

I. Bakteriyofaj Kursu

20 - 23 MART 2023, AYDIN



Düzenleyenler

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi REDPROM Araştırma Merkezi

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Bakteriyofaj Alt Çalışma Grubu

ÖNSÖZ

Bakteriyofajlar 100 yılı aşkın zamandır bilinmektedir. Antibiyotik öncesi dönemde enfeksiyon tedavisinde kullanılmış olmasına karşın modern ve “batı” tababetinde yerini bulamamış ve birkaç ülke ile sınırlı kullanım alanı bulmuştur. Ancak son dönemlerde mevcut antibiyotiklere direncin artması ve dirençli bakterilerin yaygınlaşması yeni alternatifler aranmasına yol açmıştır. Eski bir umut olarak bakteriyofajlar yeniden bilim dünyasının gözde çalışma alanlarından birisi haline gelmeye başlamıştır.

Bakteriyofaj çalışmaları ülkemizde de bilimin konusu olmaya başlamış ve bu konuda çalışmalar ve lisansüstü tezler verilmeye başlanmıştır. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti bünyesinde yer alan Bakteriyofaj alt çalışma grubunun temel amaçlarından birisi bakteriyofaj konusundaki bilginin ve çalışma yöntemlerinin yaygınlaşmasını sağlamak ve uygulanabilirliğini artırmaktır. Bu amaçla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Uygulama ve Araştırma Merkezi (REDPROM) ile Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Bakteriyofaj Alt Çalışma Grubu tarafından bakteriyofaj alanında çalışmak isteyen araştırmacılara yönelik bir kurs düzenlenmesine karar verilmiştir. TMC'nin desteği ve himayesinde I. Bakteriyofaj Kursu'nun 20-23 Mart 2023 tarihlerinde Aydın'da yapılmasına karar verilmiştir. Tıp, veteriner, gıda, ziraat, biyoloji ve eczacılık gibi farklı disiplinlerin çalışma alanına giren bakteriyofajlar konusundaki fenotipik ve genotipik çalışmaların yaygınlaşması önemlidir. Bu amaçla kaynaktan faj izolasyonu, agar spot testi, ikili agar kaplama yöntemi, tek plak izolasyonu, faj titre hesaplama, optimal MOI belirleme, redüksiyon deneyi, faj DNA izolasyonu, restriksiyon profili belirleme (RFLP), *Galleria mellonella* deneysel enfeksiyonu ve faj genom analizi gibi konuların tüm kursiyerlerin birebir uygulamasıyla çalışılacağı bu kursun bu alandaki çalışmaların yaygınlaşması için önemli bir adım olacağını düşünmekteyiz.

Kursun düzenlenmesinde emeği geçen herkese, REDPROM çalışanlarına ve TMC yönetimine teşekkür ederiz.

Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

KURS SORUMLULARI

Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN
ADÜ REDPROM Müdürü

Prof. Dr. Candan ÇİÇEK
Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Başkanı

EĞİTMENLER

Abdulkerim KARAYNİR

Rümeysa Gülsu ÖZKAN

Hanife SALİH DOĞAN

Sahd ALİ

Mehmet AYTAR

Yunus DOĞAN

Melis YALÇIN

Zeynep ERDEM AYNUR



Zeynep ERDEM-AYNUR



Abdulkerim KARAYNİR



Hanife SALİH DOĞAN



Yunus DOĞAN



Sahd ALİ



Rümeysa Gülsu ÖZKAN

Melis YALÇIN



Mehmet AYTAR

I.BAKTERİYOFAJ KURSU AYDIN 20-23 MART 2023

UYGULAMALI KURS PROGRAMI

20 Mart		21 Mart		22 Mart		23 Mart	
09:00 09:30	Kayıt ve açılış	09:00 09:30	Tek plak izolasyonu ile fajların saflaştırılması	09:00 09:30	<i>Galleria mellonella</i> larvalarının hazırlanması	09:00 09:30	Sonuçların değerlendirilmesi (Larva, Titre, Konak aralığı)
09:30 10:30	Bakteriyofajlar (Bülent Bozdoğan sunum)	09:30 10:30	Optimal MOI belirleme Restriksiyon profili belirleme (RFLP)	09:30 10:30	<i>Galleria mellonella</i> enfeksiyonu ve faj tedavisi	09:30 10:30	<i>Galleria mellonella</i> (Sahd Ali sunum)
10:30 12:30	Faj kaynaklarının hazırlanması Agar spot-test ve ikili agar kaplama ile faj varlığının taranması	10:30 12:30	Optimal MOI belirleme Restriksiyon profili belirleme (RFLP)	10:30 12:30	Faj konak aralığının belirlenmesi	10:30 12:30	Sertifika dağıtımı ve Kapanış
12:30 13:30	Yemek arası	12:30 13:30	Yemek arası	12:30 13:30	Yemek arası		
13:30 14:30	Faj DNA izolasyonu	13:30 14:30	Restriksiyon profili belirleme (RFLP) (devam) Optimal MOI belirleme (devam)	13:30 14:30	Faj genom analizi (Hanife Salih Doğan uygulama+sunum)		
14:30 16:30	Faj izolasyonunda kullanılan besiyerleri ve solüsyonların hazırlanması	14:30 16:30	Faj Display (Yunus Doğan sunum)	14:30 16:30	Faj titrelerinin belirlenmesi		
16:30 17:30	Faj DNA izolasyonu (devam) Ertesi gün yapılacak deneyler için bakteri ekimi	16:30 17:30	Redüksiyon deneyi Ertesi gün yapılacak deneyler için bakteri ekimi	16:30 17:30	Optimal MOI ve Redüksiyon deney sonuçlarının Excel'de yorumlanması		

BAKTERİYOFAJ KURSU

TEORİK BÖLÜMÜ

Bakteriyofajlar

Terapötik Ajanlar Olarak Bakteriyofajlar

Antimikrobiyal Ajanlar Olarak Bakteriyofaj Kodlu Enzimler

Galleria mellonella as a model organism for antimicrobial drug testing

Faj Genom Analizi

Faj Gösterim Tekniği

Bakteriyofajlar

Bülent BOZDOĞAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve REDPROM Araştırma Merkezi
bbozdogan@gmail.com

Bakteriyofajlar dünya ekosisteminin önemli parçalarından birini oluşturmaktadır. Bakterilerin olduğu her yerde bakteriyofaj olduğu ve bu bakteriyofajların sayılarının bakterilerin en az 10 katı olduğu varsayılmaktadır. Biyosferdeki en yaygın organizmalar olan bakteriyofajların sayısının 10^{31} olduğu tahmin edilmektedir. Okyanuslarda her gün bakteriyofajların okyanustaki bakterilerin yarısına yakınına yakınını parçalayarak yaşam döngüsüne katkı sunmaktadırlar (Breitbart 2005, Clokie 2011, Keen 2016).

Bakteriyofajların Keşfi

Ganj nehri suları ile analiz yapan Ernest Hankin tarafından 1896 yılında ilk kez bakteriyofajların varlığı fark edilmiş ve “Yuma ve Ganj suyunun kolera mikrobuna bakteriyosidal etkisi” adlı bir makale yayınlamıştır (Hankin 1896). Ancak bakteriyofajların isim babası onları “bakteri yiyen” olarak gören Felix d’Herelle’dir. 1917’de “dizanteri basili antagonisti görünmez bir mikrop üzerine” başlıklı makalesini yayınlamıştır (d’Herelle 1917). Enfeksiyon hastalıklarının en önemli ölüm nedeni olduğu o yıllarda antibakteriyel bir ajanın keşfi ve özellikle d’Herelle’in çalışmalarıyla hem tedavide hem de koruyucu hekimlikte kullanılması enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede önemli bir ilerleme sağlamıştır. Ancak antibiyotiklerin keşfi ile faj çalışmaları sınırlı kalmıştır.

Bakteriyofajların Sınıflandırılması

İlk kez 1971’de Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV), fajları değişik karakterlerine göre sınıflandırmaya çalışmışlardır. Günümüzde Ackermann sınıflandırılması yaygın kullanılmaktadır. Bakteriyofajların %95’ten fazlası Caudovirales takımı olup kuyruklu ve çift zincirli DNA (dsDNA) yapısındadır. Caudoviralesler, Siphoviridae, Myoviridae ve Podoviridae olmak üzere 3 aileye ayrılmıştır. Bakteriyofajların %60’ının dahil olduğu uzun ve esnek kuyruklu Siphoviridae ailesi, %25’ni oluşturan çift katlı kısılabilir kuyruklu Myoviridae ailesi ve %15’ini oluşturan kalın ve kısa kuyruklu Podoviridae ailesi Caudovirales takımını oluşturur (Ackermann 2007).

Bakteriyofajların Yapıları ve Yaşam Döngüleri

Tipik bir faj, içerisinde genetik materyali bulundurduğu bir baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden meydana gelir. Baş kısmında nükleik asit moleküllerinin birleşerek yumak şeklini oluşturdukları yapı, protein kılıfıyla kaplı bir şekilde bulunur. Bakteriyofajlar genetik materyali içeren nükleik asit ve kapsiti oluşturan nükleokapsid ve DNA’nın bakteriye enjeksiyonunu ve tutunmayı sağlayan kuyruk bölümlerinden oluşur (Ackermann, 2007).

Bakteriyofajların litik veya lizojenik hayat döngüleri olabilmektedir. Litik hayat döngüsü; adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez ve lizis evrelerinden oluşmaktadır (Guttman 2005). Son aşama olan liziste ise olgunlaşan yeni fajlar konakçı bakteri hücrelerini parçalamakta ya da hücre zarında bulunan porlardan dışarı çıkmaktadır (Dowah 2018).

Lizojenik döngüde ise bakteriyofaj, bakteri hücresi içine girdikten sonra genetik materyalini bakteri DNA’sı ile entegre hale getirmekte ve “profaj” olarak hücre genomunda bulunmaktadır. Profajlar, konakçı bakterinin bölünmesi sırasında bakteri DNA’sı ile birlikte replike olmakta ve yeni bakteri hücrelerine aktarılmaktadır. Bakterinin içinde bulunduğu çevresel koşullar kötüleşmediği sürece bakteriyofaj etkisiz halde varlığını sürdürmektedir. Ancak bakterinin çevresel koşulları bozulduğunda,

örneğin besin kaynakları tükendiğinde, bakteri içindeki bakteriyofaj aktif hale gelip çoğalarak bakteriyi parçalamaktadır (Hobbs 2016).

Bakteriyofajların Uygulama Alanları

Nicastro ve arkadaşları fajların uygulama alanları beş başlık altında toplamışlardır (Nicastro 2016).

- 1) Moleküler biyolojide model sistem olarak kullanımları: Rekombinant DNA teknolojisinde vektör olarak kullanılarak bakterilerde istenilen genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır.
- 2) Faj tiplendirme için kullanımları: Bakteri tanımlanmasında ve patojen bakterilerin gıdalarda olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır.
- 3) Enfeksiyon tedavisinde kullanımları: Hayvan ve insanlarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak önerilmektedir. Birçok çalışmada *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholera* ve *Staphylococcus* enfeksiyonlarında fajların etkili olduğu belirlenmiştir.
- 4) Biyokoruyucu olarak kullanımları: Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı, gıda ekipmanların yüzey dekontaminasyonunda ve biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır.
- 5) Faj Gösterim (Faj Display) yönteminde kullanımları: Faj gösterimi, proteinleri kodlayan genetik bilgilerle proteinleri birbirine bağlamak için bakteriyofajları (bakterileri enfekte eden virüsler) kullanan, protein-protein, protein-peptit ve protein-DNA etkileşimlerinin incelenmesi için bir laboratuvar tekniğidir.

Enfeksiyon tedavisi

İkinci dünya savaşından beri enfeksiyon hastalıklarına karşı en önemli mücadele aracı olan antibiyotiklere direncin bakteriler arasında yaygınlaşması ve çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin rutin olarak izole edilebilir hale gelmesi önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmeye başlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direncini en önemli 10 sağlık sorunundan biri saymakta ve günümüzde ilaç direncine bağlı 700.000 olan ölümlerin 2050 yılında 10 milyona ulaşacağını öngörmektedir (WHO 2019). Yeni ve acil çözümler üzerine çalışmalar sürmektedir. Seçeneklerden birisi olarak da 20. yy başından beri kullanılan bakteriyofajların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmalarıdır. Henüz Avrupa ve ABD kurumları fajların tedavide kullanılabilirliğini onaylamamıştır, ancak deneyselde faj tedavisine izin verilmektedir.

Faj tedavisinin yaygın olarak enfeksiyon tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı henüz bilinmemekle birlikte, yanıklarda (Sybesma 2018), ishal vakalarında (Sarker 2017), hayvan ishallerinde (Gabisonia 2018), hastane enfeksiyonlarında (Kakasis 2019) kullanım denemeleri vardır. Antibiyotik direncinin kitlesel ölümlere yol açmasının uzak olmadığı günümüzde enfeksiyon tedavisine yönelik her alternatif geleceğimizi kontrol edebilmemize yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

- Ackermann H. W. 5500 Phages examined in the electron microscope. Archives of Virology 2007, 152(2), 227-243.
- Breitbart M. & Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends Microbiol. 2005 Jun;13(6):278-84.
- Clokie M. R., Millard A. D., Letarov A. V. & Heaphy S. Phages in nature. Bacteriophage. 2011;1(1):31-45.
- d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C R Acad Sci Paris 1917; 165:173-5.
- Dowah A. S. A., & Clokie M. R. J. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. Biophys Rev. 2018 Apr;10(2):535-542.

Gabisonia T, Loladze M, Chakhunashvili N, Katamadze T, Tamarashvili N, Nadiradze M & Alibegashvili M. New Bacteriophage Cocktail against Antibiotic Resistant Escherichia coli. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci 2018, 12(3).

Guttman B, Raya R & Kutter E. Basic phage biology. Bacteriophages: Biology and Applications 2005, 4.

Hankin EH. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. Ann Inst Pasteur (Paris) 1896; 10:511-23.

Hobbs Z. & Abedon S. T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. FEMS Microbiology Letters 2016, 363(7).

Kakasis A & Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. International Journal of Antimicrobial Agents 2019, 53(1), 16-21.

Keen E. C. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. Bioessays. 2015;37(1):6-9.

Nicastro J, Wong S, Khazaei Z, Lam P, Blay J & Slavcev R. A. Bacteriophage Applications Historical Perspective and Future Potential 2016, Springer International Publishing.

Sarker S. A, Berger B, Deng Y, Kieser S, Foata F, Moine D & Vuillet V. Oral application of E scherichia coli bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from B angladesh. Environmental Microbiology 2017, 19(1), 237-250.

Sybesma W, Rohde C, Bardy P, Pirnay J. P., Cooper I, Caplin J & McCallin S. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy—part II. Antibiotics 2018, 7(2), 35.

WHO 2019 <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.

Terapötik Ajanlar Olarak Bakteriyofajlar

Abdulkerim KARAYNİR

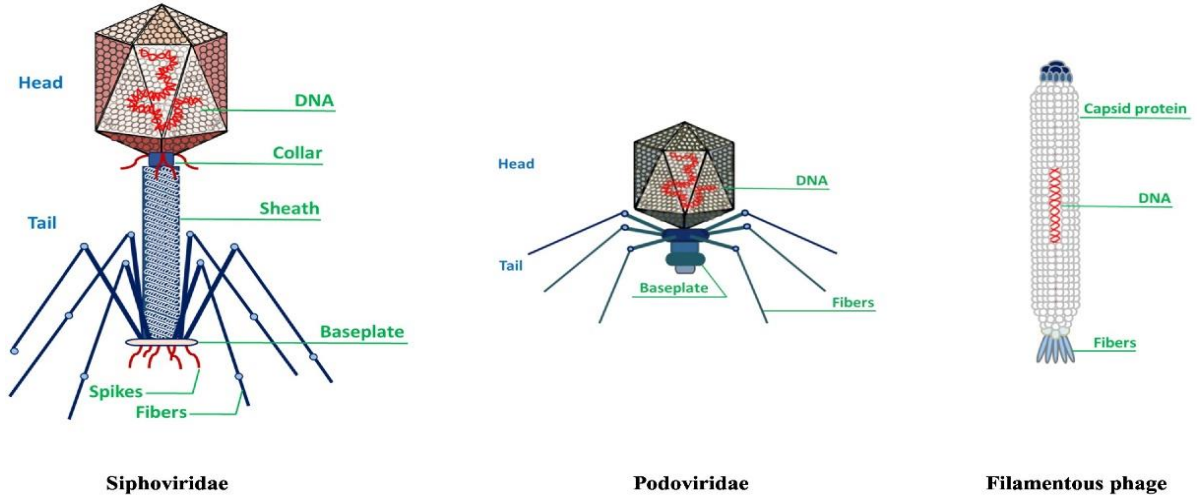
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

REDPROM Araştırma Merkezi

kerimkaraynir@gmail.com

Bakteriyofajların Genel Özellikleri

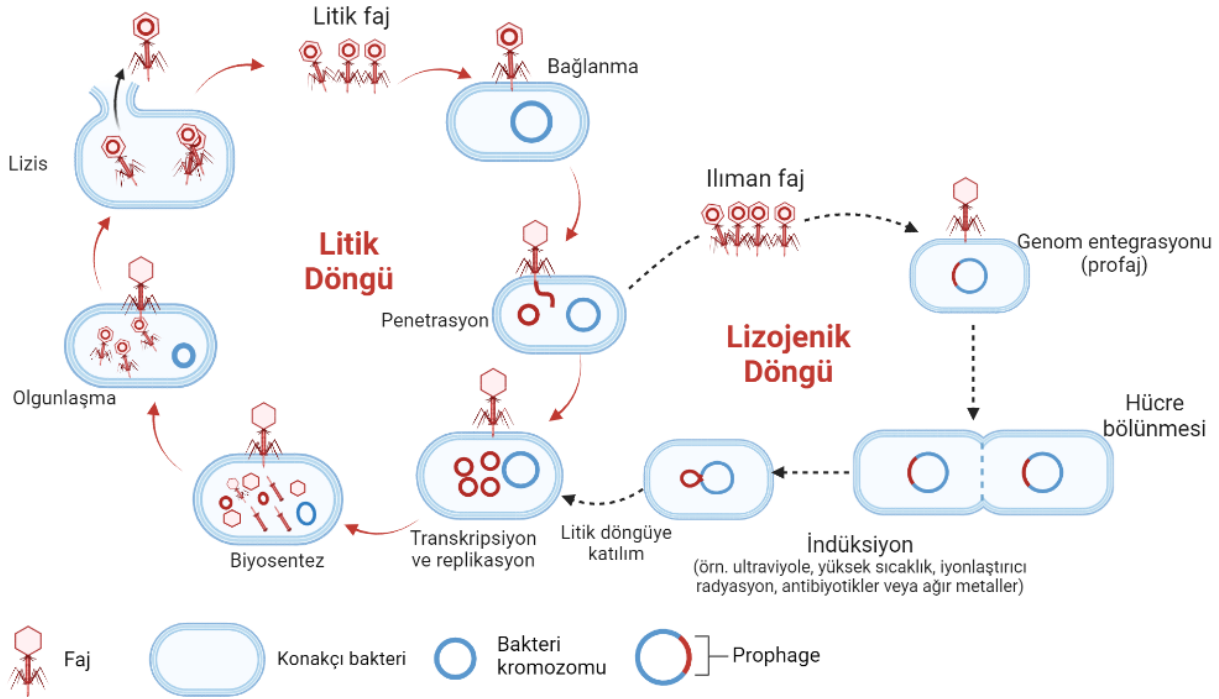
Doğada en çok bulunabilen biyolojik topluluklardan birini temsil eden bakteriyofajlar (fajlar), kendilerine özgü hedef bakteriyi enfekte edebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Fajlar doğada bakterilerle simbiyotik bir ilişki içerisinde olup toprak, su, hava, insan ve diğer hayvanların bağırsakları dahil olmak üzere bakteriyel konakçıların yaşadığı her ortamda yaygın olarak bulunurlar (Mao ve ark., 2019). Biyosferde yaklaşık 10^{30} – 10^{32} faj partikülü olduğu ve her 48 saatte bir dünyadaki bakterilerin yaklaşık yarısının fajlar tarafından yok edildiği tahmin edilmektedir (Gündoğdu ve Ulu-Kılıç, 2018) Fajların varlığı Ernest Hankin tarafından 1896 yılında ilk kez fark edilmiştir. 1913 yılında ise Frederick Twort tarafından “bakterileri enfekte ederek öldüren bir etmen” olarak tanımlanmış olsa da Felix d’Herelle, 1917’de “dizanteri basilinin görünmez bir mikrobunu” keşfederek bu mikroorganizmaları “bakteriyofaj” olarak adlandırmış ve bakteriyofajların antimikrobiyal etkisini dünyaya duyuran ilk kişi olmuştur (Haq ve ark., 2012). Morfolojiye ve nükleik aside (DNA/RNA dizisi veya türü) göre fajlar, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* ve Filamentöz fajlar (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi, ICTV) olarak sınıflandırılabilir. Şekil 1’de gösterildiği gibi, genellikle 20–200 nm uzunluğundaki tipik bir faj yapısında, içerisinde genetik materyali (DNA veya RNA) bulundurduğu bir baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden meydana gelir (Mao ve ark., 2019; Nobrega ve ark., 2018). Fajların çoğu çift sarmallı DNA (dsDNA) genomlarına sahipken, küçük bir kısmı tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarına sahiptir (Aiewsakun ve Simmonds., 2018; Mao ve ark., 2019).



