Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 34, 1331-1339.
- Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marín, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., Valladares, B. (2007). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitology Research*, 102, 167-9.
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W.Q., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, M., Ayala, F.J., Miles, M.A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 9375-9380.

- Mahmoudvand, H., Saedi Dezaki, E., Ezatpour, B., Sharifi, I., Kheirandish, F., Rashidipour, M. (2016). *In Vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of *Pistacia vera* essential oil. *Planta Medica*, 82(4), 279-284.
- Manzano, J., Lecerf-Schmidt, F., Lespinasse, M., Di Pietro, A., Castanys, S., Boumendjel, A., Gamarro, F. (2014). Identification of specific reversal agents for Leishmania ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 664-672.
- Martens, E.C., Goodrich-Blair, H. (2005). The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cell Microbiology*, 7, 1723-1735.
- Martínez, A., Sotelo-Avila, C., Garcia-Tamayo, J., Morón, J., Willaert, E., Stamm, W. (1977). Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. Pathogenesis and clinico-pathological study. *Acta Neuropathologica*, 37, 183-91.
- Martinez, A., Visvesvara, G. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*, 7, 583-98.
- Masschelein, J., Clauwers, C., Awodi, U.R., Stalmans, K., Vermaelen, W., Lescrinier, E., Aertsen, A., Michiels, C., Challis, G.L., Lavigne, R. (2015). A combination of polyunsaturated fatty acid, nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic machinery is used to assemble the zeamine antibiotics. *Chemical Science*, 6(2), 923–929.
- Masschelein, J., Mattheus, W., Gao, L., Moons, P., Van Houdt, R., Uytterhoeven, B., Lamberigts, C., Lescrinier, E., Rozenski, J., Herdewijn, P., Aertsen, A., Michiels, C., Lavigne, R. (2013). A PKS/NRPS/FAS hybrid gene cluster from *Serratia plymuthica* RVH1 encoding the biosynthesis of three broad spectrum, Zeamine-related antibiotics. *PLoS One* 8, e54143.
- Massé, E., Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 4620–4625.
- Mathers, W., Nelson, S., Lane, J., Wilson, M., Allen, R., Folberg, R. (2000). Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Archives of Ophthalmology*, 118, 178-83.

- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16, 188–189.
- Maxwell, P.W., Chen, G., Webster, J.M., Dunphy, G.B. (1994). Stability and activities of antibiotics produced during infection of the insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 715–721.
- McInerney, B.V., Taylor, W.C., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Gregson, R.P. (1991a). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *Journal of Natural Products*, 54, 785–795.
- McInerney, B.V., Taylor, W.C., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Gregson, R.P. (1991b). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 2. Benzopyrane-1-one derivatives with gastroprotective activity. *Journal of Natural Products*, 54, 785–795.
- Mohammed, M.A. ve Coppel, H.C. (1983). Mass rearing of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) for small-scale laboratory studies. *Great Lakes Entomology*, 16, 139-141.
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Molecular Cell*, 9, 23–30.
- Mona, H.A., Aly, N.A.H. (2009). Insecticidal activity and genetic characterization of four bacterial isolates of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* associated with entomopathogenic nematodes. *Pest Technologies*, 3(1), 50–57.
- Moore, M., McCulley, J., Luckenbach, M., Gelender, H., Newton, C., McDonald, M., Visvesvara, G. (1985). *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *American Journal of Ophthalmology*, 100, 396-403.
- Muangpat, P., Yooyangket, T., Fukruksa, C., Suwannaroj, M., Yimthin, T., Sitthisak, S., Chantratita, N., Vitta, A., Tobias, N., Bode, H., Thanwisai, A. (2017). Screening of the antimicrobial activity against drug resistant bacteria of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* associated with entomopathogenic nematodes from Mae Wong National Park, Thailand. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1142.
- Murray, H. (2002). Kala-Azar — Progress against a Neglected Disease. *The New England Journal of Medicine*, 347(22), 1793-1794.