Şekil 1. Bakteriyofaj yapısının çizimi (Mao ve ark., 2019)

Fajlar, DNA genomlarının bakteri genomuna entegre olup olmamasına bağlı olarak litik veya ılıman (lizojenik) fajlar olarak ayrılırlar (Bao ve ark., 2018; Mao ve ark., 2019). Litik fajlar için (Şekil 2), üreme döngüsünde adsorpsiyon, penetrasyon, transkripsiyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis dahil olmak üzere altı aşama yer alır ve bunlar genellikle enfekte konakçı bakterinin yok edilmesiyle sonuçlanır (Mao ve ark., 2019).

Buna karşılık, ılıman fajlar genellikle genomlarını konakçı bakteri kromozomuna entegre eder ve konakçı bakterinin üremesi sırasında faj DNA bilgisini sonraki bakteri soyuna iletir (Erez ve ark., 2017). İlıman fajların, bir stres faktörünün (örn. ultraviyole, yüksek sıcaklık, iyonlaştırıcı radyasyon, antibiyotikler veya ağır metaller) baskısı altında litik döngüye girmesi ve konakçı bakteriyi parçalaması muhtemeldir (Kim ve Bae., 2018; Mao ve ark., 2019).



Şekil 2. Litik ve lizojenik döngüde faj

Bakteriyofajın bakteriyi enfekte etmesi adsorpsiyon (bağlanma) basamağı ile başlamaktadır. Adsorpsiyon basamağı konakçı hücre duvarı ile kuyruklu fajlarda taban fibrillerinin ya da kuyuksuz fajlarda kapsomerlerin yüksek uyumu ile gerçekleşmektedir. Bakteriyofajın bakteriyeye özgünlüğünde adsorpsiyon basamağı önemli rol oynamaktadır. Bakteri yüzeyindeki pilus, teikoik asit, flagella, lipoprotein, protein ve lipopolisakarit molekülleri ve hücre duvarının bazı diğer bileşenleri bakteriyofaj adsorpsiyon bölgeleri olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, ortamın pH değeri, Mg^{+2} , Ca^{+2} gibi iyonların varlığı ile elektrostatik etkileşimler adsorpsiyon basamağını etkileyebilmektedir (Çelik ve ark., 2017).

Penetrasyon basamağında faj, DNA'sını enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla konakçı bakteri hücresinin içine aktarmaktadır. Zarar görmeden konakçı bakterinin hücre zarını geçen faj DNA'sı, periplazmik boşluk içinde bulunan nükleazlardan ve restriksiyon enzimlerinden korunmak için DNA'sını hızla daireselleştirir veya linear uçlarını korumaya alır.

Transkripsiyon aşamasında faj DNA'sı, konakçı bakterinin RNA polimerazına tanıtılmakta ve erken genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Erken genler ile faj genomu korunmakta ve konakçı bakteri, fajın çoğalabilmesine olanak sağlayacak şekilde yeniden yapılandırılmaktadır. İlerleyen aşamada, konakçı bakteride yeni faj DNA'larının sentezlenmesinde kullanılacak ürünleri kodlayan ara genlerin ve faj partiküllerinin şekillenmesi ile DNA'nın paketlenmesini sağlayan enzimleri kodlayan bir dizi geç genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Guttman ve ark., 2005).

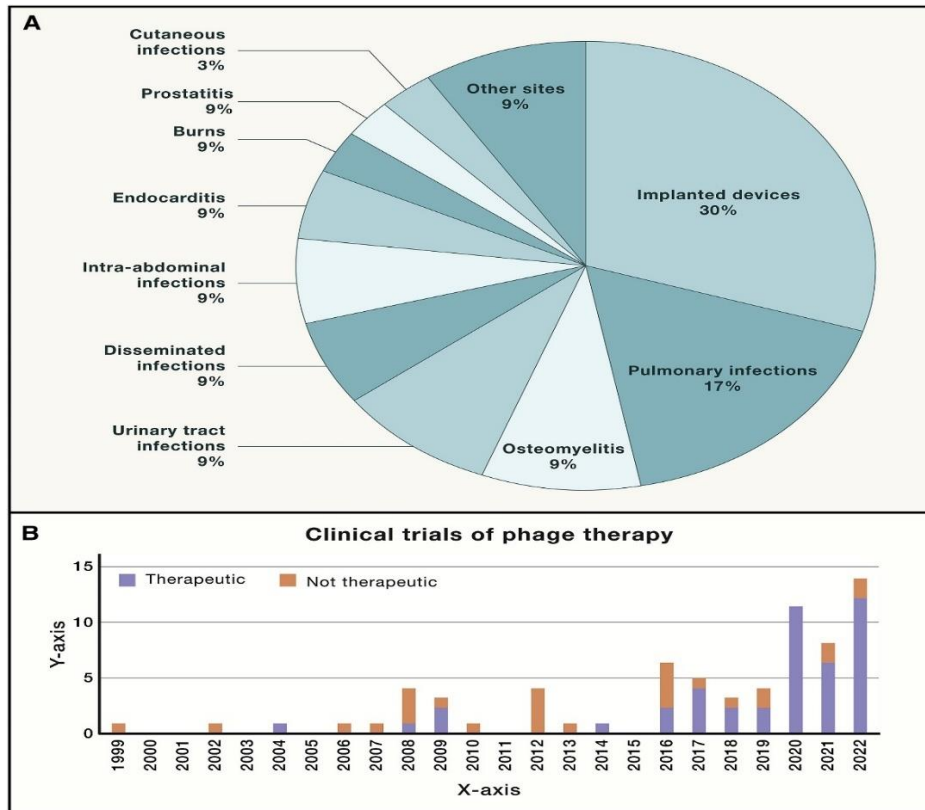
Morfogenez olarak adlandırılan biyosentez ve olgunlaşma basamaklarında ise faja ait partiküllerin (kapsit ve kuyruk gibi proteinler) biyosentezi gerçekleşmektedir. Konakçı bakteri sitoplazmasında

sentezlenen yeni faj parçaları bir araya gelmekte ve faj DNA'sının paketlenmesi ile yeni olgun fajların oluşumu tamamlanmaktadır.

Son aşama olan liziste ise olgunlaşan yeni fajlar konakçı bakteri hücrelerini parçalamakta ya da hücre zarında bulunan porlardan dışarı çıkarak enfeksiyon döngüsüne tekrar katılmaktadır.

Faj Terapi

Faj terapi, patojenik bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için fajların terapötik kullanımınıdır. 1920 ve 1940'lı yıllar arasında, 1944'te penisilinin ilk büyük ölçekli üretimine kadar, fajlar antimikrobiyal ajanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 1928'de Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi ve 1944'te penisilinin büyük ölçekli üretimi ile patojen bakterilere karşı antibiyotik çağı başlamıştır (Mao ve ark., 2019). Ancak, son yıllarda patojen bakterilerde artan antimikrobiyal direnç (AMR) küresel bir sağlık krizine dönüşmüştür. 2022'de, AMR'nin küresel sağlık etkisine ilişkin ilk kapsamlı değerlendirmesi, 2019'da 4,95 milyon ölümün AMR ile ilişkili olduğunu ve bunların 1,2 milyonunun doğrudan atfedilebileceği tahmin edilmektedir (Strathdee ve ark., 2023). AMR'nin yükselmesinin nedenleri arasında gıda endüstrisinde, hayvancılıkta ve tıpta yanlış ve aşırı antibiyotik kullanımı ve ayrıca ilaç şirketlerinin antibiyotik keşfi ve geliştirmeyi giderek devre dışı bırakmaları yer almaktadır. Ayrıca, bazı patojenler doğası gereği antibiyotiğe dirençlidir ve şu anda mevcut ajanlarla tedavi edilmesi zordur. Mevcut eğilimlerde büyük bir değişiklik olmazsa, 2050 yılına kadar en az 10 milyon insanın AMR'den öleceği tahmin ediliyor (Strathdee ve ark., 2023). Büyüyen AMR krizi karşısında, bilim insanları yeni alternatifler aramakta ve bu alternatifler arasında 100 yılı aşkın bir süre önce keşfedilen ve unutulmuş faj terapi tekrar gündeme gelmiştir. Bir asırdan fazladır devam eden faj avcılığı, klinik açıdan önemli bakteri türlerinin çoğu (ancak hepsi değil) için litik fajların başarılı bir şekilde toplanmasıyla sonuçlanmıştır. Artan erişilebilir veri tabanları ve iyi karakterize edilmiş faj bankaları sayesinde son birkaç yılda fajlar klinik tıpta daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle son 5 yılda yapılan çalışmalar fajların AMR ile mücadelede terapötik ajanlar olarak kullanılabilirliğini vurgulamaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Listelenen yıllara göre faj tedavisi raporları ve faj çalışmaları (Strathdee ve ark., 2023).

(A) 2000'den beri faj terapisi vaka raporları. 70 vakanın her birinde enfeksiyon bölgeleri tasvir edilmiştir. (B) 1999'dan beri ClinicalTrials.gov'a bildirilen faj tedavisine ilişkin klinik deney sayısı.

Faj Terapisinin Antibiyotiklere Göre Avantajları ve Dezavantajları

Litik fajlar antibakteriyel etkileri bakımından antibiyotiklere benzemektedir. Fakat terapötik amaçlı kullanılan fajların antibiyotiklere göre bazı avantajları/dezavantajları bulunabilmektedir (Tablo 1). Bunların içinde en önemlileri şu şekilde sıralanabilir; fajların genelde tür spesifik olmalarından kaynaklı dar spektrumlu olmaları (i), antibiyotik direncinden bağımsız olarak aktivite göstermeleri (ii), hedef bakteri ortadan kalkınca, oto-doza ile kendi üremelerini sınırlandırmaları (iii), biyofilm üzerine etkili olmaları (iv) ve fajın uygulanma biçiminden bağımsız olarak nerede ihtiyaç varsa oraya göç etmesi ve orada çoğalması (v) olarak sıralanabilir (Gündoğdu ve Ulu-Kılıç, 2018).

Tablo 1. Bakteriyofaj ve Antibiyotiklerin Karşılaştırılması

Bakteriyofajlar	Antibiyotikler	Yorum
Etki spektrumları oldukça dar ve spesifiktir.	Etki spektrumları geniştir.	Fajların yüksek spesifitelerinden dolayı, faj tedavisi öncesi bakterinin tanımlanması ve duyarlılığının test edilmesi gerektiği için dezavantaj olarak görülebilir. Fakat yine bu spesifite sayesinde disbiyoz ve sekonder enfeksiyon gelişme riski oldukça düşüktür. Antibiyotikler ise geniş spektrumlarından dolayı kullanım kolaylığı sağlar ancak disbiyoz ve devamında ciddi sekonder enfeksiyonlara yol açabilir.
Yeni faj izole etmek oldukça hızlı, basit ve düşük maliyetlidir.	Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi oldukça zahmetli, uzun ve pahalıdır.	Fajların etki mekanizmaları antibiyotik direncinden bağımsız olduğu için ve bakterilerle beraber fajlarda evrimleştiğinden (doğada bir bakteri varsa fajı da vardır ilkesi) çoklu dirence sahip bakterilere karşı yeni fajlar izole etmek kolaydır.
Şimdiye kadar bildirilmiş ciddi yan etkileri bulunmamaktadır. Fakat immün sistemi uyarabilirler.	Disbiyoza bağlı olarak; intestinal bozukluklar, alerjiler, sekonder enfeksiyonlar başta olmak üzere pek çok yan etkisi vardır.	Fajların yüksek spesifiteleri sayesinde mikrobiyal denge korunduğundan disbiyoza bağlı yan etki yoktur fakat fajlar tarafından parçalanmış hedef bakterilerden salınan endotoksinlere bağlı çok az yan etki bildirilmiştir.
Biyofilm yapılarına oldukça etkilidirler.	Antibiyotiklerin biyofilm yapılarına penetrasyonları zayıftır.	Fajlar biyofilmler içerisinde ilerleyebilir ve EPS üretimini yapan bakterileri öldürerek aşamalı olarak biyofilmi bozar. Ayrıca fajlar depolimeraz gibi enzimlerle de biyofilm yapısını bozabilir.
Faj tedavisi sonrası fajın aktivitesini düşüren etkenlere maruziyet (mide asidi, safra tuzları, antikorlar ya da fagositoz gibi) söz konusu olabilir.	Aktivite azaltıcı etkenlerden korumak için standardizasyonları oldukça iyi yapılmıştır.	Fajlara kıyasla antibiyotiklerde, bilgi birikimi oldukça fazla olduğundan iyi standardize edilmişlerdir. Bu durum faj terapinin dezavantajı olarak sayılabilir. Fakat fajların çeşitli maddelerle kapsülasyonu (lipozom gibi) sonrası aktivite azalmasının önüne geçilebilir.

Kaynaklar

- Bao, H. D., Pang, M. D., Olaniran, A., Zhang, X. H., Zhang, H., Zhou, Y., ... & Wang, R. (2018). Alterations in the diversity and composition of mice gut microbiota by lytic or temperate gut phage treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*, 10219-10230.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., ... & Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, *541*(7638), 488-493.
- Guttman B, Raya R & Kutter E. Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and Applications* 2005, 4, 30-63.
- Gündoğdu, A., & Ulu Kılıç, A., (2018). Bacteriophage Therapy: An Unforgetten Source of Cure. *KLİMİK JOURNAL*, vol.31, no.2, 78-87.
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology journal*, *9*(1), 1-8.
- Kim, M. S., & Bae, J. W. (2018). Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *The ISME Journal*, *12*(4), 1127-1141.
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J., Lavigne, R., ... & Brouns, S. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(12), 760-773.
- Sağlam A.G, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D & Otlı S. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World* 2017, *10*(12), 1481.
- Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018). Virus classification—where do you draw the line?. *Archives of virology*, *163*, 2037-2046.
- Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, *186*(1), 17-31.
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., ... & Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment international*, *129*, 488-496.

Antimikrobiyal Ajanlar Olarak Bakteriyofaj Kodlu Enzimler

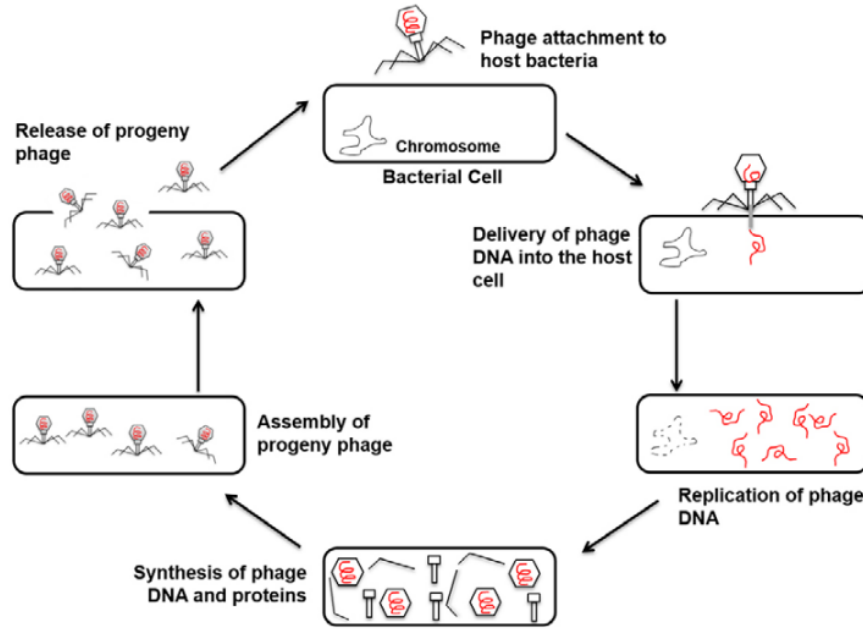
Rümeysa Gülsu ÖZKAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

REDPROM Araştırma Merkezi

gulsuozaann@gmail.com

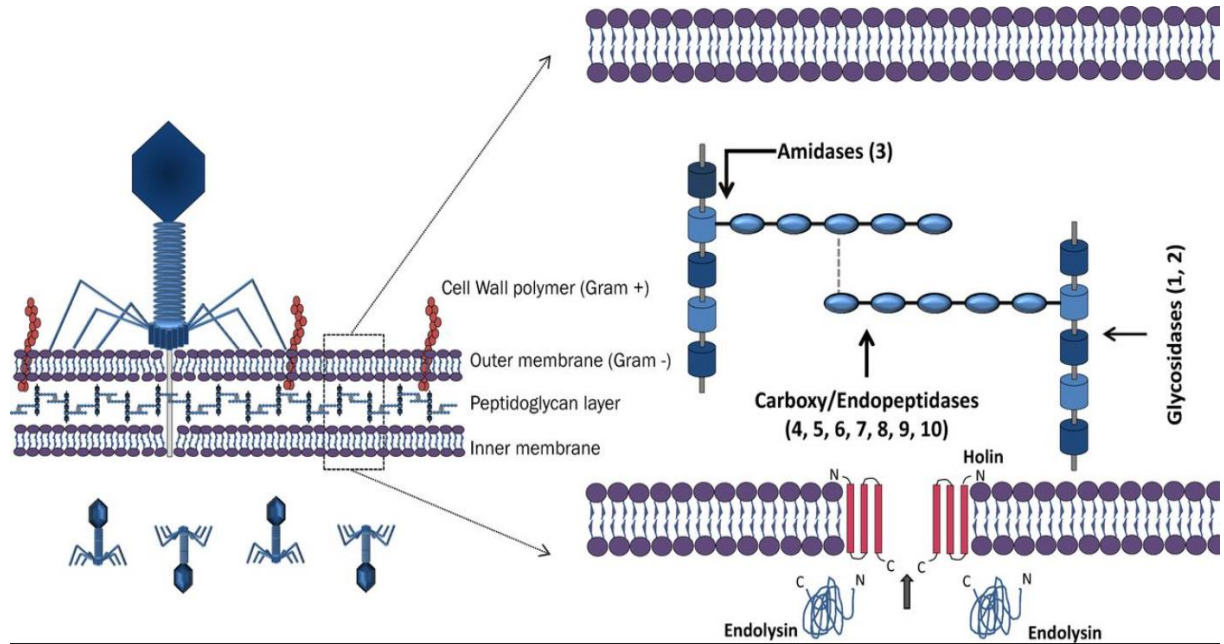
Bakteriyofaj enzimleri, faj lizinleri, fajların çoğu tarafından kodlanan ve fajın litik döngüsünün son aşamasında konakçı bakterinin peptidoglikan tabakasının parçalanmasına neden olarak yeni soy viryonlarının salınmasına neden olan enzimler ya da peptidoglikan hidrolazlar olarak tanımlanabilmektedir (Şekil 1). Bakteri hücresinin ana yapısal bileşeni olan peptidoglikan, peptidlerle çapraz bağlanmış glikan şeritlerinden oluşan bir heteropolimerdir. Dolayısıyla bu yapının bozulması ve parçalanması bakterinin ölümüne sebep olur. Lizis aşamasında bu faj kodlu enzimler konakçı sitoplazmasında birikir ve sonrasında sitoplazmik zarı geçerek osmotik dengeyi ve bakterinin yapısal bütünlüğünü bozar. Fajların bu eşsiz özelliği sayesinde ölümcül enfeksiyonlara sebep olan patojen bakterilerle mücadelede fajlar kadar faj enzimleri de potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak son yapılan çalışmalarda ön plana çıkmaktadır. Şu an literatürdeki birçok çalışma, bu enzimlerin tıp, biyoteknoloji, tarım ve gıda güvenliğinin farklı alanlarındaki potansiyel uygulamalarına odaklanmıştır (Ajuebor ve ark. 2016; Schmelcher ve Loessner, 2016).



Şekil 1. Bakteriyofaj Replikasyon Döngüsü (Virüent Faj) (Ajuebor ve ark. 2016)

Genel olarak faj endolizin yapısı bir enzimatik olarak aktif domain (EAD) ve bir hücre duvarı bağlayıcı domain (CWBD) içermektedir. EAD'ler gerçek enzimi temsil ederek hücre duvarı yıkımını katalizler ve peptidoglikandaki bölünme bölgelerine göre muramidazlar, glukozaminidazlar, litik transglukosilazlar, amidazlar ve endopeptidazlar olarak sınıflandırılabilirler. C-terminalindeki CWBD'ler ise, spesifik bağlanmadan sorumlu olup hücre duvarıyla ilişkili ligand moleküllerini yüksek özgüllükte tanıyarak enzimleri substratlarına yönlendirirler. Endolizinlerin içerdiği bu özgüllük, onların uygulama açısından en yararlı özelliklerinden biridir, çünkü istenmeyen patojenleri doğrudan hedeflememize izin verirken, uygulama alanındaki doğal florayı etkilemezler. Genel olarak endolizinler holin-endolizin sistemi

kullanarak etki gösterirler (Şekil 2). Bu sistemin bazı istisnalar dışında neredeyse tüm dsDNA fajlarında evrensel olduğu düşünülmektedir (Grabowski ve ark., 2021).