- Murray, H.W. (2001). Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2185.
- Nachega, J., Rombaux, P., Weynand, B., Thomas, G., Zech, F. (2005). Successful treatment of *Acanthamoeba rhinosinusitis* in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*, 19, 621-5.
- Nermut, J., Zemek, R., Mráček, Z., Palevsky, E., Půža, V. (2019). Entomopathogenic nematodes as natural enemies for control of *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae)?. *Biological Control*, 1(128), 102-110.
- Newman, D.J. ve Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.
- Newman, D.J. ve Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-61.
- Ng, K.K., Webster, J.M. (1997). Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, 125–132.
- Nollmann, F.I., Dowling, A., Kaiser, M., Deckmann, K., Grösch, S., ffrench-Constant, R., Bode, H.B. (2012). Synthesis of szentiamide, a depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmaii* with activity against *Plasmodium falciparum*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8,528–533. doi: 10.3762/bjoc.8.60
- Ofori-Kwakye, S., Sidebottom, D., Herbert, J., Fischer, E., Visvesvara, G. (1986). Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. Case report. *Journal of Neurosurgery*, 64, 505-9.
- Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M., O'Hanlon, P.J., Chopra, I. (2001). Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(2), 532-539.
- Orozco, R.A., Hill, T., Stock, S.P. (2013). Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Current Microbiology*, 1, 30-39.
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 69(1), 10-8. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.016

- Paik, S., Park, Y.H., Suh, S.I., Kim, H.S., Lee, I.S., Park, M.K., Lee, C.S., Park, S.H. (2001). Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 22, 372-374.
- Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*, 30(12), 1395-1405.
- Paul, V.J., Frautschy, S., Fenical, W., Neelson, K.H. (1981). Antibiotics in microbial ecology - Isolation and structure assignment of several new anti-bacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 589-597.
- Peel, M.M., Alfredson, D.A., Gerrard, J.G., Davis, J.M., Robson, J.M., McDougall, R.J., Scullie, B.L., Akhurst, R.J. (1999). Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photobacterium luminescens* from infected humans in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3647-53.
- Pemán, J., Jarque, I., Frasquet, J., Alberola, C., Salavert, M., Sanz, J., Gomila, B., Esteban, G. (2008). Unexpected postmortem diagnosis of *Acanthamoeba* meningoencephalitis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *American Journal of Transplantation*, 8, 1562-6.
- Pérez-Serrano, J., Martínez, J., Pérez, B., Bernadina, W.E., Rodríguez-Caabeiro, F. (2000). *In vitro* shock response to different stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. *International Journal for Parasitology*, 30(7), 829-35.
- Peterson, R., Smith, M., Pepose, J. (1990). Recurrent *Acanthamoeba* keratitis following penetrating keratoplasty. *Archives of Ophthalmology*, 108, 1482-3.
- Petry, F., Torzewski, M., Bohl, J., Wilhelm-Schwenkmezger, T., Scheid, P., Walochnik, J., Michel, R., Zöller, L., Werhahn, K., Bhakdi, S., Lackner, K. (2006). Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1903-4.
- Plourde, M., Coelho, A., Keynan, Y., Larios, O., Ndao, M., Ruest, A., Kamhawi, S. (2012). Genetic Polymorphisms and Drug Susceptibility in Four Isolates of *Leishmania tropica* Obtained from Canadian Soldiers Returning from Afghanistan (*Leishmania tropica* from Afghanistan). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), E1463.

- Pussard, M. ve Pons, R. (1977). Morphologies of the cystic wall and taxonomy of the genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13, 557-610.
- Raja, R.K., Arun, A., Touray, M., Gulsen, S.H., Cimen, H., Gulcu, B., Hazir, C., Aiswarya, D., Ulug, D., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, S. (2021). Antagonists and defense mechanisms of entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria. *Biological Control*, 152, 104452.
- Rama, P., Matuska, S., Viganò, M., Spinelli, A., Paganoni, G., Brancato, R. (2003). Bilateral *Acanthamoeba* keratitis with late recurrence of the infection in a corneal graft: a case report. *European Journal of Ophthalmology*, 13, 311-4.
- Räz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., Brun, R. (1997). The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica*, 68(2), 139-147.
- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A.O., Bode, H.B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. *Chembiochem*, 10, 1997–2001.
- Reinheimer, C., Büttner, D., Proschak, E., Bode, H.B., Kempf, V.A.J., Wichelhaus, T.A. (2018). Anti-tubercular activity of a natural stilbene and its synthetic derivative. *GMS Infectious Diseases*, 6, Doc01.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581-596.
- Reithinger, R., Mohsen, M., Aadil, K., Sidiqi, M., Erasmus, P., Coleman, P. (2003). Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis, Kabul, Afghanistan. *Emerging Infectious Diseases*, 9(6), 727-729.
- Richardson, W.H., Schmidt, T.M., Neelson, K.H. (1988). Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1602-5.
- Romby, P., Vandenesch, F., Wagner, E.G.H. (2006). The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 229–236.
- Rumelt, S., Cohen, I., Lefler, E., Rehany, U. (2001). Corneal coinfection with *Scedosporium apiospermum* and *Acanthamoeba* after sewage-contaminated ocular injury. *Cornea*, 20, 112-6.

- Ruwizhi, N., Aderibigbe, B.A. (2020). Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5712.
- Samaliev, H., Andreoglou, F., Elawad, S., Hague, N., Gowen, S. (2000). The nematicidal effects of the bacteria *Pseudomonas oryzae* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 2(5), 507-514.
- San-Blas, E., Carrillo, Z., Parra, Y. (2012). Effect of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45, 1950-1967.
- Santarém, N., Cunha, J., Silvestre, R., Silva, C., Moreira, D., Ouellette, M., Cordeiro-Da-Silva, A. (2014). The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology*, 141(2), 192-205.
- Santos, BS., Branquinha, MH., Pedrosa e Silva, Concei M., Santos, Andr; L. S., D'Avila-Levy, Claudia M. (2013). *Leishmania*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 348-353.
- Scherlach, K., Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7, 1753-1760.
- Schimming, O., Fleischhacker, F., Nollmann, F.I., Bode, H.B. (2014). Yeast homologous recombination cloning leading to the novel peptides ambactin and xenolindicin. *Chembiochem*, 15(9), 1290-1294.
- Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., Brennan, R.G. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *The EMBO Journal*, 21, 3546–3556.
- Schwardzwald, H., Shah, P., Hicks, J., Levy, M., Wagner, M., Kline, M. (2003). Disseminated *Acanthamoeba* infection in a human immunodeficiency virus-infected infant. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22, 197-9.
- Seijo-Martinez, M., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodriguez De Lope, A., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G. (2000). Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3892-5.

- Seo, S., Lee, S., Hong, Y., Kim, Y. (2012). Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3816–3823.
- Sergeant, M., Baxter, L., Jarrett, P., Shaw, E., Ousley, M., Winstanley, C., Morgan, J. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5895-907.
- Shah, F.A., Abdoarrahem, M.M., Berry, C., Touray, M., Hazir, S., Butt, T.M. (2021). Indiscriminate ingestion of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria by *Aedes aegypti* larvae: a novel strategy to control the vector of Chikungunya, dengue and yellow fever. *Turkish Journal of Zoology*, 45, 372–383.
- Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Qiu, X. (2014). Production of entomopathogenic nematodes. In: J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, D.I. Shapiro-Ilan (Eds), *Mass production of beneficial organisms: Invertebrates and entomopathogens* (pp. 321-356). Waltham, MA, USA: Academic Press/Elsevier.
- Shapiro-Ilan, D.I., Hazir, S., Glaser, I. (2020). Advances in use of entomopathogenic nematodes in integrated pest management. In: M. Kogan, E.A. Heinrichs (Eds.) *Integrated management of insect pests: Current and future developments*, (pp 91–105). Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing.
- Sheng, W., Hung, C., Huang, H., Liang, S., Cheng, Y., Ji, D., Chang, S. (2009). First case of granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 277-9.
- Shi, D., An, R., Zhang, W., Zhang, G., Yu, Z. (2017). Stilbene derivatives from *Photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 60-65.
- Shi, Y.M., Bode, H.B. (2018). Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria-nematode-insect interactions. *Natural Product Reports*, 35(4), 309-335.
- Silva, W.J., Pilz-Júnior, H.L., Heermann, R., Silva, O.S. (2020). The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. *Parasites & Vectors*, 13(1), 1–14.

- Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., Pabico, R.C., Gaspari, A.A. (1994). https://www.nejm.org/toc/nejm/331/2?query=article_issue_link Successful Treatment of Disseminated *Acanthamoeba* Infection in an Immunocompromised Patient. *The New England Journal of Medicine*, 331, 85-87.
- Sobrero, P., Valverde, C. (2012). The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Critical Reviews in Microbiology*, 38, 276–299.
- Steinberg, J., Galindo, R., Kraus, E., Ghanem, K. (2002). Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clinical Infectious Diseases*, 35, e43-9.
- Sundar, L., Chang, F.N. (1993). Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of General Microbiology*, 139, 3139-3148.
- Sunter, J.D., ve Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7.
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., Boemare, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1921-1937.
- Theodore, C.M., King, J.B., You, J., Cichewicz, R.H. (2012). Production of cytotoxic glidobactins/luminmycins by *Photorhabdus asymbiotica* in liquid media and live crickets. *Journal of Natural Products*, 75(11), 2007-2011.
- Tien, S. ve Sheu, M. (1999), Treatment of *Acanthamoeba* keratitis combined with fungal infection with polyhexamethylene biguanide. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 15, 665-73.
- Tilak, R., Singh, R., Wani, I., Parekh, A., Prakash, J., Usha, U. (2008). An unusual case of *Acanthamoeba peritonitis* in a malnourished patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Journal of Infection in Developing Countries*, 2, 146-8.

- Tobias, N.J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y.M., Simonyi, S., Grün, P., Shapiro-Ilan, D., Pidot, S.J., Stinear, T.P., Ebersberger, I., Bode, H.B. (2017). Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature Microbiology*, 12, 1676-1685.
- Visvesvara, G.S., Mirra, S.S., Brandt, F.H., Moss, D.M., Mathews, H.M., Martinez, A.J. (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(18), 1405-1412.
- Vitta, A., Thimpoo, P., Meesil, W., Yimthin, T., Fukruksa, C., Polseela, R., Mangkit, B., Tandhavanant, S., Thanwisai, A. (2018). Larvicidal activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8, 31-36.
- Webster, N.S., Negri, A.P., Webb, R.I., Hill, R.T. (2002). A spongin-boring alpha-proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Marine Ecology Progress Series*, 232, 305–309.
- Weekers, P.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P., Vogels, G.D. (1993). Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2317-2319.
- Weigle, K. ve Saravia, N.G. (1996). Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 433-450.
- Wenski, S.L., Cimen, H., Berghaus, N., Fuchs, S.W., Hazir, S., Bode, H.B. (2020). Fabclavine diversity in *Xenorhabdus* bacteria. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16, 956-965.
- Wenski, S.L., Kolbert, D., Grammbitter, G.L.C., Bode, H.B. (2019). Fabclavine biosynthesis in *X. szentirmaii*: shortened derivatives and characterization of the thioester reductase FclG and the condensation domain-like protein FclL. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46(3-4), 565-572.

- Wilson, S. (1995). DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Field applications and practicalities. *Annals Of Tropical Medicine And Parasitology*, 89, 95-100.
- World Health Organization [WHO]. (2017). *Leishmaniasis, Epidemiological Situation*. World Health Organization. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> [Erişim Tarihi: 20/07/2017]
- Wortmann, G., Miller, R., Oster, C., Jackson, J., Aronson, N. (2002). A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(3), 261-7.
- Yamey, G. (2002). The world's most neglected diseases. *British Medical Journal*, 325(7357), 176.
- Yang, X., Qiu, D., Yang, H., Liu, Z., Zeng, H., Yuan, J. (2011). Antifungal activity of xenocoumacin 1 from *Xenorhabdus nematophilus* var. *pekingensis* against *Phytophthora infestans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 523-528.
- Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Ancelle, T., Batellier, L., Dupouy-Camet, J. & Chaumeil, C. (2007). Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26, 221-4.
- Zangger, H., Hailu, A., Desponds, C., Lye, L., Akopyants, N., Dobson, D., Bates, P. (2014). *Leishmania aethiopica* Field Isolates Bearing an Endosymbiotic dsRNA Virus Induce Pro-inflammatory Cytokine Response (Leishmania RNA Virus in *L. aethiopica*). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), E2836.
- Zhang, X.Y., Bao, J., Wang, G.H., He, F., Xu, X.Y., Qi, S.H. (2012). Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China Sea gorgonians. *Microbial Ecology*, 64, 617–627.
- Zhao, L., Kaiser, M., Bode, H.B. (2018). Rhabdopeptide/Xenortide-like Peptides from *Xenorhabdus innexi* with Terminal Amines Showing Potent Antiprotozoal Activity. *Organic Letters*, 20(17), 5116-5120.