Şekil 2. Faj endolizininin en yaygın holin-endolisin litik sistemi aracılığıyla peptidoglikana nasıl eriştiklerinin şematik gösterimi (Oliveira ve ark., 2013)

Bu sistemde endoliziner sitoplazmik boşlukta birikir ve daha sonra, holin adı verilen küçük bir hidrofobik protein, genetik olarak önceden belirlenmiş bir zamanda eksprese edilir. Holinler membranda homo-oligomerik gözenekler açarak peptidoglikan tabakaya endolizinin ulaşmasını sağlar. Peptidoglikan tabakada yer alan ve hücre bütünlüğünü sağlayan peptitlerin zarar görmesiyle sonuçlanan bu olay bakteri ölümünü beraberinde getirir. Endoliziner her ne kadar ortak işlevlere sahip olsalar da yapı ve etki mekanizmaları açısından çeşitlilik gösterirler. Bununla birlikte, protein alanlarındaki yapısal farklılıklar, bu enzimlerin özgülüğünü sağlar. Genel olarak endoliziner bakteri hücre duvarı ile yani substrat ile seçici olarak etkileşime girerler. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler arasındaki hücre duvarının yapısındaki farklılıklar nedeniyle, bu ana bakteri gruplarını hedef alan faj endolizininin yapıları da farklıdır. Gram negatif bakterilerde, peptidoglikan tabakası ince olup periplazmik boşlukta bulunur. Ayrıca Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında mevcut olan yüzey karbonhidratlarından veya proteinlerinden yoksundur. Bir diğer yandan Gram-negatif bakterilerin aksine, Gram-pozitif bakteriler bir dış zar tarafından korunmaz, bunun yerine yüzey proteinlerinin, karbonhidratların ve teikoik asitlerin bağlandığı çok katmanlı bir peptidoglikana sahiptir. Bu nedenle, Gram-pozitif faj endolizineri, C-terminalinde hücre duvarı bağlama alanına N-terminalinde katalitik bir alana sahip olup modüler yapıdadır (Fischetti ve ark., 2000)

Tablo 1. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterileri enfekte eden fajların seçilmiş endolizineri (Grabowski ve ark., 2021).

Bakteriyal Grup	Konak Türü	Bakteriyofaj	Endolizin	Kaynak
Gram-negatif	<i>Thermus scotoductus</i>	vB_Tsc2632	Ts2631	Plotka et al. (2019)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	vB_AbaP_D2	Abtn-4	Yuan et al. (2020)
	<i>Salmonella enterica ser. Enteritidis</i>	LPSE1	LysSE24	Ding et al. (2020); Huang et al. (2018)
	<i>Escherichia coli</i>	vB_EcoM-ECP26	LysECP26	Park and Park (2020)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JD010	LysPA26	Guo et al. (2017)
Gram-pozitif	<i>Bacillus cereus</i>	PBC2	LysPBC2	Kong et al. (2019)
	<i>Paenibacillus larvae</i>	philBB_PI23	PlyPI23	Santos et al. (2019)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	SAP8	LysSAP8	Yu et al. (2019)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	EF-P10	LysEF-P10	Cheng et al. (2017)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MS1	MSlys	Silva et al. (2020)

Bu holin-endolizin sisteminin yanı sıra genellikle kısa kuyruğa sahip bir virüs ailesi olan *Podoviridae* ailesindeki fajlar depolimeraz adı verilen enzimlere sahiptir. Depolimerazlar, birçok bakterinin konağa tutunmasında etkili olan biyofilm oluşturma kabiliyetine karşı bu biyofilm yapısının bozulmasından sorumludur. Biyofilm bir bakterinin konak hücreye adsorpsiyonu için oluşturduğu hücre dışı polisakkarit (EPS) olarak tanımlanabilir. Bu hücre dışı polimerik madde matriksinin yapısını; polisakkaritler, proteinler, glikolipidler ve hücre dışı DNA (extracellular DNA, eDNA) oluşturmaktadır. Faj kodlu depolimerazlar ise konak bakterinin kapsül polisakkaritlerine (CPS), ekzopolisakkaritlerine (EPS) veya lipopolisakaritine (LPS) spesifik bağlanmanın ardından bu biyofilm yapısını parçalar ve hücre duvarına ulaşarak fajın bakteriyi enfekte etmesini sağlar. Fajların bu işlevi özellikle Gram negatif ve kapsüllü patojen bakterilerle mücadelede önemli bir rol oynar (Knecht ve ark., 2020)

Antibiyotiklere karşı hızla gelişen bakteriyel direncin ışığında, direnç gelişimini indirgeyecek ve bu dirence dirençle cevap verecek yeni antimikrobiallere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Öne çıkan bir örnek olarak, metisiline dirençli *S. aureus*'un (MRSA) prevalansı son on yılda önemli ölçüde artmış ve bir zamanlar birincil olarak nozokomiyal bir patojenken toplum kökenli enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biri haline gelmiştir. Geniş kapsamlı antibiyotiklerin (ör. penisilin ve tetrasiklin) aşırı kullanımı, yalnızca hedef patojen üzerinde değil aynı zamanda kommensal organizmalar üzerinde de seçici baskı uygulayarak bakteri topluluğu içindeki direnç genlerinin dağılımını hızlandırmaktadır. Bu bağlamda, çoğu endolizinin cins veya türe özgü olması, klasik geniş kapsamlı antibiyotiklere göre önemli bir avantaj sunmaktadır. Ayrıca, birçok çalışma bakteriyofajların ve konakçılarının birlikte evriminin, endolizinerin hücre duvarındaki yüksek oranda korunan ve yüksek oranda değişmez

hedeflere bağlanmasına ve onları parçalamasına yol açtığını vurgulamaktadır. Bu durum muhtemel direnç oluşumunu nadir bir olay haline getirerek fajın hayatta kalmasını sağlamaktadır. Hedef konakçının hücre duvarı birçok klasik direnç mekanizması içerir ve hücre içinde hareket eden antimikrobialları hedef alır ancak dışarıdan uygulandığında endolizine karşı olası bir direnç mekanizması geliştirme olasılığı düşüktür. Hücre içi direnç mekanizmalarının örnekleri arasında, zar geçirgenliğinin azaltılması, bileşiklerin hücreden aktif akışı ve antimikrobialların sitoplazmik enzimler tarafından etkisizleştirilmesi yer alır (Schmelcher ve ark., 2021). Ancak endoliziner hücre duvarına spesifik bağlanarak iş gördükleri için bu direnç mekanizmalarından etkilenmezler. Endolizinerin ölümcül enfeksiyonlara sebep olan bakteriyal patojenlere karşı etkinliğinin değerlendirilen çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak endolizinerin tıbbi olarak uygulanmadan önce uygun şekilde saflaştırılması ve *in-vivo/in-vitro* deneylerle test edilmesi önemlidir. Bu bağlamda hayvan modelleri, endolizinerin etkinliği üzerine yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanımları, fizyolojik koşullar altında antimikrobiyal potansiyelin değerlendirilmesine izin verir. Örnek olarak, *Acinetobacter baumannii*'nin neden olduğu sepsis tedavisinde Ply6A3 endolizinin etkinliği bir fare modelinde test edilmiştir. Bu endolizinin intraperitoneal aşılması, enfekte hayvanların %70'inin hayatta kalmasını sağlamış ve endolizin uygulamasının herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir (Wu ve ark., 2019). *A. baumannii*'nin tedavisinde bir fare modelinde test edilen başka bir lizin LysSAP26'dır. Bu enzimin kullanımı, kullanılan doza bağlı olarak enfekte farelerin %20-60'ının hayatta kalmasıyla sonuçlanmıştır. Ek olarak, doz artırıldıktan sonra bile sitotoksik etki gözlenmemiştir (Kim ve ark., 2020). Bunların yanı sıra enfeksiyon tedavisinde mevcut antibiyotiklerle kombine şekilde endolizin uygulanması umut vadeden sonuçlar ortaya koymuştur. Hayvan deneylerinin yanı sıra *in-vivo* ve *in-vitro* etkinliği değerlendirilmiş birkaç endolizin çeşitli hasta gruplarında klinik denemelere başlamıştır. Bunlardan biri yakın zamanda Faz II klinik çalışması gerçekleştirilen *Staphylococcus aureus*'a etkili lizin CF-301'dir. Kan dolaşım enfeksiyonlarından (BSI) muzdarip bir grup hastada standart antibiyotik tedavisine ek olarak CF301 takviyesi yapıldıktan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Tek başına antibiyotik tedavisi uygulanan hastalara kıyasla kombine tedavi alan hastalar %70 oranında anlamlı bir yanıt göstermiştir. Bu çalışmalar endolizinerin antibiyotiğe dirençli bakterilerle sistemik enfeksiyonların tedavisi için yüksek kullanım potansiyelinin altını çizmektedir (Fowler ve ark., 2020).

Tablo 2. Antimikrobiyal olarak litik bakteriyofajların ve faj enzimlerinin başlıca özellikleri (Maciejewska ve ark., 2018)

Özellikler	Bakteriyofaj	Bakteriyofaj Enzimleri
Spesifite ve Konak Aralığı	Bakteriyel konakta yayılma (yırtıcı-av ilişkisi); dar konakçu aralığı, çoğunlukla bir bakteri türüne özel	Hedeflenen makromolekülün kimyasal bileşim yaygınlığına bağlı olarak dar veya geniş
Etki Şekli	Bakteriyolitik; faj titresine bağlı öldürme; virülans etkinliği: enfeksiyonun çokluğu (MOI), patlama boyutu, yayılma hızı; büyüyen hücreler üzerinde etkili	Bakteriyolitik (lizinler) veya antivirulent (depolimerazlar); konsantrasyona bağlı aktivite; minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC); büyüyen ve büyümeyen hücreler üzerinde etkili
Biyofilm Eradike Yeteneği	Nispeten etkili; virion ile ilişkili depolimerazlar tarafından geliştirilmiş	Depolimerazlar tarafından biyofilm matrisi bozulması ve lizinler tarafından yok edilmesi

	biyofilm matrisi içindeki faj penetrasyonu	
Genetiği değiştirilmiş ürünler dahil olmak üzere ürün modifikasyonu	Yeni fajların çevresel kaynaklardan hızlı ve kolay izolasyonu; doğal olarak gelişen fajların izolasyonu; tasarlanmış fajlar (tedavi için onaylanmamış genetiği değiştirilmiş mikroorganizma)	Protein veri tabanları araştırması ile in silico geliştirme; açıklamalı faj genomlarının analizi; tasarlanmış proteinler (tedavi için onaylanmıştır)
Normal Flora Üzerine Etkisi	Hedeflenen suşun yük azalması; mikrobiyom bileşiminin düzenlenmesi	Hedeflenen suşun yük azaltma/virulans azalması; mikrobiyom bileşiminin düzenlenmesi
Bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi	Retiküloendotelial sistem (RES) klirensi ve bağışıklık hücrel savunma mekanizmaları; immünojenik (antikor üretiminin indüksiyonu)	İmmünojenik (antikor üretiminin indüksiyonu)
Güvenlik	Olası endotoksin (LPS) ve diğer toksinler hücre parçalanması sırasında salınır	Olası endotoksin (LPS) ve diğer toksinler hücre parçalanması sırasında salınır
Ürün hazırlama (saflık, konsantrasyon, farklı sıcaklıklarda stabilite ve pH)	Yapısal protein bileşimine bağlı olarak farklı stabilite özellikleri; yoğunlaştırma ve saflaştırmada sınırlama; büyük ölçekli yöntemler benimsenmeli	Nispeten kararlı, özellikle lizinler; rekombinant protein ekspresyonu iyi gelişmiş ve büyük ölçekli yöntemler benimsenmeli
Formülasyonlar ve dağıtım yolu	Lokal uygulama için sıvı faj filtratı, enjeksiyonlar, aerosoller, tabletler, formüller. Parenteral yol; sözlü olarak; yerel (topikal enfeksiyonlar)	Enjeksiyonlar, aerosoller, yerel uygulama için formüller; parenteral yol; proteoliz ile sınırlı oral uygulama; yerel (topikal enfeksiyonlar)
Kombine tedavi	Faj kokteyli (3-5) veya faj-protein; antibiyotik-faj-protein kombinasyonu; direnç gelişiminin önlenmesi; genişletilmiş aktivite spektrumu; sinerjik etki mümkün	Protein-proteinin kombine tedavisi; faj-protein; antibiyotik-protein; antibiyotik-faj-protein; direnç gelişiminin önlenmesi; genişletilmiş aktivite spektrumu; sinerjik etki mümkün

Kaynaklar

- Ajuebor, J., McAuliffe, O., O'Mahony, J., Ross, R. P., Hill, C., & Coffey, A. (2016). Bacteriophage endolysins and their applications. *Science progress*, 99(2), 183-199.
- Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., & Rood, J. J. (2000). *Gram-positive pathogens*. ASM Press, American Society for Microbiology.
- Fowler, V. G., Das, A. F., Lipka-Diamond, J., Schuch, R., Pomerantz, R., Jáuregui-Peredo, L., ... & Cassino, C. (2020). Exebacase for patients with Staphylococcus aureus bloodstream infection and endocarditis. *The Journal of clinical investigation*, 130(7), 3750-3760.
- Grabowski, Ł., Łeppek, K., Stasiłojć, M., Kosznik-Kwaśnicka, K., Zdrojewska, K., Maciąg-Dorszyńska, M., ... & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents. *Microbiological Research*, 248, 126746.
- Grabowski, Ł., Łeppek, K., Stasiłojć, M., Kosznik-Kwaśnicka, K., Zdrojewska, K., Maciąg-Dorszyńska, M., ... & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents. *Microbiological Research*, 248, 126746.
- Kim, S., Jin, J. S., Choi, Y. J., & Kim, J. (2020). LysSAP26, a new recombinant phage endolysin with a broad spectrum antibacterial activity. *Viruses*, 12(11), 1340.
- Knecht, L. E., Veljkovic, M., & Fieseler, L. (2020). Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Frontiers in microbiology*, 10, 2949.
- Maciejewska, B., Olszak, T., & Drulis-Kawa, Z. (2018). Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 2563-2581.
- Oliveira, H., Melo, L. D., Santos, S. B., Nóbrega, F. L., Ferreira, E. C., Cerca, N., ... & Kluskens, L. D. (2013). Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of virology*, 87(8), 4558-4570.
- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current opinion in biotechnology*, 37, 76-87.
- Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future microbiology*, 7(10), 1147-1171.
- Wu, M., Hu, K., Xie, Y., Liu, Y., Mu, D., Guo, H., ... & Shi, Y. (2019). A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against Acinetobacter baumannii. *Frontiers in microbiology*, 9, 3302.

Galleria mellonella as a model organism for antimicrobial drug testing

Sahd ALI

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
REDPROM Araştırma Merkezi
sahdali24@gmail.com

A model organism (model) is a non-human species that is extensively studied to understand biological phenomena. Model organisms are widely used to research human disease when human experimentation would be unfeasible or unethical. One of the most used models for studying microbial infections is the murine model. However, there are ethical, budgetary, and logistical hurdles associated with the use of rodents as infection models. More recently, *Galleria mellonella* (greater wax moth or honeycomb moth) has been introduced as an alternative model to study the molecular basis of virulence and for testing antimicrobial drugs. In April's issue of *Virulence*, Tsai et al. (2016), reviewed the extensive body of literature which reports the value of *Galleria mellonella* larvae as a model for investigating bacterial pathogens (Tsai et al., 2016). *G. mellonella* is an insect from the order Lepidoptera and the family Pyralidae (snout moths). It is the caterpillar larvae and not the adult moth that is used as an animal model.



Figure 1. Different developmental stages of *Galleria mellonella*. Eggs (1), approximately 10-day-old caterpillar (2), approximately 20-day-old caterpillar (3), 25-35-day-old caterpillar (4 and 5), approximately 40-day-old caterpillar (last larval stage) (6), pre-pupae and pupae (7 and 8), adult moths (9).

When compared with the traditional mammalian model hosts, *G. mellonella* larvae are cheaper to establish and easier to maintain, as they don't require special lab equipment (Ramarao et al., 2012). Additionally, the use of *G. mellonella* does not require ethical approval (3R policy) and their short life span makes them ideal for high-throughput studies. Several aspects of the *G. mellonella* larva support its application for in-vivo experiments:

- A shorter life cycle of 40–60 days; and the larvae can be kept at 37°C. This is equal to the body temperature of mammals and suitable to test several bacterial pathogens.
- The larva is relatively large (12–20 mm) which allows easy handling and inoculation of precisely quantified substances directly in the hemocoel.
- The larval innate immune system shares similarities with that of mammals. As a result, experiments with the insect can, to some extent, replace experiments with vertebrates.

- Allow faster screening of varied compounds with antimicrobial activity before testing in vertebrates.
- The larvae can be reared in the laboratory in small containers, provided with natural airflow, without the need for major adaptations in the laboratory structure.

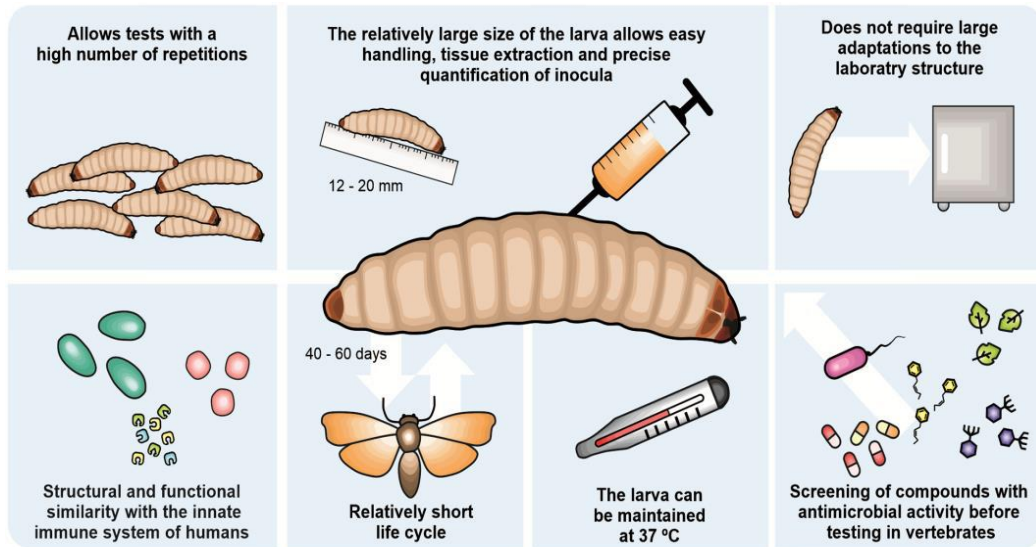


Figure 2. Advantages offered by the *G. mellonella* as an alternative infection model to study bacterial pathogens (Pereira et al., 2020)

The immune system of *G. mellonella* and the success of the model

A primary reason for the success of the *G. mellonella* model in microbial virulence studies is that its immune system shares a high degree of structural and functional similarity with that of the innate immune system of vertebrates. The immune response of *G. mellonella* consists of two tightly interconnected components: cellular (cell-mediated) and humoral responses (Browne et al., 2013). The cellular response is mediated by hemocytes, cells analogous to human phagocytes which are involved with phagocytosis, encapsulation, and nodulation of the invading agents.

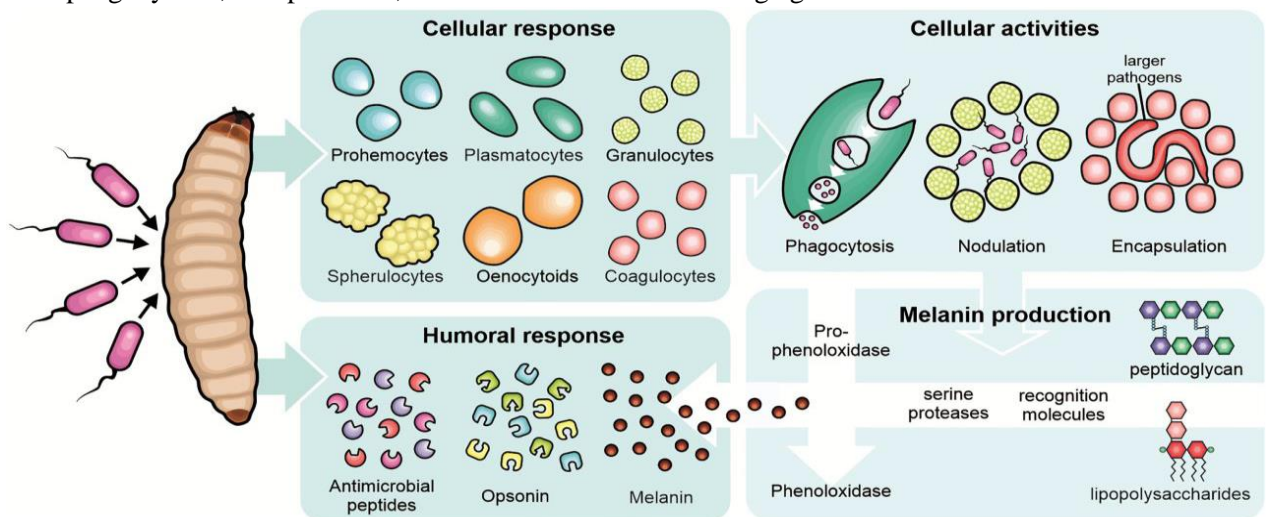


Figure 3. Schematic representation of *G. mellonella* immune response. Hemocyte activity links cellular and humoral responses (Pereira et al., 2020).