- Zhao, L., Vo, T.D., Kaiser, M., Bode, H.B. (2020). Phototemtide A, a cyclic lipopeptide heterologously expressed from *Photorhabdus temperata* Meg1, shows selective antiprotozoal activity. *ChemBioChem*, 21(9), 1288-1292.
- Zhou, Q., Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Gaudriault, S., Batzer, A., Kurz, M., Bode, H.B. (2013). Structure and Biosynthesis of Xenoamicins from Entomopathogenic *Xenorhabdus*. *Chemistry a European Journal*, 19(49), 16772-16779. <https://doi.org/10.1002/chem.201302481>
- Zhou, T., Zeng, H., Qiu, D., Yang, X., Wang, B., Chen, M., Guo, L., Wang, S. (2011). Global transcriptional responses of *Bacillus subtilis* to xenocoumacin 1. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 652–662.



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“İnsan Parazitleri *Acanthamoeba Castellanii* ve *Leishmania Tropica*’ya Karşı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* Bakteri Sekonder Metabolitlerinin Etkilerinin Araştırılması ve Etken Maddelerin Belirlenmesi” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Şebnem Hazal GÜLŞEN

01 / 06 / 2022

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜLŞEN, Şebnem Hazal

Yabancı dil : İngilizce, Yökdil: 92,5

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi(Yıl)
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2022
Y. Lisans	Giresun Üniversitesi	2014
Lisans	Giresun Üniversitesi	2012

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Üçüncülüğü (2012),

Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması– Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Bursiyeri (2012-2014),

Universita Studi Degli Del Molise/İtalya’da 6 ay eğitim – Erasmus Öğrenci Değişim Programı (2011-2012),

TÜBİTAK 116Z074 no.’lu Almanya ile ikili işbirliği projesi Bursiyeri (2017-2020),

YÖK 100/2000 ve TÜBİTAK 22-11A Doktora bursiyeri,

Satranç Antrenörlüğü, Hakemliği ve Oyuncu Lisansı,

2002, 2004, 2006 İzmir Satranç Şampiyonu, 2002 Satranç Türkiye Üçüncüsü, 2006 Türkiye Satranç Sekizincisi, 2009, 2010 Giresun Satranç Şampiyonu,

İlk yardım eğitimi ve aktif ilk yardımcı sertifikası (2016).

AKADEMİK YAYINLAR

1) MAKALELER

Katı, H., Karaca, B., **Gulsen, S. H.** Identification of *Bacillus* species isolated from soil and investigation of their biological properties, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2016.

Touray, M., Gulcu, B., Ulug, D., **Gulsen, S. H.**, Çimen, H., Kaya, H.K., Cakmak, I, Hazir, S. Evaluation of different sponge types on the survival and infectivity of stored entomopathogenic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology. 171: 107332, 2020.

Ramalingam K.R, Alagarsamy, A., Touray M., **Gulsen, S. H.**, Çimen, H., Gülcü B., Hazır, C., Dilipkumar, A., Ulug, D, Çakmak İ., Kaya H, Hazır S. Antagonists and defense mechanisms of entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria, Biological Control, 104452, 2021.

Nalinci, E., Karagoz, M., Gulcu, B., Ulug, D., **Gulsen, S. H.**, Cimen, H., Touray, M., Shapiro-Ilan, D. and Hazir, S. The effect of chemical insecticides on the scavenging performance of *Steinernema carpocapsae*: direct effects and exposure to insects killed by chemical insecticides. Journal of Invertebrate Pathology, 184: 107641, 2021.

Touray, M., Cimen, H., **Gulsen, S. H.**, Ulug, D., Erdogus, D., Shapiro-Ilan, D. and Hazir, S. The impact of chemical nematicides on entomopathogenic nematode survival and infectivity. Journal of Nematology, 53: e2021–e2049, 2021.

Cimen, H.; Touray, M., **Gulsen, S. H.** Erincik, O., Wenski, S. L., Bode, H. B., Shapiro-Ilan, D., Hazir, S. Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii*. Applied Microbiology and Biotechnology, 105: 5517–5528, 2021.

Cimen, H., Touray, M., **Gulsen, S. H.**, Hazir, S. Natural products from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* - mechanisms and impacts. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022. (IN PRESS). (Q1)

Gulsen, S. H., Tileklioglu, E., Bode, E., Cimen, H., Ertabaklar, H., Ulug, D., Ertug, S., Wenski, S.L., Touray, M., Hazir, C., Bilecenoglu, D.K., Yıldız, I., Bode, H.B., and Hazir, S. Antiprotozoal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacterial secondary metabolites. Scientific Reports (IN PRESS).

2) PROJELER

Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması– Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (2012-2014),

TÜBİTAK 116Z074 no.'lu Almanya ile ikili işbirliği projesi (2017-2020),

3) BİLDİRİLER

Ertabaklar, H., Tileklioğlu, E., **Gülşen Ş. H.**, Hazır, C., Ertuğ, S., Yıldız, İ., Çimen, H., Hazır, S. Evaluation of Anti-Leishmanial activity of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* cell-free bacterial supernatants. 8th Global Summit on Microbiology and Infectious Diseases, Paris-Fransa, 2018.

Hazır, S., Uluğ, D., Gülcü, B., Çimen, H., Hazır C., Kaya-Bilecenoğlu, D., **Gülşen Ş. H.**, Touray, M. Differences in the efficiency of Scavenger Deterrent Factor among the different *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species V. International Multidisciplinary Congress of Eurasia, Barselona-İspanya, 2018.

Hazır, C., **Gülşen Ş. H.**, Tileklioğlu, E., Ertabaklar, H., Uluğ D., Ertuğ, S., H., Çimen, H., Hazır, S. Anti-protozoal activity of *Xenorhabdus* bacterial supernatants against *Acanthamoeba castellanii* V. International Multidisciplinary Congress of Eurasia, Barselona-İspanya, 2018.

Hazır, S., Tileklioğlu, E., **Gülşen, Ş. H.**, Çimen, H., Ertuğ, S., Uluğ, D., Ertabaklar, H., Hazır C., Kaya-Bilecenoğlu, D., Bode, H. B. Insect pathogenic bacteria: A novel source of human parasitic antiprotozoal compounds 7th International Entomopathogens and Microbial Control Congress, Kayseri-Türkiye, 2019.

Hazır, S., Tileklioğlu, E., **Gülşen Ş. H.**, Çimen, H., Ertabaklar H., Uluğ D., Ertuğ, S., Bode, H. B., Hazır, C., Kaya-Bilecenoğlu, D. Antiprotozoal activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria mutualistically associated with entomopathogenic nematodes 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group “Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests” Valencia-İspanya, 2019.

Tileklioğlu, E., Hazır, S., **Gülşen Ş. H.**, Çimen, H., Ertuğ, S., Uluğ D., Hazır, C., Bode, H. B., Kaya-Bilecenoğlu, D., Ertabaklar, H. *Trichomonas vaginalis*'e Karşı Yeni Aktif Biyomoleküller: Böcek Patojeni Bakteriler 21. Parazitoloji Kongresi, Türkiye, 2019.

Hazır, C., Uluğ D., **Gülşen Ş. H.**, Çimen, H., Touray, M., Kaya-Bilecenoğlu, D., Kaya, H. K., Bode, H. B., Hazır, S. Does Anthraquinone Produced by *Photorhabdus* Bacteria Deter Scavengers? 7th International Entomopathogens and Microbial Control Congress, Kayseri-Türkiye, 2019.

Hazır, S., Uluğ, D., Çimen, H., **Gülşen Ş. H.**, Touray, M., Gülcü, B., Bode, H. B., Hazır, C., Karagöz M., Kaya-Bilecenoğlu, D., Kaya, H. K. Do all *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria protect nematode infected cadavers against scavengers? 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group “Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests” Valencia-İspanya, 2019.