To date, six types of hemocytes have been identified in *G. mellonella*: prohemocytes, plasmatocytes, granular cells, coagulocytes, spherocytes, and oenocytoids. Plasmatocytes and granular cells are the most abundant hemocytes in the hemolymph. Hemocytes are found free in the hemolymph or attached to internal organs, such as the digestive tract, fat body, and heart surface of the insect. The concentration of hemocytes in the hemolymph varies during the life of the insect and in response to pathogens (Browne et al., 2013).

The humoral response involves soluble effects or molecules such as antimicrobial peptides (AMPs), complement-like proteins (opsonin), melanin, and products of proteolytic cascades, which immobilize or kill pathogens. So far, 18 known or putative AMPs have been identified, some of which are like molecules characterized in mammals. The melanization process is essential for the defense of *G. mellonella* against microbial pathogens and results in the synthesis and deposition of melanin around the microbe in the hemolymph (Kavanagh and Reeves, 2004). Melanin production is catalyzed by the enzyme phenol oxidase (PO), which is produced as an inactive zymogen pro-phenol oxidase (pro-PO) in hemocytes. The PO catalyzes the oxidation of phenols to quinones, which spontaneously polymerize to form melanin around invading pathogens. Although innate immune responses are non-specific, they are the first line of defense against invading pathogens, which are widely distributed throughout the body to maintain homeostasis and prevent infections (Sheehan et al., 2018). The lack of adaptive immunity in *G. mellonella* and other insects can be seen as an advantage for research purposes since the model allows the study of host-pathogen interactions and related innate immunity mechanisms without the interference of adaptive responses. Therefore, the *G. mellonella* model can substitute for more complex vertebrate models, depending on the objective of the study. *G. mellonella* can be an intermediate model between *in vitro* and vertebrate *in vivo* studies.

Using *G. mellonella* to investigate the virulence of bacterial pathogens.

The potential of a bacterium to cause disease is related to its repertoire of virulence factors. Bacteria species and strains have different sets of virulence genes, and these can be subjected to regulation, which makes virulence even more diverse. *G. mellonella* has been extensively used to study bacterial virulence, which can be evaluated in several ways after inoculation with a pathogenic microorganism:

- Observing the density and morphology of hemocytes
- Analyzing the expression of enzymes and AMPs
- Histopathological effects

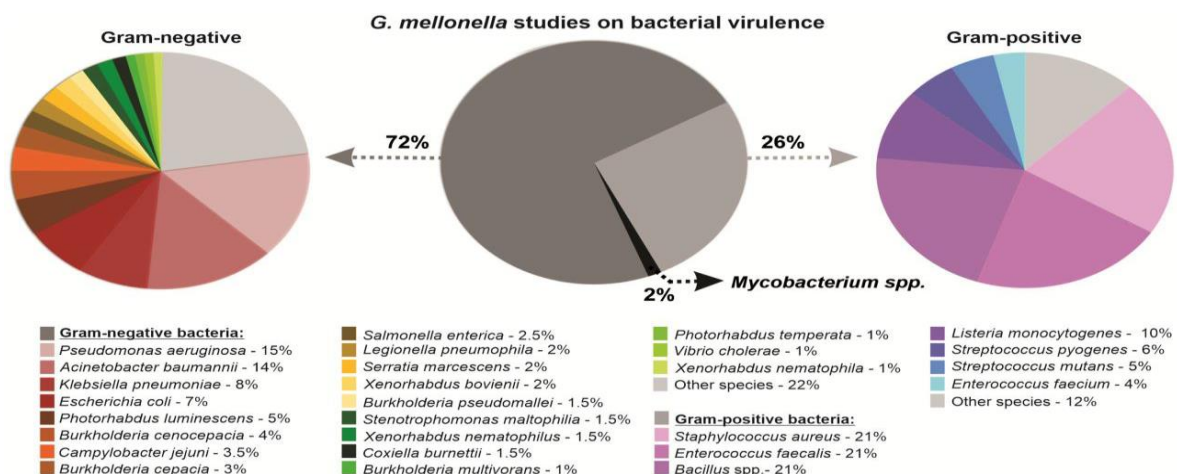


Figure 4. Use of *G. mellonella* model to study bacterial virulence. The data was obtained in July 2022 at PubMed (MEDLINE database).

***G. mellonella* as a model to study the virus and fungal pathogens.**

As well as a model for studying bacterial pathogens, there are a few reports of the use of *G. mellonella* to investigate viral and fungal diseases. The *Galleria* model has not, so far, been shown to be suitable for research into viral pathogens of mammals. This may be because insect cells are incubated at 25-30°C which may not support the growth of mammalian viruses. In addition, viruses often show tropism toward cells bearing specific receptors that may not be shared by mammalian and insect cell lines. The first study of the fungal pathogen using *G. mellonella* was in the yeast *Candida albicans*, where the larval susceptibility to the fungal challenge was used to distinguish between pathogenic and non-pathogenic *C. albicans* strains (Brennan et al., 2002). Several studies using *G. mellonella* have shown some great similarities to the results obtained using the mammalian models. For example, In the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*, deletion mutants of *cpcA*, *sidA*, *sidF*, and *pabA* were avirulent in *G. mellonella* while the deletion mutants of *sidC* and *sidD* demonstrated attenuated virulence. These results were in comparison with the data derived from the assessments made in mammalian models such as mice (Slater et al., 2011). As well as studying virulence in *C. albicans*, the larvae have been used as a model to study tissue invasion capabilities between biofilm-producing and non-producing isolates.

Determining the efficacy of antimicrobial therapies using *G. mellonella*

Treating infections caused by MDR bacteria is a major public health challenge worldwide. The Gram-negative bacteria *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *Neisseria gonorrhoeae*, and the Gram-positive *S. aureus* and *Enterococcus* spp. have all been identified as critical pathogens with particularly high rates of resistance to antibiotics. Evaluating the efficacy of antimicrobials using *G. mellonella* has been extensively used.

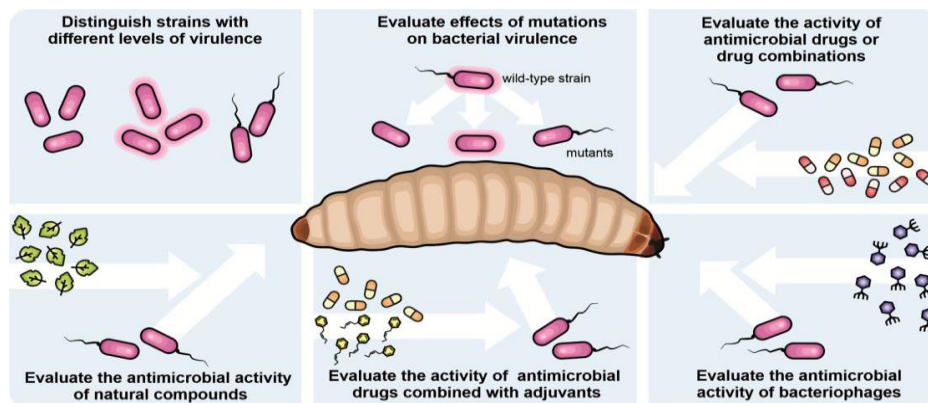


Figure 5. Applications of the *G. mellonella* model to study bacterial pathogens and antimicrobial agents.

Combination therapies are often recommended to treat infections caused by *K. pneumoniae*-producing carbapenemase (KPC), due to limited treatment options. Using *G. mellonella*, Nath *et al.* (2018) observed that the combination of ceftazidime/avibactam with carbapenem should be considered in the treatment of serious infections caused by KPC. Different phages or phage cocktails have been used in treatments, with single or multiple doses to successfully treat *G. mellonella* infected with *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. The study conducted by Manohar et al. (2018) showed that larvae infected with *E. coli* and *E. cloacae* had to be treated with

three phage doses at a 6-hour interval to achieve a 100% survival rate. However, in the case of *K. pneumoniae*, a single phage dose treatment was sufficient.

Phage therapy can also be a great strategy for the treatment of bacterial infections associated with biofilms. Tkhilaishvili et al. (2020) evaluated the ability of two commercially available *Staphylococcal* bacteriophages to disrupt biofilms, control biofilm formation, and control the development of an infection caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). In the face of a systemic infection, both phages increased the survival of *G. mellonella*, either by preventing or treating the infection. Some advantages offered by *G. mellonella* in the study of new antimicrobial strategies include:

- Able to precisely inject the inoculum directly into the hemocoel, ensuring precise concentrations of the compounds tested.
- The relatively large size of the larvae allows more than one inoculation to be carried out without major physical trauma.
- It also facilitates the screening of different sets of drugs. By this, a precise number of compounds that need to be evaluated can be tested with vertebrates.

The use of *G. mellonella* to evaluate new antimicrobial strategies is undoubtedly very important for the rapid identification of novel compounds, and new therapeutic strategies. However, there are considerations required when carrying out such experiments in *G. mellonella*. The tests must be carried out with bacterial doses that do not kill the larva quickly, and the toxicity of the compound used must also be tested. Experiments must be organized and precisely timed so that there are no variations in treatment times, especially in experiments with many treatments. Much attention should also be paid to the inoculation site; to avoid further trauma, it is suggested to alternate the inoculation sides.

References

- Borghi E, Romagnoli S, Fuchs B. B, Cirasola D, Perdoni F, Brennan M, Thomas D. Y, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34(2):153-7.
- Brennan, M., Thomas, D. Y., Whiteway, M. and Kavanagh, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2002; 34(2), pp.153-157.
- Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 2013; 4:597–603.
- Kavanagh K, Sheehan G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. *Journal of Fungi* 2018; 4:113.
- Pereira, Monalesa Fábila, et al. "Galleria mellonella as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application." *Pathogens and Disease* 78.8 (2020): ftaa056.
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* 2012 Dec 11;(70).
- Sheehan G, Dixon A, Kavanagh K. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology* 2019; 165:863–75.
- Slater, J. L., Gregson, L., Denning, D. W. and Warn, P. A., 2011. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Medical mycology*, 49(Supplement_1), pp.S107-S113.
- Tkhilaishvili, T., Wang, L., Tavanti, A., Trampuz, A. and Di Luca, M. Antibacterial efficacy of two commercially available bacteriophage formulations, staphylococcal bacteriophage and PYO bacteriophage, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: prevention and eradication of

biofilm formation and control of a systemic infection of *Galleria mellonella* larvae. *Frontiers in microbiology* 2020; *11*, p.110.

Tsai C. J, Loh J. M, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016 Apr 2; *7*(3):214-29.

Faj Genom Analizi

Hanife SALİH DOĞAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

REDPROM Araştırma Merkezi

hanifesalih94@gmail.com

Bakteriyofajlar genetik materyal olarak sirküler veya lineer konfigürasyonda tek iplikli veya çift iplikli DNA veya RNA taşıyabilirler. Caudovirales sınıfına ait çift sarmal DNA'ya sahip kuyruklu fajlar tüm fajların 95%'inden fazlasını oluşturmaktadır. Özellikle, faj tedavisinde kullanılan fajların bu sınıfa dahil olması bu fajların genomik karakterizasyonunun yapılmasını önemli kılmaktadır.

Deoksiribonükleik asit (DNA), bir organizmanın gelişimi, işleyişi, büyümesi ve çoğalması için genetik bilgi taşıyan moleküldür. Tüm organizmalarda ve bazı virüslerde bulunur. DNA'nın sekanslanması, DNA'yı oluşturan nükleotidlerin (Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C) ve Timin (T)) sırasının belirlenmesidir. DNA sekanslama bize DNA'da bulunan genlerin ve düzenleyici (regulator) sekansların bilgisini verir. Tıbbi tanı, biyoteknoloji, adli biyoloji, viroloji ve biyolojik sistematigi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

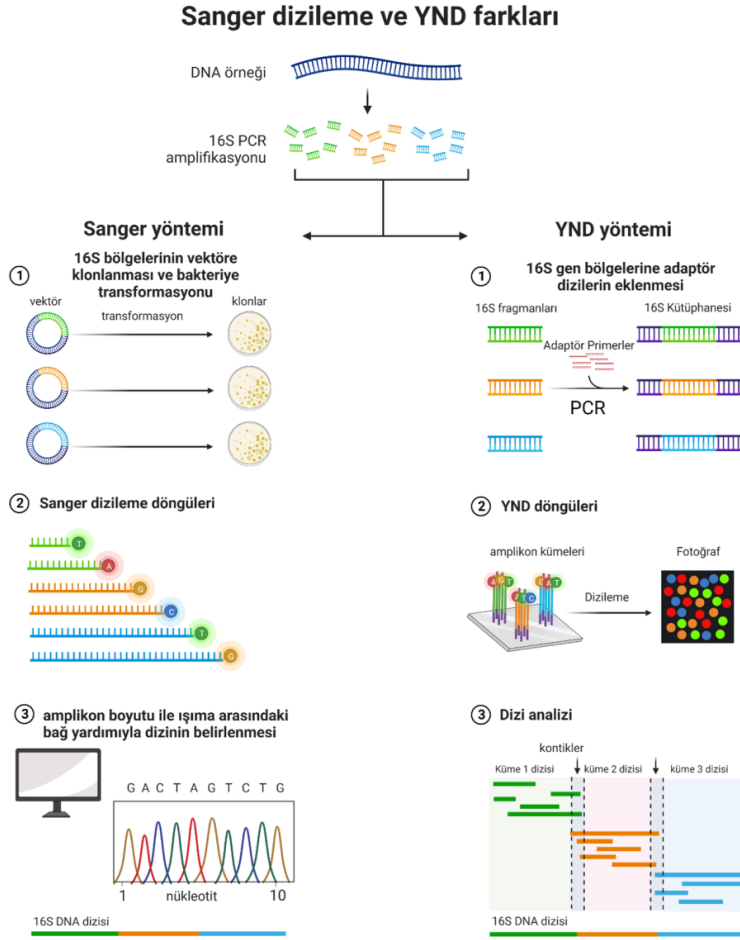
1) DNA sekanslama yöntemleri (Şekil 1):

Geleneksel sekanslama:

Sanger Sekanslama (Zincir sonlandırma yöntemi): DNA sekanslamada en verimli sonuçlar ilk defa Frederick Sanger tarafından 1975'te elde edilmiştir. Bu yöntemin çalışma prensibi in vitro DNA replikasyonu sırasında DNA polimerazın dNTP'ler yerine ddNTP'leri ekleyerek reaksiyonu durdurmasıdır. Farklı floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)'lerin eklenmesi durumunda reaksiyon sonlanmaktadır. Elde edilen ürünlerin kapiller jel elektroforezi sonrası DNA sekansı belirlenebilmektedir. Bu yöntemin popüleritesi keşfedilen yeni yöntemlerle azalsa da kullanımı günümüzde hala devam etmektedir.

Yeni Nesil Sekanslama:

- Pirosekanslama (Pyrosequencing):** Bu yöntem lusiferinin lusiferaz tarafından dönüştürülmesine ve ışımının gerçekleşmesine dayanır. DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfat (PPi), adozin 5'-fosfosulfat'tan (APS) ile birleşerek ATP sentezini indükler. Oluşan ATP lusiferinin dönüşmesini sağlar. Bu yöntemin dezavantajı her bir bazın tespiti için uygulamanın tek tek yapılması ve her baz solüsyon uygulamasından sonra yıkama gerektirmesidir. Bu sebeple, zaman ve işgücü kaybı olmaktadır.
- Sentez temelli sekanslama:** Bu yöntemde kullanılan dNTP'ler ayrılabilen floresan boya ile işaretlenmiştir ve sentezin devam etmesini engelleyen bloklayıcıya sahiptir. Tercih edilen boyalar her baz için farklıdır ve farklı dalga boylarında ışımaya yaparlar. Her bir baz eklendiğinde floresan boya ile işaretlenmiş baz bağlanır ve yıkama yapılır. Ardından, ışımaya gözlenir ve ışımaya sonucuna göre baz belirlenir. Bloklayıcının çıkarılması için ortama enzim eklenir ve bloklayıcı ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra bazlar eklenerek aynı işlem tekrarlanır. Yaygın olarak kullanılan Illumina sekanslama bu yöntemdir.
- İyon yarı iletken dizileme:** Bu yöntemde DNA polimerizasyonu sırasında ortama salınan H⁺ iyonunun pH üzerine etkisi takip edilir ve sekans elde edilir.
- Solexa dizilemesi, SOLiD dizilemesi ve İyon yarı iletken dizilemesi** diğer yeni nesil sekanslama tipleridir.



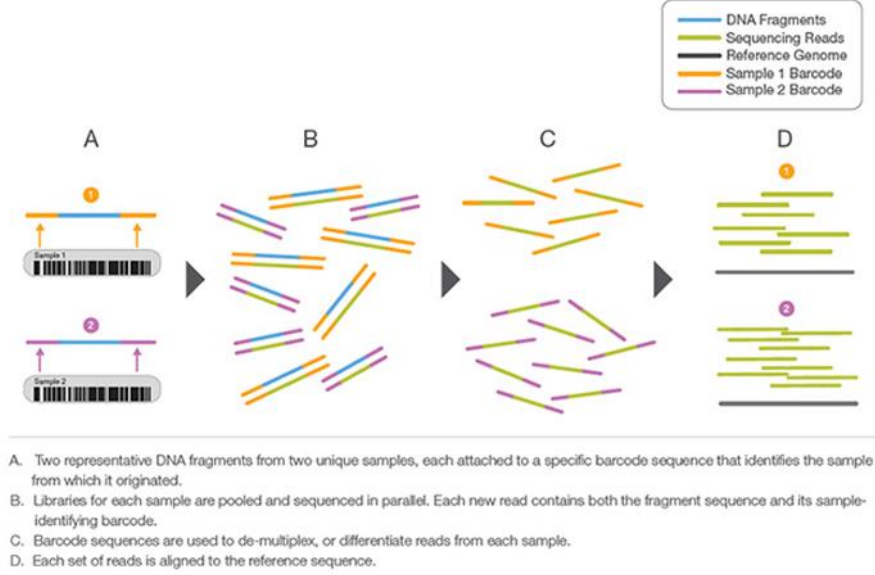
Şekil 1. Sanger dizileme ve yeni nesil sekanslama (dizileme)'nin karşılaştırılması. İki yöntem arasındaki en önemli fark, yeni nesil sekanslamada karışık örneklerin (birden fazla türe ait DNA'ların bulunması) saflaştırmaya ihtiyaç duyulmadan dizilenebilmesidir.

2) Neden bakteriyofaj genom sekansı yapmalıyız?

Bakteriyofajların pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Bunlar fajların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanımı, hayvancılık, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliğinde tedavi ve profilaktik amaçlı kullanımı, gıdada koruyucu olarak kullanımı, su arıtma sistemlerinde kullanımı ve yüzey sanitizasyonu başlıca örneklerdir. Genomik karakterizasyon fajı tanımlama açısından önemlidir. Genom sekanslama kodlanan genlerin ve dolayısıyla proteinlerin tahmininin gerçekleştirilebilmesi, kodladıkları tRNA'ların ve düzenleyici bölgelerin tanımlanması, fajın taksonomik sınıfının belirlenebilmesi ve novel enzimlerin tahmin edilebilmesi açısından önemlidir. Özellikle, antibiyotik direnç genleri ve virulans genlerinin faj genomunda tespit edilebilmesi fajın tedavide güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için önemlidir.

3) Kütüphane oluşturulması:

Saflaştırılan genomik DNA enzimatik veya mekanik yolla parçalanarak yaklaşık 100-500 baz çifti uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturulur. Fragmentlere ayrılan genomik DNA'ların ucuna adaptör adı verilen spesifik diziler eklenir (Şekil 2).



Şekil 2. Yeni nesil dizileme kütüphanesi hazırlanması. Oluşturulan fragmentlere adapter eklendikten sonra, DNA denatürasyonu gerçekleştirilir ve sekanslama yapılır.

4) Sekanslama: Sekanslama işleminin ardından örneğin DNA sekansı ve içerdiği bazlara ait kalite değerlerini bulunduran metin tabanlı bir format elde edilir. Illumina platformu için bu format fastq'dur.

5) Faj genomunun tanımlanması

a) Ham verilerde (raw data) kalite kontrolün gerçekleştirilmesi ve filtreleme: Elde edilen ham verilerde sekans kalitesinin değerlendirilmesi ve düşük kaliteli sekansların uzaklaştırılması çalışma sonucunda elde edilecek assembly'nin güvenilirliği için önemlidir. Faj genom sekanslamasında sıklıkla kullanılan Illumina ve ABI SOLiD gibi sekans platformlarından elde edilen ham verilerin kalite kontrolü için FASTQC sıklıkla kullanılır. FASTQC aracının bize verdiği raporda toplam okuma sayısı, düşük kaliteli olarak tanımlanan okuma sayısı, okuma uzunluğu, vs hakkında bilgi verir. Kalite kontrolü gerçekleştirilen ham veriden sekanslama işleminde kullanılan adaptör ve primer sekanslarının çıkarılması filtreleme (trimming) araçları kullanılarak gerçekleştirilir. Cutadapt (Martin, 2011) ve Trimmomatic (Bolger, 2014) bu amaçla en sık kullanılan araçlardır.

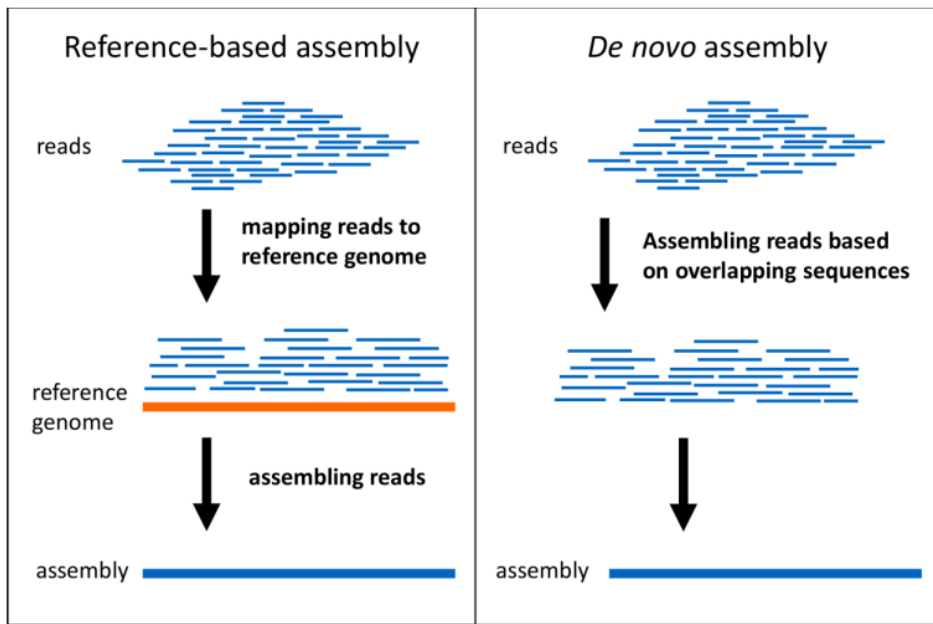
b) Birleştirme (Assembly): Sekans kalite kontrolü, adaptör ve düşük kaliteli okumaların filtrelenmesinin ardından yüksek kaliteli verilerle birleştirme işlemi gerçekleştirilir. Bu sayede bütün haldeki genom sekansına ulaşmak amaçlanır. Okumalarda üst üste binen (overlapping) bölgeler kullanılarak birleştirme gerçekleştirilir. Bu yolla oluşturulan parçalara contig (contiguous sequences) adı verilir. Ana prensip olarak 2 birleştirme yöntemi vardır. Bunlar referans tabanlı birleştirme ve *de novo* birleştirmedir (Şekil 3). Bu aşamanın sonunda elde edilen veri fasta formatındadır.

i) Referans tabanlı birleştirme (reference based assembly, mapping assembly): Bu yöntemde, daha önce sekanslanarak elde edilmiş genom referans alınır ve okumalar birbirinden bağımsız şekilde hizalanır. Hali hazırda bulunan genomla hizalanması sebebiyle hızlıdır. Genellikle, tek nükleotid varyantı (SNV: Single Nucleotide Variant) ve küçük insersiyon/delesyonların tespitinde genellikle tanı amaçlı kullanımda faydalıdır. Bu yöntemde kontaminant sekanslar veya sekans artefaktların varlığı sorun teşkil etmemektedir çünkü referans genomla benzerlik göstermezler. Ancak bu yöntemin dezavantajları da bulunmaktadır. Sekanslanan genomdaki farklılıkların gözden kaçırılabilmesi, referans genomda yapılan hatalı sekanslama sebebiyle

aynı hatanın sekanslanan genoma da uygulanması veya sekanslanan genom ile referans genom arasında genlerin yerleşiminde farklılık bulunabilecek olmasına rağmen gözden kaçırılmasıdır (Lischer, 2017). Bu durumlar sebebiyle, genomlar arasındaki çeşitliliğin tespit edilmesi sınırlanır.

ii) *de novo* birleştirme:

De novo birleştirme, çok sayıda (kısa veya uzun) DNA fragmanından, bu fragmanların doğru dizilimi veya sırasına dair önceden hiçbir bilgi olmaksızın genomlar oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde referans genoma ihtiyaç duyulmadığı için tüm genomlar için kullanılabilir. Elde edilen genomda doğruluk ve hassasiyet oranı yüksektir. Genomlardaki reorganizasyonları tespit etmede avantajlıdır. *de novo* birleştirmede kullanılan 2 yaygın algoritma vardır. Bunlar “greedy” algoritması ve “De Bruijn graph” algoritmasıdır. Kısaca, greedy algoritmasında en yüksek benzerlik skoruna sahip diziler eşlenip hizalanır. De Bruijn graph algoritmasında okumalar, belirli bir boyuttaki “k-mer” adı verilen daha küçük parçalara bölünür. Daha sonra k-merler, grafik düzeneğinde düğümler olarak kullanılır. Bir miktar örtüşen düğümler daha sonra bir kenarla bağlanır. Derleyici daha sonra De Bruijn grafiğine dayalı diziler oluşturur. Günümüzde, De Bruijn grafiğine dayalı assembly programları daha yaygındır. SPAdes, MEGAHIT ve Velvet araçları bu algoritmayı kullanan assembly araçlarıdır.



Şekil 3. Referans tabanlı birleştirme ve de novo birleştirmenin karşılaştırılması.

c) Anotasyon:

Genom anotasyonu genom üzerinde protein kodlayan genlerin, RNA kodlayan bölgelerin, direkt veya inverted tekrarların, insersiyon sekanslarının ve transpozonların genom üzerindeki lokasyonlarının belirlendiği bir yöntemdir. Prokka ve RAST sık kullanılan anotasyon araçlarıdır. Prokka, prokaryotik genom anotasyonu için geliştirilmiş bir araçtır ve protein kodlayan bölgeler, tRNA ve rRNA'ların anotasyonuna imkân verir. Bu araç 2 aşamalı çalışır. İlk aşamada protein kodlayan bölgeler Prodigal ile tanımlanır. İkinci aşamada tanımlanan proteinin fonksiyonu veritabanında bulunan proteindeki benzerlikleriyle karşılaştırılarak tahmin edilir. RAST serveri protein kodlayan genler, tRNA ve rRNA genlerinin tanımlanmasını sağlar ve farklı formatlarda kullanışlı çıktılar verir.

Bu araçlarla elde edilen çıktıda hipotetik protein olarak tanımlanmış bölgelerin fonksiyonlarının tahmini için ayrıca BlastP ile benzerlik karşılaştırılması ile yapılabilir. Benzerlik araştırmasına ek olarak protein domainlerini tanımlayarak fonksiyon tahmini yapılabilir. Bunun için farklı protein veritabanlarına karşı InterPro ve HMMER kullanılabilir. tRNA genlerinin araştırılması veya doğrulanması için tRNAscan-SE ve ARAGORN programları kullanılabilir. ARAGORN ayrıca Transfer-messenger RNA (Tm-RNA) genlerini de araştırabilmektedir. Virulans genlerinin ve antibiyotik direnç genlerinin varlığının araştırılması VirulenceFinder 2.0 ve ResFinder 4.1 programları ile yapılabilir.

d) Filogenetik analiz

Yakın zamana kadar fajların filogenetik analizi elektron mikroskobu görüntülerine dayanarak yapılırken günümüzde sekanslama tekniklerinin gelişmesiyle genom sekansından faydalanarak yapılabilir hale gelmiştir. Yapılan analiz ile fajın cins ve tür düzeyi belirlenebilmektedir. Bu analiz için farklı yöntemler kullanılmaktadır. VICTOR programı genom/proteome düzeyinde, Viptree programı ise proteom düzeyinde referans faj sekanslarıyla veya kullanıcı tarafından temin edilen faj sekanslarıyla karşılaştırma yaparak filogenetik ağaç oluşturmaya imkân sağlamaktadır. Bu yöntemlerden farklı ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntem tek bir proteinin DNA veya amino asit sekansına dayalı filogenetik ağaç oluşturulmasıdır. Bu yöntemde genellikle major kapsid proteini veya büyük terminaz alt ünitesi sıklıkla kullanılmaktadır.

6) Karşılaştırmalı genomik

İki veya daha fazla faj arasında yapılan genom karşılaştırması genomlarda bulunan ortak DNA/protein sekanslarının belirlenmesinin yanı sıra her bir genoma özgü DNA/protein sekanslarının da tespit edilebilmesine imkân vermektedir. BlastN, tBlastx, Artemis Comparison Tool (ACT) ve geneCo sıklıkla kullanılmaktadır. Karşılaştırması yapılan genomların gösterimi için Kablombo ve Easyfig programları yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kaynaklar

- Allen, B., Drake, M., Harris, N., & Sullivan, T. (2017). Using KBase to assemble and annotate prokaryotic genomes. *Current Protocols in Microbiology*, 46(1), 1E-13.
- Baker, M. (2012). De novo genome assembly: what every biologist should know. *Nature methods*, 9(4), 333-337.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., ... & Xia, F. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific reports*, 5(1), 8365.
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., ... & Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic acids research*, 48(D1), D606-D612.
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125-138.
- Doğan, Y., Bozdoğan B. (2022). 16S rRNA Geninin Yeni Nesil Dizileme Yöntemleriyle Analizi ve Mikrobiyolojideki Uygulamaları. *Akademisyen kitabevi*. Sayfa: 251-261.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, 1(4), 298-303.

- Lischer, H. E., & Shimizu, K. K. (2017). Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species. *BMC bioinformatics*, 18(1), 1-12.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Turner, D., Adriaenssens, E. M., Tolstoy, I., & Kropinski, A. M. (2021). Phage annotation guide: Guidelines for assembly and high-quality annotation. *Phage*, 2(4), 170-182.

Faj Gösterim Tekniği

Yunus DOĞAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

REDPROM Araştırma Merkezi

yunus.dgn.09@gmail.com

Tarihçe

Faj gösterim tekniği, hedef moleküle yüksek afiniteye sahip peptid/protein elde etmek ve tanımlamak için kullanılan etkili bir moleküler biyoloji tekniğidir. 1980'lerin başında George P. Smith, yabancı peptidlerin bakteriyofajların yüzey proteinlerinde gösterilebileceğini keşfetti. Bir peptidi kodlayan gen, fajın yüzey proteinine ait bir gen ile füzyon yapıldığında, ortaya çıkan füzyon protein, faj genomu paketlenirken yapıya dahil edildiğini ortaya koydular. Faj yüzeyinde gösterilen peptid spesifik bir moleküle güçlü bir etkileşim kurabilirse bu peptide ait gen dizisi fajı izole ederek elde edilebilir. Smith ve ekibi 1985 yılına geldiğinde antikorların (anti-EcoRI) Fab domainine bağlanan peptidleri (EcoRI domainleri) izole ederek faj gösterim tekniğinin gücünü ortaya çıkardılar (Smith, 1985). Aynı yıllarda Gregory P. Winter ve ekibi antikor çalışmaları ile ileride yapılacak önemli keşiflerin önünü açtılar. Daha sonraki yıllarda, RA Lerner ve ekibi (1991) influenza virüsüne karşı insan antikorlarını izole etmede faj gösterim tekniğinden yararlandı (Barbas ve ark., 1991). Bu keşif faj gösterim tekniği için büyük bir adımdı. Çünkü insan patojenlerine karşı yüksek afiniteye sahip antikorlar üretilebileceğini kanıtlayan ilk çalışmaydı.

Yıllar içinde faj gösterimi giderek önem kazanmış ve ilaç geliştirmeden protein-protein etkileşimi çalışmalarına kadar pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Protein mühendisliği çalışmaları ile 2018 yılında George P. Smith, Gregory P. Winter ve Frances H. Arnold Nobel kimya ödülünü kazandılar (Smith ve ark. 2018). Faj görüntüleme tekniğinin protein mühendisliğindeki bu başarısı ve önemi, ona keşif ve inovasyon tarihinde bir yer kazandırmıştır.

Ff Sınıfı Fajların Özellikleri

Smith'in kısmi (partial) proteinlerin pIII proteinine füzyon yapılabildiğini keşfetmesi, 90'lı yıllarda farklı çalışma gruplarının katkılarıyla proteinlerin tamamının (whole) da pIII proteininde gösterilebildiği farkedildiğinde bir süredir durağan devam eden araştırmaların hız kazanmasını sağladı (Hudson, 1998; Jespers, 1994; Smith, 1995; Winter ve Mistein, 1991). 1990'lardan günümüze kadar büyük gelişmeler kateden faj gösterim tekniği, $>10^{10}$ varyantı tek seferde test edebilir hale geldi.

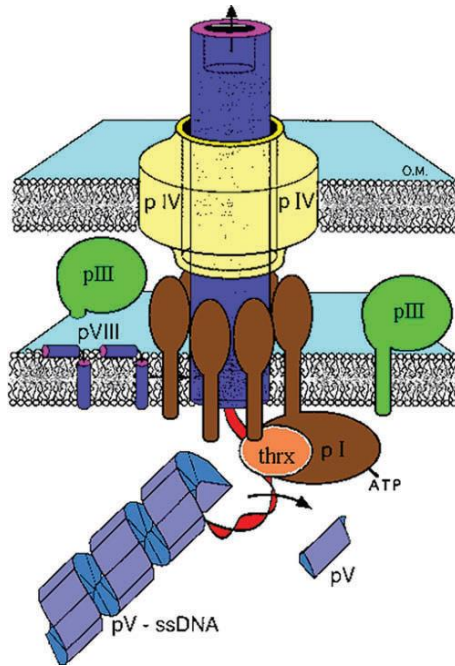
Faj gösterim tekniğinin uygulanışını anlayabilmek için öncelikle kullanılan bakteriyofajı tanımak gerekir. Öncelikle bakteriyofajların canlı sistemler olduğu unutulmamalıdır ve gösterim yapılırken yaşamsal döngülerine zarar verecek işlemlerden kaçınılmalıdır. Aynı zamanda fajlar yaşam döngülerini devam ettirebilmek için bir konağa ihtiyaç duyarlar. Konak-faj arası etkileşimlere zarar verecek işlemler elde edilecek faj kütüphanesinin büyüklüğünü ve hatta varlığını tehlikeye atabilir. Bu olumsuz etkiler bazen doğrudan gözlenebilirken (faj üretiminin engellenmesi) bazen de farkedilmez (hedef moleküle spesifik fajların olmaması).

Faj gösteriminde sıklıkla tercih edilen ff sınıfı filamentous fajlar ssDNA'ya sahip *Escherichia coli*'yi F pilusundan enfekte ederler. Ff sınıfı filamentous fajlardan olan m13, ff, fd fajları, %98 oranında genom benzerliği taşırlar. Doğal formu 0,8-0,9 um uzunluğa sahip çubuk şekilli fajlardır. Rekombinant ff fajlarının uzunluğu içine klonlanan DNA'ya bağlı olarak uzayabilir. Ff fajları litik veya lizojenik özellik göstermekten çok parazitik özellik gösterirler. Nadiren genoma entegre olurlar ve hücreleri öldürmeden kendilerini çoğaltırlar. Enfekte konaklar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirirlerken fajlar kendilerini

periplazmaya sentezleterek çoğalırlar. Ancak konaklarının büyüme ve bölünme yeteneklerini 30-50% oranında azaltırlar. Enfekte bir konak her bir büyüme-bölünme döngüsünde 200-2000 M13 fajı üretebilir (He, 2012; Bradbury ve ark., 2011).

M13 fajı 6.4 kb büyüklüğünde 11 gen içeren bir ssDNA'ya sahiptir. Konak içinde çift iplik formda bulunabilirken kapsid içerisinde tek iplikli formda bulunur. 11 genin 5 tanesi yapısal (p3, p6, p7, p8, p9); 3 tanesi faj sentezi için gerekli (p1, p4, p11); bir tanesi (p5) tek iplikli DNA'nın tutulması ve kapsid içerisine ulaştırılması ve 2 tanesi (p2, p10) replikasyonla ilişkilidir.

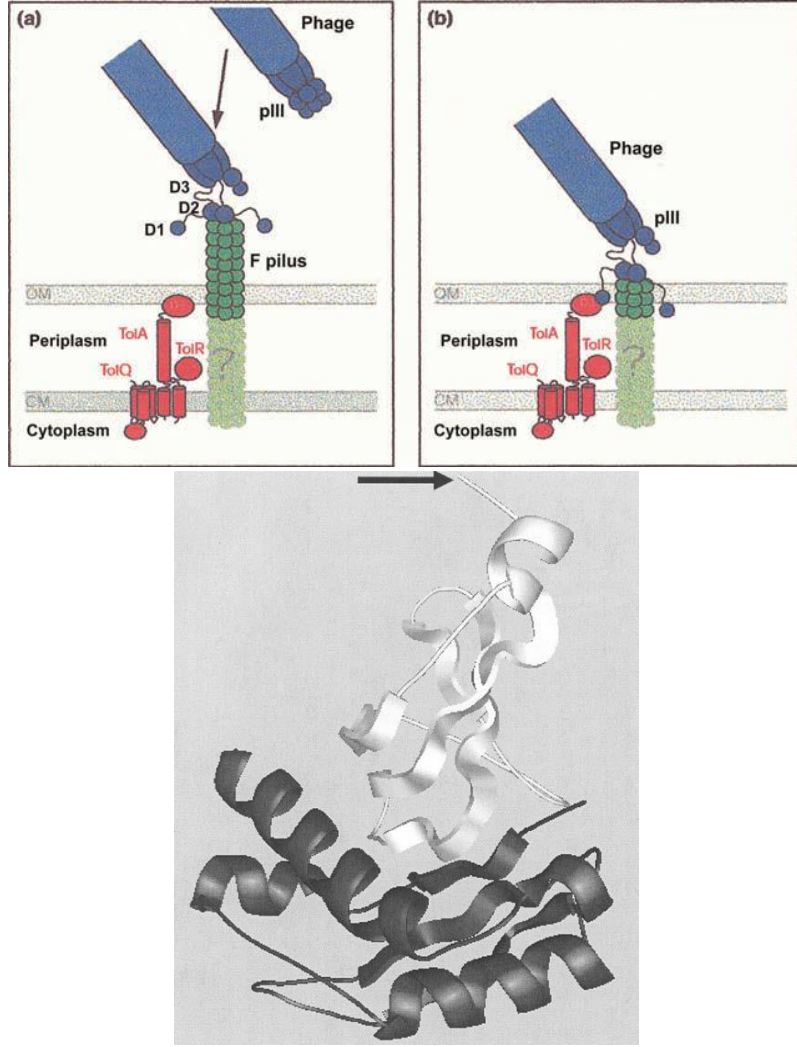
P2; 410 a.asitten oluşan, topoizomeraz ve endonükleaz aktivitelere sahip komplement iplikten faj DNA'sı üretimde görevlidir. P10; 111 a.asitten oluşan ve p2 içerisinden sentezlenen, viral yaşam döngüsünde p2 proteinini inhibe etmede görevlidir. P5, 87 a.asitten oluşan dimer halinde bulunan bir proteindir. Tek iplikli DNA bağlamada görevlidir. P8; 50 a.asitten oluşan major kapsid proteindir. Her bir fajda yaklaşık 2800 kopyaya sahiptir. P3, p6, p7, p9; fajların uçlarında bulunan kapsid proteinleridir. P7 33 a.asit, p9 32 a.asitten oluşur. p7 veya p9 yokluğunda neredeyse hiç faj üretilmez. P3 406 a.asit, p6 112 a.asitten oluşur. Konak hücreye bağlanmada görevlidirler (Barbas ve ark., 2001).



Şekil 1. Farklı viral ve konak hücre proteinlerinin faj üretimindeki fonksiyonları.

Faj genomunun replikasyonu şöyle gerçekleşir; kapsid içerisinde ssDNA içeren fajlar konağı F pilustan enfekte ederler. Sitoplazmaya ulaşan ssDNA (+), konak enzimleri yardımıyla tamamlayıcı ipliğini (-) sentezler. Bu çift iplikli DNA (dsDNA) parental veya replikatif form (RF) olarak adlandırılır. Konak hücre başına 100 kopya olasıya kadar RF kopyalanmaya devam eder. Son aşamaya gelindiğinde RF yeni faj DNA'ları (ssDNA) için taslak olarak kullanılır. P2 RF'in (+) ipliğinde kırık oluşturur ve "yuvarlanan halka" modeliyle yeni ssDNA'ların sentezini sağlar. Üretilen ssDNA yine p2 yardımıyla halkasal forma dönüştürülür ve pV dimerleri tarafından tutulurlar. Membranda sentezlenen faj partikülleri yeterliyse pV'e bağlı ssDNA membrana taşınır ve faj partiküllerinin içine aktarılır (Kehoe ve ark., 2005).

Serbest faj partiküllerinin enfekte etme yeteneğini p3 proteini belirler. P3 proteinin N2 domaininin F pilusa tutunmasıyla enfeksiyon başlar. Ardından N1 domaini konağın TolA (TolA-D3) reseptörü ile etkileşime geçer. Ardından faj DNA'sı konak hücre içerisine aktarılır.



Şekil 2. Serbest faj partikülünün konak hücreye tutunması (üstte). p3 N2 domaini F pilusa bağlanır ardından N1 domaini TolA reseptörüne tutunur. P3 proteinin N1 domaininin (açık renkli) TolA reseptörü (koyu renkli) ile etkileşimi (altta). Ok ile gösterilen kısım gösterimi yapılacak peptidin eklediğin N terminal. Gösterim tekniği ile füzyonu yapılan peptid p3-N1 ile TolA-D3'ün etkileşimini engellemez.

Gösterim tekniği

Gösterim tekniği, bir proteinin taşıyıcı organizmanın yüzeyinde gösterilmesi ve bu proteinin daha sonra diğer moleküllerce tanınmasını sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, proteinlerin hızlı bir şekilde taranmasına ve diğer moleküllerle etkileşimlerinin incelenmesine olanak tanır. Gösterim tekniği ile sentezlenen proteinden, onu sentezleyen mRNA veya DNA dizisine hızlı bir şekilde ulaşılabilir. Gösterim tekniği kullanılan taşıyıcıya bağlı olarak farklı şekillerde uygulanabilir. Taşıyıcı sisteme bağlı olarak hücre yüzey gösterimi, ribozom gösterimi, mRNA gösterimi ve faj gösterimi olarak adlandırılırlar (Georgiou ve Valax, 1996; Boder ve Wittrup, 1997).

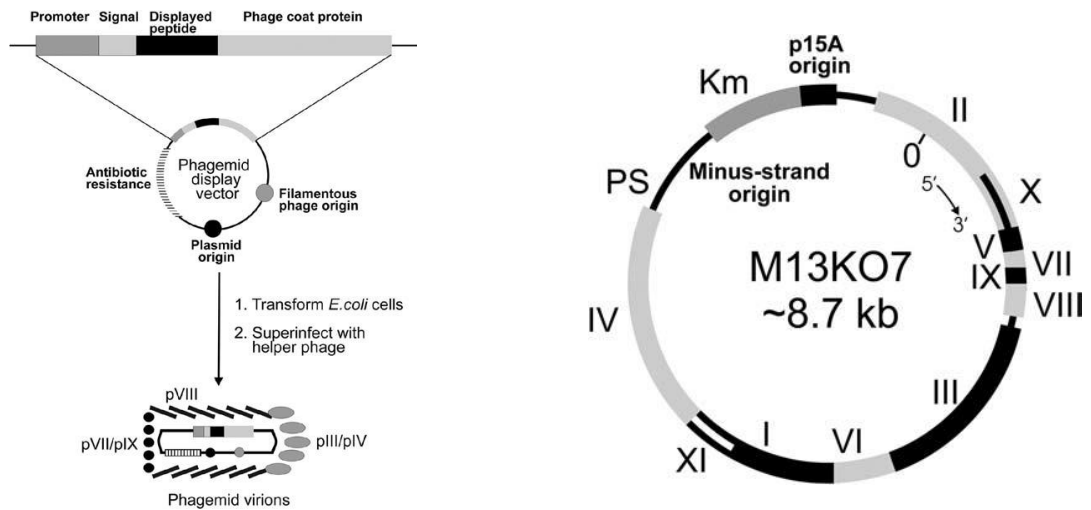
Ribozom ve mRNA gösterim tekniklerinde ilgili gene ait olan mRNA ile sentezlenen proteinin birbirinden ayrılması engellenir. Böylece ilgili proteine spesifik molekül yardımıyla proteinin sentezlenmesini sağlayan mRNA'ya ulaşılır (Hanes ve Pluckthun, 1997). Hücre yüzey gösterimi ve faj gösterimi tekniğinde ise hedef proteine ait gen hücre yüzey proteinlerine ya da faj proteinlerine füzyon

yapılır. Böylece hedef proteine spesifik moleküller yardımıyla gösterimi yapılan peptide ait genetik materyale ulaşılır.

Faj gösteriminde vektör olarak faj DNA'sı kullanılır. Fakat bütün bir faj genomunu kullanmak her zaman iyi değildir. Çift iplikli faj genomunu çok miktarda elde etmek mümkün değildir. Çünkü üretilen fajlar ssDNA'ya sahiptir ve çift iplikli DNA'larını elde etmek plazmid elde etmeye oranla daha zordur. Bu sebeple fajemid denilen yardımcı vektörlerden faydalanılarak gösterim verimi artırılmıştır. Fajemid, p3 proteini genine sahip (bazı durumlarda p8) bir plazmidir. Fajemidde oluşturulan füzyon diğer faj proteinlerinin üretilmesini sağlayacak olan "helper fajın" konağı enfekte etmesiyle rekombinant fajların yapısına katılabilecektir. Helper faj ile enfekte edilmiş olan konak hem fajemid hem helper faj genomuna sahip olacaktır.

Enfekte konak tarafından üretilen faj partikülleri, hücreden ayrılırken içlerine ssDNA alacaklardır. Burada faj partiküllerinin helper veya fajemidi alması tamamen olasılıksaldır. Fakat rekombinant faj partiküllerinin içerisine helper faj genomunun girmesi istenmeyen bir durumdur. Çünkü rekombinant faj ile tekrar enfeksiyon gerçekleştirildiğinde hücre içerisine fajemid DNA'sı girmemiş olacaktır. Tekrar faj üretimi gerçekleştirilirken üretilen fajlar gösterimi yapılan peptidi yüzeylerinde gösteremez hale geleceklerdir. Bunun önüne geçmek için helper faj genomunda tek iplik üretiminin sağlandığı faj replikasyon orijininin bütünlüğünün bozulması gerekmektedir. Bu orijine klonlanan direnç geni ile M13KO7 helper fajı elde edilmiştir. Aynı zamanda direnç geninin yanında p15A orijini de eklenerek faj proteinlerinden bağımsız şekilde replikasyonu sağlanmıştır. Böylece konak hücre içerisinde fajemid ve helper faj varken, üretilen faj partiküllerinin içine fajemid DNA'ları daha çok girecektir. Bu sayede üretilen rekombinant faj partikülleri ile tekrar enfeksiyon sağlandığında fajemid DNA'sı konak hücre içerisine girebilecek ve yeni rekombinant faj partikülleri üretilmesinin devamlılığı sağlanabilecektir.

Not: Ff sınıfı faj gösterim tekniğinde, hücre veya faj DNA'sı mutasyon geçirirse, faj üretim hızı etkileneceği için tespit etmesi diğer fajlara oranla daha kolay olacaktır. Örneğin faj DNA'sında meydana gelen bir mutasyonla konak membranında p3 ve p1 birikmesi gerçekleşecek ve bu birikme membran bütünlüğüne zarar vererek konak hücrenin ölmesine sebep olacaktır. Aynı şekilde faj üretimini kısıtlayacak mutasyonlar konakta gerçekleşse bile membranda p3 birikmesine sebep olacaktır.



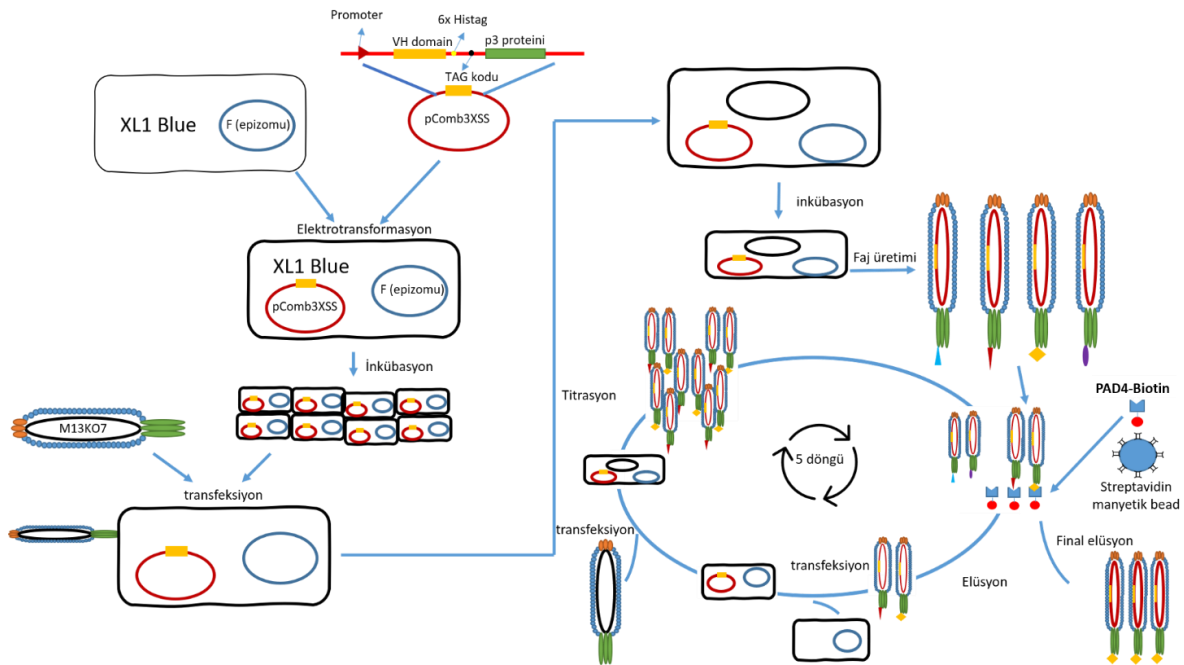
Şekil 3. Fajemid gösterim vektörü (solda). İçerisinde antibiyotik direnç geni, faj orijini, plazmid orijini ve faj yüzey proteinine ait gen dizisi taşır. M13k07 yapısı (sağda); p2 geninde Met40Ile mutasyonu taşır. Ayrıca faj orijininde kanamisin direnci ve p15a plazmid orijini taşır.

Faj gösterim tekniğinin uygulanışı

Faj gösterim tekniği uygulanışı anlatımında pComb3 fajemidi ve M13KO7 helper fajı temelli teknik temel alınmıştır. Farklı vektörler için uygulanış protokolleri değişiklik gösterebilir.

Öncelikle pComb3 fajemidi ampisilin içeren besiyerinde inkübe edilmiş bakteri içerisinden plazmid izole ederek elde edilir. pComb3 üzerindeki uygun restriksiyon enzimleri ile (XhoI - SpeI) kesilen hedef moleküle afiniteye sahip olması beklenen gen ve pComb3'ün ligasyonu sağlanır. Elde edilen fajemid plazmidini konak *E. coli* hücrelerine transforme edilir. Bu aşamada kullanılacak konağın F+ veya Hfr olması önemlidir. Ardından ampisilin içeren besiyerinde büyütülen hücrelere helper fajı genomu içeren fajlar eklenerek inkübe edilerek enfekte etmeleri sağlanır. Bu aşamada konak içerisinde hem fajemid hem helper faj genomu bulunmaktadır. Fajemid üzerindeki ampisilin direnç geni ampisilinli ortamda büyümeye izin verirken helper faj üzerindeki kanamisin direnç geni kanamisinli ortamda büyümeye izin verir. Her plazmidini içeren konaklar ampisilin ve kanamisin içeren besiyerine ekilerek inkübe edilir. Bu inkübasyon sonrasında besiyerinde yüksek titrede faj üretilir. Konak hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla elde edilen rekombinant fajlar seçim yapılmak üzere kullanılır (Deutscher, 2010).

Seçilim aşamasında hedef molekül bir yüzeye sabitlenir. Önceki basamakta elde edilen rekombinant fajlar bu yüzey ile inkübe edilir ve hedef moleküle afinite gösteren fajların bağlanması sağlanır. Hedef proteine afinite göstermeyen fajlar yıkanarak uzaklaştırılır. Hedef proteine afiniteye sahip fajlar elde edilerek tekrar konak ile muamele edilir ve enfekte etmesi sağlanır. Rekombinant faj ile enfekte olmuş konak hücreleri ampisilinli besiyerinde büyütülür ve tekrar helper faj ile enfekte edilirler. Bu basamaklar 3-5 defa tekrarlanır ve her döngüde afinitesi daha yüksek olan rekombinant fajların elde edilmesi sağlanır.



Şekil 4. Faj gösterim tekniğinin uygulanışı.

Faj Gösterim Kütüphanelerinin Kurulması

Faj gösterimini etkin bir şekilde uygulamak için başlangıçta sahip olunan kütüphanenin yeterince geniş olması önemlidir. Fakat bazı durumlarda kütüphane yeteri kadar büyük olmaz. Bu gibi durumlarda araştırmacıların müdahalesiyle kütüphanede mutasyonlar oluşturmak kütüphaneyi büyütme için etkili

bir yöntemdir (Sblattero ve Bradbury, 2020; Majewska ve ark, 2020; Janda ve Sidhu, 2010). Kütüphaneyi büyütmek için kullanılan farklı yöntemler vardır.

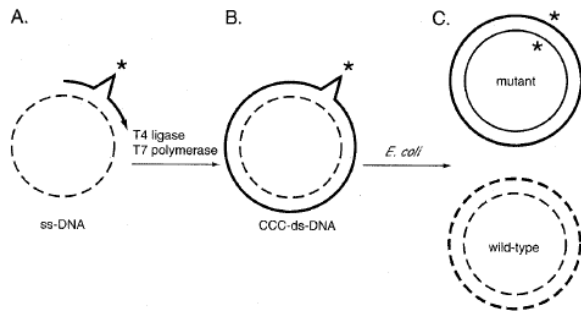
Oligonükleotid temelli mutagenез proteinlerde kontrollü mutasyon oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. Dejenere primerler kullanılarak proteinlerin hedef bölgelerine karşılık gelen nükleotidlerde mutasyonlar oluşturur. Bunun yanında mutasyonu taşıyan çift iplikli bir oligo dsDNA ile ligasyon yapılır. Araya eklenen bazlar ile mutasyon sağlanmış olur. Ayrıca PCR temelli yöntemler de vardır. PCR ile iki şekilde mutasyon gerçekleştirilebilir; OE-PCR tekniği ile primer uçlarına eklenen komplement kuyruklar ile iki farklı ampikon birleştirilir. Böylece kuyruk yardımıyla araya baz eklenebilir veya ilgili bölgedeki bazlar değiştirilebilir. Bunun dışında inverse PCR ile dejenere primerler ile fajemid komple çoğaltılarak tekrar ligasyonu gerçekleştirilir.

Hedef proteinin hangi bölgesinde mutasyon yapılması gerektiği bilinmediği durumlarda rastgele mutagenез tekniği kullanılabilir. Nitröz asit, hidroksilamin, metoksilamin, sodyum bisülfat gibi kimyasal ajanlar ile mutasyon indüklenebilir. Kimyasal yöntem dışında Taq DNA polimerazdan da yararlanılarak mutasyon oluşturulabilir. Taq DNA polimeraz 3'-5' düzeltme yapamayan bir polimerazdır. Buna bağlı olarak hata yapmaya meyillidir (baz başına 10^{-4} hata ihtimali). Ayrıca Taq DNA polimerazın optimum şartları bozularak da hata yapma oranı artırılabilir. Bunun için kullanılan tamponun pH'ı, Mg konsantrasyonu, Mn konsantrasyonu ve dNTP oranları değiştirilerek polimeraz hata yapmaya zorlanabilir. Ayrıca PCR'ın bağlanma sıcaklığı düşürülerek veya uzama aşaması gereğinden fazla uzun tutularak polimeraz hata yapmaya yönlendirilebilir.

Bir diğer teknik ise DNA shuffling olarak adlandırılan bir yöntemdir. Bu yöntemde farklı kaynaklardan alınan DNA kaynağı DNaz I kullanılarak fragmente edilir, ardından PCR ile tekrar birleştirilirler. Böylece farklı kaynaklardan gelen DNA'lardan füzyon oluşturulur.

Fiziki bir DNA kaynağına ihtiyaç duymadan da kütüphane oluşturulabilir (Georgiou ve Iverson, 2014; Sidhu ve Fellouse, 2006). Bu kütüphaneler biyoinformatik olarak belirlenen farklı mutasyonlara sahip genlerden oluşur. Ardından sentezlenen gen ile faj gösterim tekniği yardımıyla spesifiteye sahip dizi test edilir.

Table 1 Useful Degenerate Codons				
Codon	Description	Amino acids ^a	Stop codons	No. of codons ^b
NNN	All 20 amino acids	All 20	TAA, TAG, TGA	64
NNK or NNS	All 20 amino acids	All 20	TAG	32
NNC	15 amino acids	A, C, D, F, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V, Y	None	16
NWW	Charged, hydrophobic	D, E, F, H, I, K, L, N, Q, V, Y	TAA	16
RVK	Charged, hydrophilic	A, D, E, G, H, K, N, R, S, T	None	12
DVT	Hydrophilic	A, C, D, G, N, S, T, Y	None	9
NVT	Charged, hydrophilic	C, D, G, H, N, P, R, S, T, Y	None	12
NNT	Mixed	A, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V	None	16
VVC	Hydrophilic	A, D, G, H, N, P, R, S, T	None	9
NTT	Hydrophobic	F, I, L, V	None	4
RST	Small side chains	A, G, S, T	None	4
TDK	Hydrophobic	C, F, L, W, Y	TAG	6

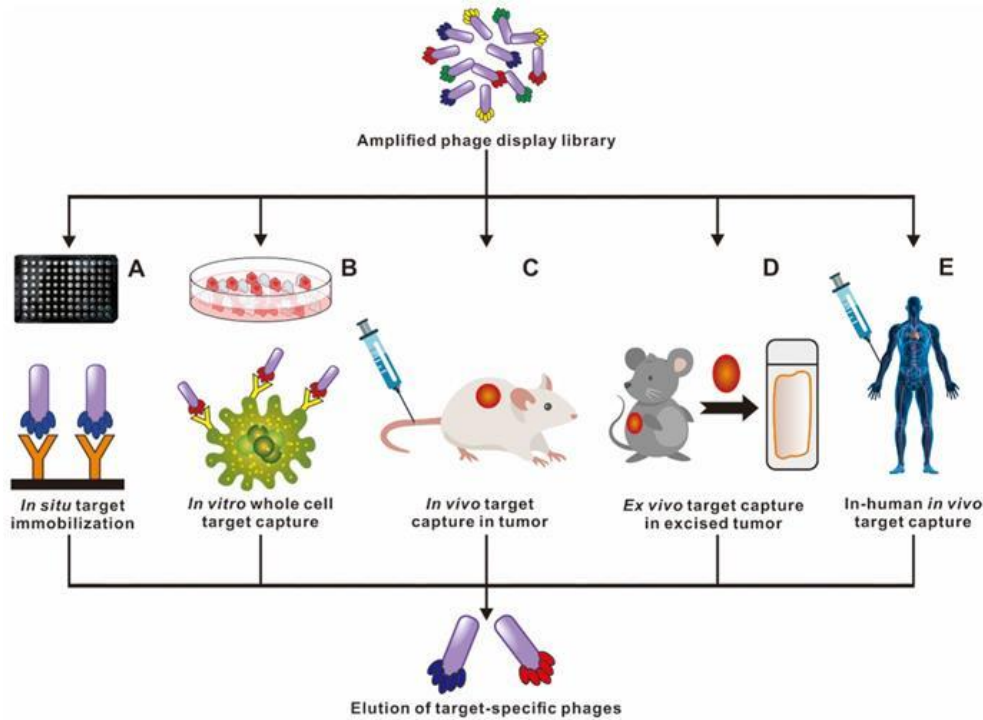


Şekil 5. Oligonükleotid temelli mutasyon.

Faj Gösterim Teknolojisinin Kullanım alanları;

Faj gösterim tekniğinin geliştirilmesi ile birçok alanda çalışmalar hızlanmıştır. Gösterim tekniğinden önce bir peptidin hedef molekülle etkileşimini incelemek oldukça zor ve maliyetliydi. Oluşturulan kütüphane bileşenlerini ayrı ayrı test etmek gerekirdi. Faj gösteriminin keşfiyle $>10^{10}$ farklı peptidi tek seferde test etmek mümkün hale gelmiştir. Böylece protein-protein etkileşimi, ilaç tasarımı gibi alanlar da dahil birçok alanda hızlı ve ucuz bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmış ve günümüzde yeni peptidler tasarlamada vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (Pande ve ark., 2010; Tavassoli, 2012; Dübel, 2007; Bradburry ve ark., 2011; Rakonjac ve Bennett, 2016).

Faj gösterim tekniği, bir antikor havuzundan spesifik bir antijene karşı etkili antikorları tespit etmede kullanılabilir. Antikorları tespit ederek yeni tanı yöntemleri geliştirilebilir veya spesifik antijenlere karşı aşı adayları belirlenebilir. Ayrıca ticari olarak önem taşıyan enzimlerin stabilite ve aktivitelerini artırmak için mutasyonlar oluşturularak test edilebilir. Bazı istenmeyen enzimlere karşı inhibitör tasarlanabilir. Bazı fonksiyonel proteinlerin epitopları tespit edilebilir. İmmünize veya sentetik antikor kütüphaneleri ($>10^{12}$ farklı antikor) oluşturulabilir. Tanı ve tedavide kullanılan mevcut antikorların afiniteleri geliştirilebilir.



Şekil 6. Faj gösterim tekniğinin kullanılabilceği çalışma alanları.

Sonuç

Bakteriyofajlar ilk keşfedildiklerinde bakteriyel hastalıkları tedavi etmede kullanılmıştı. Antibiyotiğin keşfi ile fajlara olan ilgi zamanla azaldı. Fakat ilerleyen yıllarda George P. Smith'in fajların protein çalışmaları için bir platform olabileceklerinin keşfetmesiyle fajlar tekrar önem kazandı. Devamında, Francis H. Arnold'un enzimlerin direkt evrimi çalışmalarının faj gösterim tekniği ile uygulanmasıyla yeni peptid kökenli ilaç ve araştırmalar hız kazandı. 2002 yılında Humira'nın (Adalimumab), TNF alfa inhibitörü, FDA onayı alması ve devamında çok başarılı olmasıyla faj gösterim tekniğinin önemi bir kez daha anlaşıldı. Günümüzde faj gösterim tekniğiyle geliştirilmiş >50 antikor kökenli ilaç onay almış, yaklaşık 500 ilacın ise klinik çalışmaları devam etmektedir. Terapötik antikor keşfinin yanında protein-

protein etkileşimi, enzim aktivitesi ve stabilitesi çalışmalarında da oldukça etkili bir yöntem olan faj gösterim tekniğinin önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Kaynakça

- Barbas C. F., Kang A. S., Lerner R. A., Benkovic S. J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):7978-82. PMID: 1896442; PMCID: PMC51496
- Barbas C. F., Burton D. R., Scott J. K., & Silverman G. J. (2001). *Phage display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Boder, E. T., & Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature biotechnology*, 15(6), 553-557.
- Bradbury, A. R., Sidhu, S., & Dübel, S. (2011). Phage display as a technology delivering on the promise of peptide ligands. *Drug discovery today*, 16(15-16), 704-711.
- Bradbury, A. R., Sidhu, S., & Dübel, S. (2011). Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Nature Methods*, 8(8), 647-654.
- Deutscher, S. L. (2010). *Phage display in molecular recognition and analysis of proteins*. CRC Press.
- Dübel, S. (2007). *Handbook of therapeutic antibodies (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.
- Georgiou, G. & Valax, P. (1996). Display of peptides and proteins on the surface of bacteria, phage, and yeast cells. *Biotechnology Progress*, 12(6), 715-723.
- Georgiou, G., & Iverson, B. L. (2014). Synthetic biology and therapeutic protein production. *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 7171-7179.
- Hanes, J. & Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 4937-4942.
- He, M. (2012). Cell-based phage display in biomarker discovery and drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(9), 807-821.
- Hudson, P. J. (1998). Recombinant antibody libraries: a phage display platform for generating human monoclonal antibodies. *Drug discovery today*, 3(8), 347-354.
- Janda, K. D., & Sidhu, S. S. (2010). Antibodies from phage display libraries: selections for binding and function. *Chemical reviews*, 110(4), 2550-2581.
- Jespersen LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)*. 1994 Jul;12(7):899-903. PMID: 7763616.
- Kehoe, J. W., & Kay, B. K. (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical reviews*, 105(11), 4056-4072.
- Majewska M, Czarnecka J, Świtalska M, Bujacz A. Strategies for constructing phage display libraries: recent advances and practical guidelines. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 28;21(7):2380. PMID: 32231189; PMCID: PMC7177713.
- Pande, J., Szcwyczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology advances*, 28(6), 849-858.
- Rakonjac, J., & Bennett, N. J. (2016). Spontaneous assembly of viruses in thermodynamically unfavorable conditions using metastable intermediates. *Viruses*, 8(9), 248.
- Sblattero, D., & Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature biotechnology*, 18(1), 75-80.
- Sidhu, S. S., & Fellouse, F. A. (2006). Synthetic therapeutic antibodies. *Nature Chemical Biology*, 2(12), 682-688.
- Smith GP. *Phage Display: A Practical Approach*. Oxford University Press, USA; 1995.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.

Smith, G. P., Winter, G., & Arnold, F. H. (2018). Nobel Lecture: Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1885), 20172490.

Tavassoli A. Peptide ligand discovery by phage display and synthetic chemistry. *Drug Discov Today*. 2012 Jul-Aug;17(13-14):725-32. PMID: 22387587.

Winter, G., & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, 349(6307), 293-299.

BAKTERİYOFAJ KURSU

PRATİK UYGULAMA BÖLÜMÜ

HAZIRLAYANLAR

Abdulkerim KARAYNİR

Hanife SALİH-DOĞAN

KONULAR

Kaynaktan faj izolasyonu

Agar spot test

İkili agar kaplama

Tek plak izolasyonu

Faj titre hesaplama

Optimal MOI belirleme

Redüksiyon deneyi

Faj DNA izolasyonu

Restriksiyon profili belirleme (RFLP)

***Galleria mellonella* enfeksiyonu ve faj tedavisi**

Faj genom analizi

Kaynaktan faj izolasyonu

Kaynakta bakteriyofaj varlığının tespiti ve izolasyonu için Agar spot-test ile ikili agar kaplama olmak üzere iki ayrı yöntem kullanılacaktır.

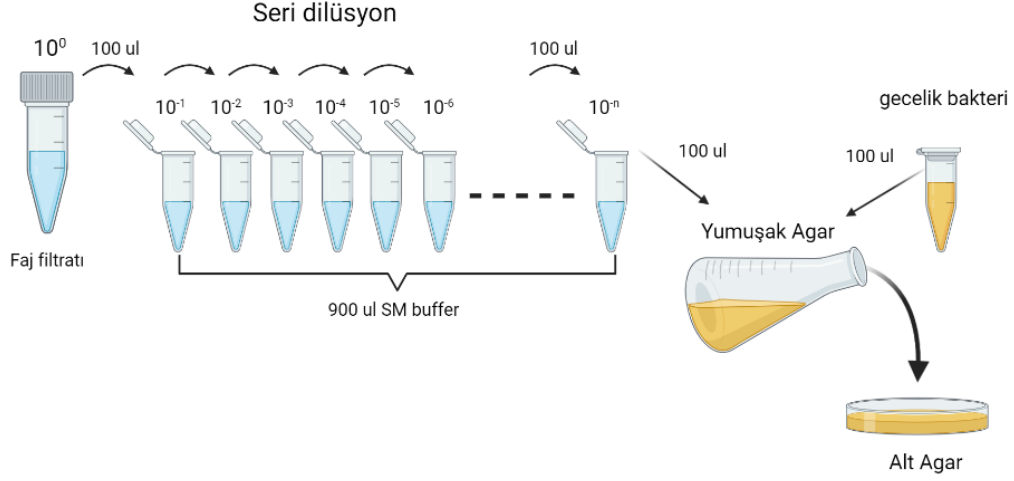
Faj kaynağı olarak hastane kanalizasyon suyundan alınan su örneği kullanılacaktır ve bu kaynaktan *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı etkili fajların tespiti ve izolasyonu gerçekleştirilecektir.

Agar spot-test ile faj varlığının taranması

- 1- Ham kaynaktan 10 ml steril falkon tüpe aktarılır.
- 2- 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.
- 3- Süpernatant şırınga ile çekilir, pellet atılır.
- 4- Süpernatant, 0.22 µm por çapına sahip şırınga uçlu filtreden geçirilerek steril falkon içerisine alınır.
- 5- 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 ml yumuşak agara (0,5% w/v agar) eklenir.
- 6- Karışım hızlıca vortekslenir ve önceden hazırlanan alt agar (1,5% w/v agar) üzerine yayılır.
- 7- Yumuşak agarın kuruması için petri 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 8- Adım 4'te hazırlanan filtrattan 10 µl alınıp petri üzerinde işaretlenen bölgeye mikropipet yardımıyla damlatılır. İstenirse seri dilüsyon yapılabilir.
- 9- Damlalar kuruyana kadar petri oda sıcaklığında bekletilir.
- 10- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 11- Ertesi gün petri üzerine damlatılan bölgeler litik faj varlığı açısından değerlendirilir.

İkili agar kaplama

- 1- Kaynaktaki faj titresinin seyreltilmesi için, 900 µl SM buffer [(100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM, Tris-HCl [pH 7.5] içerisine 100 µl faj filtratı eklenir, pipetajla karıştırılır bu 1. dilüsyondur (10⁻¹).
- 2- 1. dilüsyondan 100 µl bir sonraki tüpe geçilir ve bu işlem 10⁻⁶'ya kadar devam eder (Resim 1).



- 3- 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü ve 100 µl dilüsyon örneği, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 ml yumuşak agar içerisine inoküle edilir.
- 4- Karışım vortekslenir ve önceden hazırlanan alt agar (1,5% w/v agar) üzerine yayılır. Bu işlemler her bir dilüsyon için ayrı ayrı yapılır.
- 5- Petriler, yumuşak agar katılaşana kadar oda sıcaklığında bekletilir.
- 6- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 7- Ertesi gün, her bir dilüsyon için oluşan faj plakları incelenecektir.

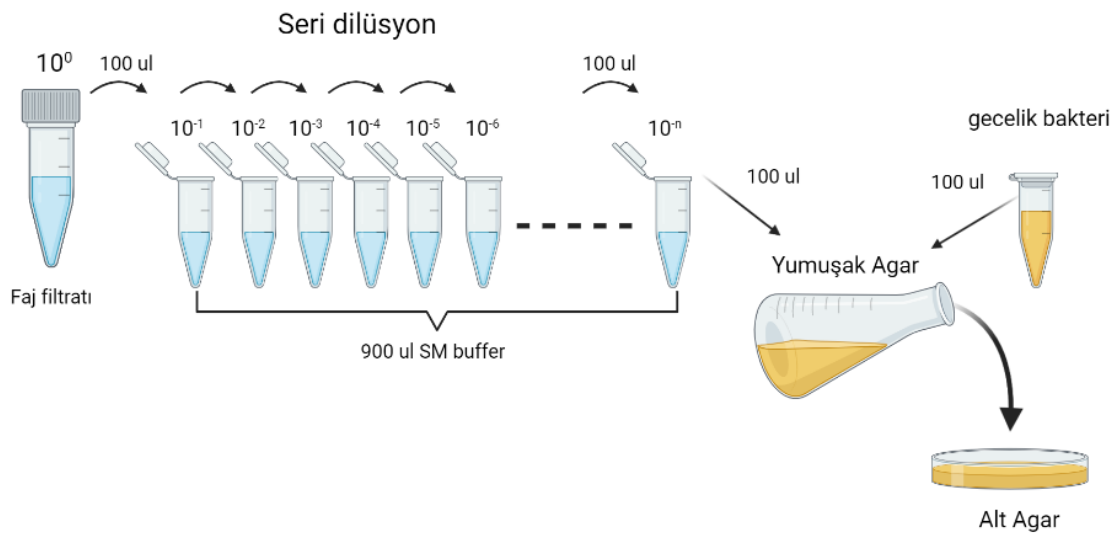
Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofaj Saflaştırma

- 1- İkili agar kaplama sonrası tek plak oluşumu gözlemlenen petrilerden kesik pipet ucu yardımıyla sınırları belirgin bir plak seçilip alınır.
- 2- Plak, 10 ml steril LB-Broth içeren falkon tüpe aktarılır ve vorteklenir.
- 3- Fajın besiyerine difüzyonu için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- 4- Plak+LB-Broth içeren tüpe 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü eklenir.
- 5- Kültür içerisine (Plak+LB-Broth+bakteri) 50 µl CaCl₂ (1M) solüsyonu eklenir ve 5mM final konsantrasyonu elde edilir. Vorteks yardımıyla iyice karıştırılır.
- 6- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 7- Ertesi gün, kültür >10000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.
- 8- Süpernatant, 0.22 µm por çapına sahip şırınga uçlu filtreden geçirilerek steril ependorf içerisine alınır.
- 9- Elde edilen faj filtratı +4 °C'de saklanır (1. Plak saflaştırma).
- 10- Fajın saf olarak izole edilebilmesi için, ikili agar kaplama ve plak saflaştırma işleminin en az 3 kez tekrar edilmesi tavsiye edilir.

Faj titresinin belirlenmesi

Tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajın titresini belirlemek için ikili agar kaplama metodu uygulanacaktır.

- 1- Faj titresinin seyreltilmesi için, 900 µl SM buffer içerisine 100 µl faj filtratı (10^0) eklenir, pipetajla karıştırılır bu 1. dilüsyondur (10^{-1}).
- 2- 1. dilüsyondan 100 µl bir sonraki tüpe geçilir ve bu işlem 10^{-6} 'ya kadar devam eder (Resim 1).

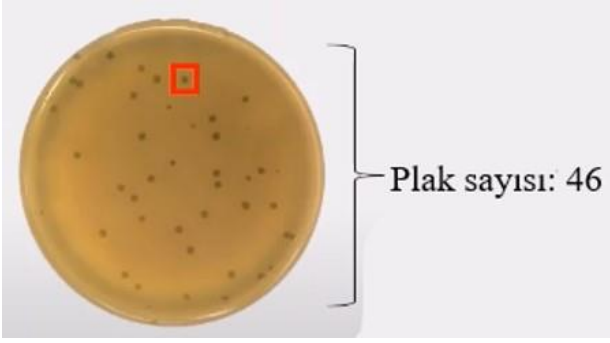


- 3- 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü ve 100 µl dilüsyon örneği, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 ml yumuşak agar içerisine inoküle edilir
- 4- Karışım vortekslenir ve önceden hazırlanan alt agar (1,5% w/v agar) üzerine yayılır. Bu işlemler her bir dilüsyon için ayrı ayrı yapılır.
- 5- Petriler, yumuşak agar donana kadar oda sıcaklığında bekletilir.
- 6- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 7- Ertesi gün, petrilerde oluşan plaklar sayılarak ve aşağıdaki formül kullanılarak faj titresini belirlenir.

$$\frac{pfu}{ml} = \frac{plak\ sayısı}{dilüsyon\ faktörü \times filtrat\ hacmi\ (\mu l)} \times \frac{1000\mu l}{ml}$$

- 8- Faj titresi, bir mililitre örnek içerisinde bulunan faj sayısı olup, sonuçlar plaque forming unit (pfu/ml) şeklinde verilir.
- 9- Örneğin, 10^{-4} dilüsyonuna ait aşağıdaki ikili agar petrisinden yola çıkarak titre hesabı yaparsak;

$$\frac{pfu}{ml} = \frac{46}{10^{-4} \times 100\mu l} \times \frac{1000\mu l}{ml} = 4.6 \times 10^6 \text{ pfu/ml}$$



Faj konak aralığının belirlenmesi:

Faj konak aralığını belirlemek için spot test metodu uygulanacaktır. Yayma ekim şeklinde yapılabileceği gibi soft agar içinde de bakteri ekimi yapılabilir. Burada yayma ekim tarifi verilmiştir.

- 1- 1 ml gecelik bakteri kültürü alt agar petrisine dökülür ve agar yüzeyine iyice yayılması sağlanır.
- 2- Petri kabına 45°C açı verilerek sıvı kültürün fazlası pipetle alınır ve uzaklaştırılır.
- 3- Sıvı kültürün agar tarafından iyice emilmesi için petri oda sıcaklığında bekletilir.
- 4- Yüzeyi bakteri ile kaplı agarın üzerine 10 µl faj filtratı damlatılır.
- 5- Petri, damlalar kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilir.
- 6- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 7- Yukardaki işlemler, test edilecek her bakteri için ayrı ayrı yapılır.
- 8- Ertesi gün petri üzerine damlatılan bölgelerde zon oluşumuna bağlı olarak bakterilerin faja hassasiyetleri belirlenir.

Bakteriyofaj DNA izolasyonu:

DNA izolasyonu için fajın en az 10⁸ pfu/ml titresine sahip olması gerekir.

- 1- Faj filtratından 2 ml santrifüj tüpüne alınır.
- 2- 2 saat, +4°C'de >13 000 rpm santrifüj edilir.
- 3- Üst sıvı atılarak, pellet 100 µl SM buffer ile homojen hale getirilir.
- 4- Faj süspansiyonu üzerine 1 µl DNase I (1 U/µl) ve 1 µl RNase A (10 mg/ml) eklenerek karıştırılır.

- 5- 37 °C 'de 30 dakika inkübasyona bırakılır.
- 6- 70 °C'de 10 dk tutularak enzim inaktivasyonu yapılır.
- 7- Faj süspansiyonu üzerine 3 µl Proteinaz K (30 mg/ml) eklenerek karıştırılır.
- 8- 55 °C 'de 60 dakika inkübasyona bırakılır.
- 9- Volume/Volume (V/V) Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) karışımı eklenerek iyice karıştırılır ve 5 dakika >10 000 rpm 'de santrifüj edilir.
- 10- Üst faz yeni bir ependorfa alınarak 1/10 Volume 3 M NaAsetat pH:5 eklenerek karıştırılır.
- 11- V/V %100'lük izopropanol veya 2-3 kat Volümde %100'lük ethanol eklenerek karıştırılıp -20 °C'de 20 dakika bekletilir.
- 12- Daha sonra >10 000 rpm'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edilir.
- 13- Pellet bozulmadan süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır ve üzerine %70'lik ethanol eklenerek >10 000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilir.
- 14- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak, pellet kurumaya bırakılır ve kuruduktan sonra 50 µl TE solüsyonu (pH 7.5) veya dH₂O ile çözülür.

Faj DNA'sının restriksiyon profilinin belirlenmesi

Elde edilen fajların aynı fajlar olup olmadığını moleküler düzeyde belirlemek için en uygun yöntem restriksiyon enzimi ile kestikten sonra elektroforez profillerinin belirlenmesidir (RFLP). Bu amaçla aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlanır.

10 µl Faj Total DNA	}	37°C'de 1 saat inkübasyon
2 µl Enzim Tamponu		
1 µl Restriksiyon Enzimi		
7 µl Distile Su		

Faj DNA'sının ve Restriksiyon profilinin Elektroforez ile görüntülenmesi

- 1- 1 g agaroz tartılır ve 100 mL 0.5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu eklenir.

- 2- Mikrodalga fırında iyice homojen hale getirildikten sonra 50-60 °C'ye kadar soğuması beklenir.
- 3- 10 µl SafeView DNA boyası eklenir ve karıştırılır.
- 4- Agaroz, jel kalıbı içine dökülerek tarak yerleştirilir ve katılaşıncaya dek beklenir.
- 5- Elektroforez tankına alınan jeldeki kuyucuklara 1 µl Loading Dye ile karıştırılan 5 µl DNA pipet yardımı ile konulur.
- 6- 100 Volt, 100 Amperi geçmeyecek elektrik akımı verilerek 30 dk yürütülür.
- 7- Daha sonra jel görüntüleme sisteminde incelenir.

Optimal MOI belirleme

Multiplicity of infection (MOI), faj titresinin (pfu/ml) konak hücre sayısına (cfu/ml) oranı, yani pfu/cfu olarak tanımlanır. Bu test sayesinde eklediğimiz fajlardan ne kadarının adsorbe olduğunu, hedefine bağlandığını ve enfekte ettiğini belirleyebiliriz.

MOI deneyine başlamadan önce, kullanılacak olan fajın titresini (pfu/ml) ve konakçı bakterinin sayısı (cfu/ml) önceden bilinmelidir.

- 1- Gecelik konakçı kültüründen ($\sim 10^9$ cfu/ml) 200 µl alınır ve içerisinde 1.8 ml LB Broth bulunan santrifüj tüpüne aktarılır. Böylece, bakteri kültürünün son konsantrasyonu 10^8 cfu/ml olur.
- 2- 10^8 cfu/ml olarak hazırlanan kültürden 500'er µl 3 farklı ependorfa alınır. Bakteri sayısı sabit kalır.
- 3- Titresi 10^9 , 10^8 ve 10^7 pfu/ml faj dilusyonları LB-Broth içinde hazırlanır.
- 4- Hazırlanan faj dilusyonlarından (10^9 pfu/ml, 10^8 pfu/ml ve 10^7 pfu/ml) 500 µl alınır ve 2. adımda hazırlanan sabit sayılı bakteriler üzerine eklenir. Böylece 10^8 bakteriye 10^9 faj konduğu için MOI 10 olur, diğer tüplere daha az faj konduğu için MOI 1 ve 0,1 olur.
- 5- Faj+bakteri kültürleri 10 dakika adsorpsiyon için oda sıcaklığında tutulur.
- 6- Adsorpsiyondan sonra, 3 dakika >13.000 rpm santrifüj yapılır.
- 7- Santrifüj sonrası adsorbe olmayan serbest fajların uzaklaştırılması için süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırılır.

- 8- Serbest fajların uzaklaştırıldığından emin olmak için, her bir pellete 1 ml taze LB-Broth eklenir ve tekrar santrifüjlenir (3 dakika >13.000 rpm). Süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırılır.
- 9- Her bir pellet 1 ml taze LB-Broth ile resüspanse edilir.
- 10- 37°C 3 saat inkübasyona bırakılır.
- 11- İnkübasyondan sonra kültürler 3 dakika >13.000 rpm santrifüj edilir .
- 12- Süpernatantlar yeni tüplere alınır ve pelletler atılır.
- 13- Süpernatantların her birine 10'ar µl kloroform eklenir ve 3 dakika >13.000 rpm santrifüj edilir (Bu aşamada filtre de kullanılabilir).
- 14- Her bir MOI'ye ait süpernatantlardan ayrı ayrı seri dilüsyonlar (10⁰'dan 10⁻⁸'e kadar) hazırlanır.
- 15- 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü, 45-50°C'ye soğutulmuş 5 ml yumuşak agara (0,5% w/v agar) inoküle edilir.
- 16- Karışım hızlıca vortekslenir ve önceden hazırlanan alt agar (1,5% w/v agar) petrisi üzerine yayılır.
- 17- 14 ve 15. adımlar iki kere daha tekrarlanır ve böylece her MOI değeri için birer petri hazırlanır.
- 18- Yumuşak agarın kuruması için petri 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 19- Adım 13'te hazırlanan her bir seri dilüsyondan 10 µl petri üzerinde işaretlenen bölgelere mikropipet yardımıyla damlatılır. Bu işlem her bir MOI dilüsyonu için ayrı petrilere yapılır.
- 20- Damlalar kuruyana kadar petri 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 21- 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.
- 22- Ertesi gün her bir MOI'ye ait petri gözlemlenir ve en yüksek faj miktarının elde edilmesini sağlayan MOI değeri, optimal MOI değeri olarak belirlenir.

Redüksiyon deneyi

- 1- LB-sıvı besiyeri içerisinde kültürlenmiş gecelik konakçı kültürünün Optik Dansite yoğunluğu (OD₆₀₀) ölçülür.
- 2- Redüksiyon deneyi için OD₆₀₀: 0.2 gereklidir. Gecelik kültürden 2 ml OD₆₀₀: 0.2 hazırlanır.
- 3- İki ayrı steril ependorf tüp içerisine 1'er ml olacak şekilde paylaşılır.
- 4- Ependorf tüplerden bir tanesine 100 µl faj filtratı (>10⁸pfu/ml) eklenir ve pipetajla karıştırılır. (Böylece, tedavi grubu: faj+bakteri olur.).

- 5- Diğer ependorf tüp içerisine 100 µl steril LB-Broth eklenir ve pipetajla karıştırılır (Böylece, pozitif kontrol grubu: sadece bakteri olur.).
- 6- Ayrıca, boş besiyeri kontrolü için 1 ml LB-Broth içeren bir epenrof tüp hazırlanır (Böylece, negatif kontrol: sadece LB-Broth olur).
- 7- Hazırlanan örneklerden 96 kuyucuklu well-plate içerisine kuyucuklara 200 µl eklenir. Toplam 3 grup örnekten en az 3 tekrar (kurs için 2 tekrar) olacak şekilde kuyucuklara örnekler eklenir.
- 8- Hazırlanan plağın kapağı kapalı olacak şekilde elisa okuyucusu içerisine yerleştirilir.
- 9- Elisa okuyucu, OD₆₀₀'de her 2 saatte bir (Her ölçüm öncesi 20 saniye boyunca çalkalama) 16 saat boyunca ölçüm yapması için ayarlanır (Kinetik ölçüm)
- 10- Ertesi gün elde edilen OD₆₀₀ ölçüm sonuçları, excel programına işlenerek tedavi ve kontrol grubunun eğrileri çıkarılıp yorumlanır. Böylece fajın kontrole göre bakteri miktarını ne kadar azalttığı zaman karşı belirlenir.

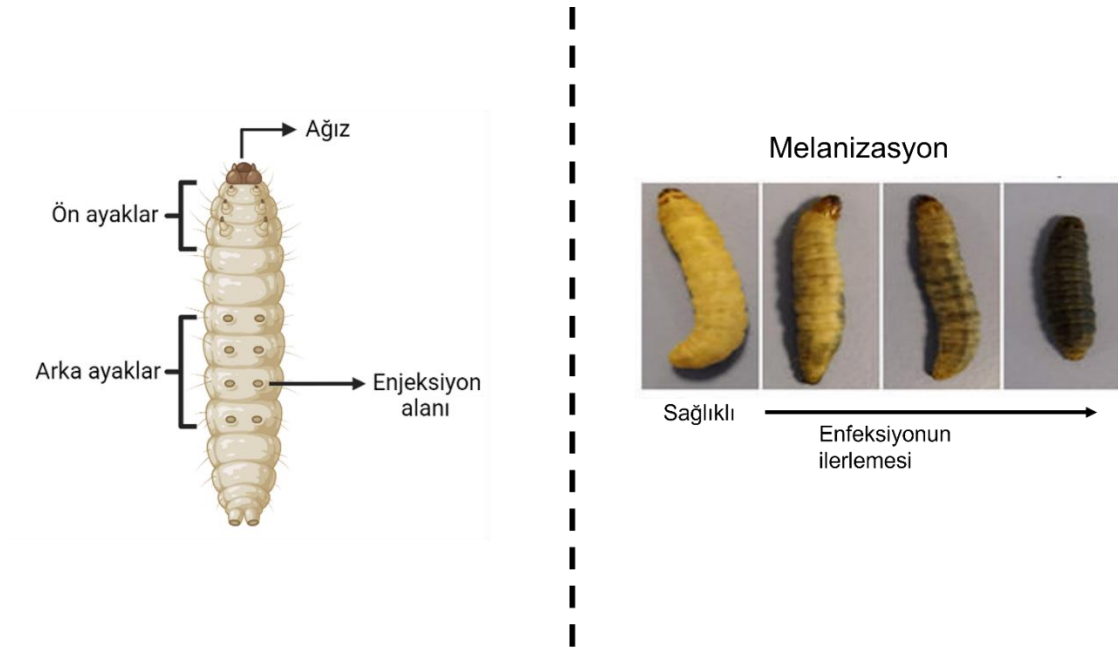
***Galleria mellonella* enfeksiyonu ve faj ile tedavi deneyi**

- 1- 200 ila 250 mg ağırlığındaki üç *G. mellonella* larvası rastgele seçilir.
- 2- Larvalar, 50-55°C'ye ısıtılmış olan distile suya 2-3 kez batırılıp çıkarılır ve kurutma kağıdı üzerinde kurutulurlar (Bu işlemin amacı, larvanın daha az ağ örmesini sağlamaktır).
- 3- Kuruyan larvalar ayrı petri kaplarına alınır ve 10-15 dk soğukta tutularak hareketsizleşmeleri beklenir.
- 4- Gecelik bakteri kültürü (~ 2 x 10⁹ cfu/ml), x1 PBS kullanılarak 10⁵ cfu/ml olacak şekilde dilüe edilir.
- 5- Enjeksiyon öncesi larvalar %70 etanol ile temizlenir.
- 6- İnsülin iğnesi kullanılarak 10 µl (10⁵ cfu/ml) bakteri larvanın sağ tarafındaki sondan ikinci ayağına enjeksiyonla verilir. Bu işlem iki larvaya uygulanır, 3. larvaya bakteri verilmez.
- 7- Larvalar ayrı petrilere alınır ve 37°C'de 1 saat bekletilir.
- 8- Bakteriyle enfekte larvalardan bir tanesine yine insülin iğnesi ile 10 µl (>10⁸ pfu/ml) faj, larvanın sol tarafındaki sondan ikinci ayağa enjekte edilir (Böylece, tedavi grubu: Bakteri+Faj olur).
- 9- Diğer enfekte larvaya yine sol tarafındaki sondan ikinci ayağa 10 µl fajsız SM buffer enjekte edilir (Böylece, enfeksiyon kontrol grubu: yalnızca bakteri olur).

10- Son olarak, fajın toksik etkisinin kontrolü için enfekte edilmemiş larvaya 10 µl faj enjekte edilir (Böylece, faj kontrol grubu: yalnızca faj olur).

11- Daha sonra larvalar, ayrı petriyeler içerisinde 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır.

12- Ertesi gün larvaların canlılığı kontrol edilir. Dokunmaya yanıt olarak hiçbir hareket olmadığında larvalar ölü olarak kabul edilir. Ayrıca larvalardaki melanizasyona da bakılarak enfeksiyonun ilerlemesi yorumlanacaktır.



Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Tamponların Hazırlanması

Luria Bertani (LB) -Yumuşak Agar (0,5% w/v agar)

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 5 gr/L agar agar karışımı yeterli miktara distile su ile çözdürüldükten sonra son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl₂ ilave edilir. Hazırlanan LB-Yumuşak Agar besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir. Akabinde 55-60°C'ye soğutulur ve steril cam tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılıp pamuk ile ağızları kapatılır.

Luria Bertani (LB) -Alt Agar (1,5% w/v agar)

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 15 g/L agar agar karışımı yeterli miktarda distile su ile çözdürüldükten sonra son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl₂ ilave edilir. Hazırlanan LB- Alt Agar besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir ve akabinde ~20 ml olacak şekilde steril petrilere dökülür.

Luria-Bertani (LB) Broth

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L olacak şekilde hazırlanan karışım yeterli miktara distile su ile çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

10X Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu pH:8

Trizma Base: 108 g

Borik Asit: 55 g

EDTA: 8.3 g

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülür ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 8'e ayarlandıktan sonra 121 °C 15 dk süre ile otoklavlanarak sterilize edilir.

0,5 X TBE Tamponu

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan 10x TBE tamponunun 50 ml'si bir mezüre alındıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlanarak seyreltilir.

Saline Magnesium buffer (SM buffer)

1 M Tris-HCl (pH 7.5) den 50 ml, 5.8 g NaCl ve 2g MgSO₄7H₂O 1 litreye tamamlanarak distile suda çözülür ve ardından 121 °C 15 dk süre ile otoklavlanarak sterilize edilir.

Galleria mellonella larvaları için büyüme ortamı ve hazırlanışı

Malzeme listesi (1 porsiyon, yaklaşık 3 kavanoz):

- 220g mısır unu
- 220g buğday unu
- 110g süt tozu
- 110g bal (süzme)
- 110g gliserin
- 55g pakmaya
- 175g balmumu

Hazırlanışı:

- 1- Mısır unu, buğday unu ve süt tozu tartılıp büyük bir kap içerisine alınır.
- 2- Bal, gliserin ve maya cam bir kap içerisinde yavaşça karıştırılarak ısıtılır (ısıtma bloğu üzerinde).
- 3- Balmumu ayrı bir cam kap içerisine tartılıp mikrodalga fırında eritilir
- 4- Kap içerisindeki unlar üzerine ısıtılan karışımlar dökülür.
- 5- Karışımlar hamur kıvamını alana kadar iyice yoğrulur ve kavanozlara eşit şekilde porsiyonlanır.

Faj Genom Analizi

Faj genom analizinde kullanılacak kullanıcı dostu 2 platform vardır. Bunlar Kbase (<https://www.kbase.us/>) ve PATRIC (<https://www.bv-brc.org/>) platformlarıdır. Bu çalışmada Kbase platformu üzerinden ham verilerde kalite kontrolün gerçekleştirilmesi ve filtreleme, assembly işlemleri gerçekleştirilecektir. Bu platformdan elde edilen çıktı PATRIC'te anotasyon ve proteom karşılaştırma işlemleri gerçekleştirilecektir. Kullanacağımız ham veriler Illumina sekanslama sonucunda elde edilmiştir ve fastq formatındadır.

Ham verilerde (raw data) kalite kontrolün gerçekleştirilmesi ve filtreleme

Öncelikle ham verilerin Kbase platformuna yüklenmesi gerçekleştirilecektir. Illumina sekanslaması sonucunda forward ve reverse olarak tanımlanabilen 2 ayrı fastq dosyası bize sunulacaktır. Her bir dosya single end library olarak tanımlanmaktadır ve non-interleaved formdadırlar. Bu 2 single end librarydeki okumalar birbirlerine complement haldedir. Bu sebeple, onları paired end (çift uçlu) library haline getirilecektir. Çift uçlu okumanın avantajı, genomdaki çeşitli okumaların farklı konumlarını tanımlama yeteneğini geliştirerek, gen eklemeleri, silmeleri veya inversiyonları gibi yapısal yeniden düzenlemeleri çözmede tek uçlu okumaya göre çok daha etkili olmasıdır. Kütüphaneyi sisteme yükleme ve çift uçlu kütüphane

haline getirme işleminden sonra FastQC programı ile kalite analizi yapılacaktır ve FastQC raporu elde edilecektir. Bu rapor analiz edilen okuma için dosya adı, dosya türü, kodlama, toplam diziler, düşük kalite olarak işaretlenen dizilerin sayısı, dizi uzunluğu ve %GC gibi istatistikler sağlar.

Filtreleme işlemi için platformda bulunan Trimmomatic programı kullanılacaktır. Bu program okumalarda bulunan adapter sekanslarını ve düşük kalite olarak işaretlenen sekansları kütüphaneden çıkarır. Böylece, çıktı olarak sağlanan dosya yüksek kaliteli sekansları ve genoma ait sekansları içerir. Çıktı fastq formatındadır.

Assembly

Önceki adımda elde edilen yüksek kaliteli sekans (.fastq) assembly gerçekleştirilecektir. Bunun için 3 farklı assembly araçları kullanılacaktır ve fasta formatında contigler elde edilecektir. Farklı araçlardan elde edilen contigler QUAST kullanılarak değerlendirilecektir. QUAST raporunda en uzun contig boyutu, oluşan contig sayısı, GC%'si, N50 ve L50 değerleri bulunacaktır. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren assembly aracından sonuçlar fasta formatında kaydedilecektir. Oluşan contigler BlastN ile araştırılacaktır ve faj genomunun bulunduğu contig sonraki aşamalarda kullanılacaktır.

Anotasyon

- 1) Önceki aşamada assembly ile oluşturulan faj genomuna ait DNA sekansının anotasyonu PATRIC platformunda bulunan RAST aracı ile gerçekleştirilecektir. Fasta formatındaki contig platforma "contig" tipinde yüklenecektir. Daha sonra anotasyon tipi bakteriyofaj olarak seçilecektir. Taksonomi ismi Bacteriophage sp. (38018) veya tahmin edilen bir bakteriyofaj türü varsa onun adı girilerek seçilir. Çıktının ismi ve depolanacağı belirlendikten sonra anotasyon başlatılır. Bu işlem sonucunda platform bize anotasyonu gerçekleştirilmiş olan faj genomuna farklı formatlarda dosyalar (.gb, .gff, .genome, .embl) verir. Bunların yanı sıra anote edilmiş DNA fragmanlarının DNA sekansı ve kodlanan proteinlerin amino asit sekansı fasta formatında verilir.
- 2) tRNA'ların tespiti için tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) aracı kullanılacaktır. Fasta formatındaki contig sisteme yüklenecek ve default modda araç çalıştırılacaktır. Çıktı olarak genomda kodlanan tRNA'lar ve lokasyonları ile anti-kodon sekansı bu noktada belirlenecektir. tRNA tespitini RAST aracı da yapmaktadır. Bu sebeple, karşılaştırarak doğrulamak yeterlidir.

- 3) Genom içerisinde istenmeyen genlerin varlığı (antibiyotik direnç genleri ve virulans genler) VirulenceFinder 2.0 ve ResFinder 4.1 programları ile taranacaktır.
- 4) Anotasyon sonucunda hipotetik protein olarak atanmış proteinlerin fonksiyonuna dair tahminler 2 farklı yolla yapılacaktır. İlki homoloji gösteren proteinlerin tespiti ile fonksiyonun belirlenmesidir ve bu amaçla BlastP aracı kullanılabilir. İkincisi, protein içerisinde bulunan proteinlerin içerisindeki domainler tespit edilecek ve fonksiyon tahmini yapılacaktır. Protein domain veritabanı olarak Pfam kullanılacaktır.

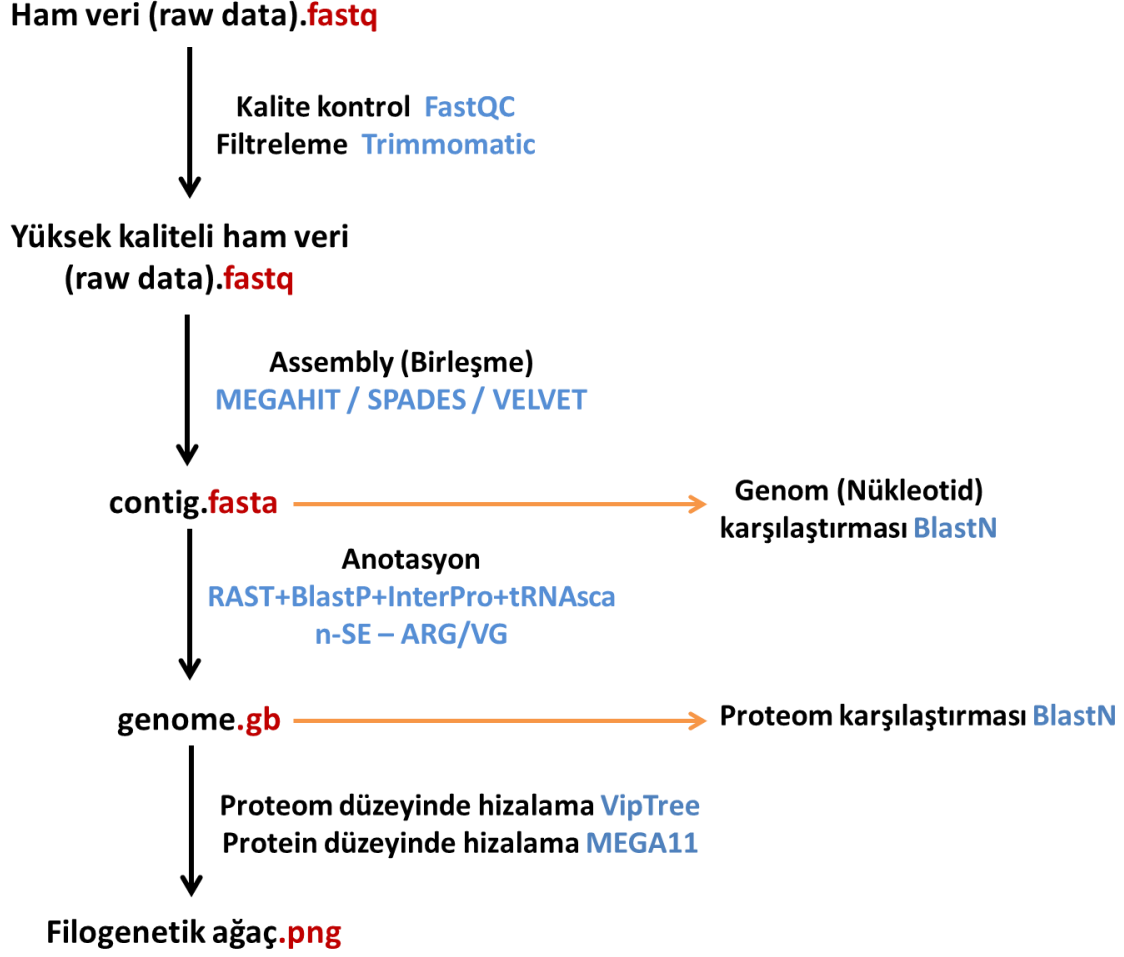
Genom karşılaştırması

Bizim faj genomumuza en benzer genomların tespiti için BlastN aracı kullanılacaktır. Karşılaştırılacağı veritabanında nükleotid koleksiyonu (nr/nt) seçilecektir ve megablast programı ile karşılaştırma yapılacaktır. Yüksek benzerlik ve query coverage gösteren fajlar belirlenecektir. Genom benzerliği en yüksek olan faj genomu ile aralarındaki farklılıkların tespiti için proteome karşılaştırması yapılacaktır. Bunun için PATRIC'te elde ettiğimiz veriler kullanılacaktır. Proteome karşılaştırma başlığından referans olarak kendi faj genomumuzu seçecek ve karşılaştırılacak genom sekmesinden bir veya daha fazla (BlastN analizi ile belirlenmiş olan) genom seçilecektir ve program başlatılacaktır. Karşılaştırma sonucunu detaylı şekilde sağlayan .xls formatında dosya ve görsel olarak .svg formatında dosya çıktı olarak sağlanacaktır.

Filogenetik analiz

Filogenetik analiz için 2 farklı yöntem kullanılacaktır. Bir tanesi fajların major capsid proteininin amino asit sekansına dayalı olacaktır. Bunun için MEGA11 aracı kullanılacaktır. Öncelikle, filogenetik ağaç oluşturmada kullanılacak olan fajlara ait major kapsid proteinlerinin amino asit sekansları Genbankasından temin edilecektir. Amino asit sekanslarının hizalaması MUSCLE ile yapılacaktır. Filogenetik ağaç neighbor-joining metod ile oluşturulacaktır.

İkinci yöntemde VipTree programı kullanılacaktır. Bu program proteome düzeyinde referans faj sekanslarıyla veya kullanıcı tarafından temin edilen faj sekanslarıyla karşılaştırma yaparak filogenetik ağaç oluşturmaya imkan sağlamaktadır. Kendi faj sekansımız tek başına veya filogenetik analize dahil edilmesini istediğimiz faj genom sekanslarıyla birlikte sisteme yüklenecektir. Ardından, referans faj genomlarının (dahil edilmek istenirse) nükleik asit tipi ve konakları seçilecektir. Kalan parametreler default şekilde seçilecek ve işlem başlatılacaktır. Program sonunda bize sirküler ve dikdörtgenel şekilde 2 ağaç verilecektir.



Şekil 1. Faj genom analizi iş akışı. Mavi ile işaretlenenler kullanılan programı ve kırmızı ile işaretlenenler dosyanın formatını temsil etmektedir.

İletişim adresleri:

Abdulkerim KARAYNİR (kerimkaraynir@gmail.com),

Hanife SALİH DOĞAN (hanifesalih94@gmail.com),

Melis YALÇIN (mels.yalcin@gmail.com),

Mehmet AY TAR (maytar90@gmail.com),

Rümeysa Gülsu ÖZKAN (gulsuozkaann@gmail.com),

Yunus DOĞAN (yunus.dgn.09@gmail.com),

Zeynep ERDEM AYNUR (z.erdem.06@gmail.com),

Bülent BOZDOĞAN (bbozdogan@gmail.com)