

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

***Jantibacterium* sp. SUŞLARININ VİYOLASİN PİGMENTLERİNİN ANTİVİRAL,
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve Ayşe DOĞANCI

**Ocak 2022
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Jantibacterium* sp. SUŞLARININ VİYOLASİN PİGMENTLERİNİN ANTİVİRAL,
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve Ayşe DOĞANCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03 / 01 / 2022

Tezin Savunma Tarihi : 24 / 01 / 2022

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2022

ÖNSÖZ

“*Janthinobacterium sp.* Suşlarının Viyolasin Pigmentlerinin Antiviral, Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi, tecrübe, imkanlarını sunan ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun belirlenmesinde desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve tezimin antiviral kısmında bilgisi ile yol gösteren hocam Dr. Fulya AY ŞAL’a, teşekkürlerimi sunarım. Viyolasin’in ekstraksiyonunu gerçekleştirip tezim için benimle paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Hatice KATI’ya, biyofilmlere ilişkin bilgisini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK’e ve *E. faecalis* suşlarını paylaşan hocam Doç. Dr. Nefise AKÇELİK’e teşekkürü borç bilirim. Viyolasin’i saflaştırmada bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Nurettin YAYLI’ya ve arkadaşım Arş Gör. Gözde BOZDAL’a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bilgisini ve ilgisini esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ, Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER, ve Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a teşekkürlerimi sunarım. Tezimin istatistik kısmında ve yazım sürecimde düzeltmeler için yardımını esirgemeyen dostum Arş. Gör. Emine DUMAN ERBAŞ’a teşekkür ederim. Tez yazım sürecimde düzeltmeler için yardımını esirgemeyen hocam Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a teşekkür ederim. Tezimde kullandığım 16S filogenetik ağacı oluşturup benimle paylaşan arkadaşım Arş. Gör. Esmâ CEYLAN’a teşekkür ederim. Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma yardımları ve manevi desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim süresince iyi ve kötü her günümde bana maddi ve manevi destek olan, güç veren, motive eden canım *anneme*, *kardeşlerime* ve rahmete eren *babama* bana duydukları güven ve inanç sebebi ile minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Merve Ayşe DOĞANCI

Trabzon, 2022

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Janthinobacterium* sp. Suşlarının Viyolasin Pigmentlerinin Antiviral, Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 24/01/2022

Merve Ayşe DOĞANCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Viyolasin	2
1.3. Viyolasin'in Biyosentezi	3
1.4. Viyolasin'in Biyolojik Etkinlikleri.....	8
1.5. <i>Jantrobacterium sp.</i> 'nin Genel Özellikleri	13
1.6. Biyofilmin Tanımı ve Oluşumu	15
1.7. Biyofilm Oluşumunu Önleme Stratejileri	19
1.8. <i>Enterococcus faecalis</i>	19
1.9. <i>E. faecalis</i> Biyofilmi.....	21
1.10. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)	22
1.11. HIV Enfeksiyonu ve İnhibitörleri.....	22
1.12. HIV Reverse Transkriptaz (HIV RT) ve İnhibitörleri.....	24
1.13. Koronavirüs	25
1.14. Sars-CoV-2	26
1.15. Spike S1 ve ACE2'nin Enfeksiyondaki Rolü.....	28
1.16. Amaç ve Hipotez	33
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	35
2.1. Materyaller	35
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri	35
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Gelişim Koşulları	36
2.1.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı	36

2.1.3.1.	TSBG Besiyerinin Hazırlanışı.....	38
2.1.4.	Çözeltiler	38
2.1.5.	Kitler.....	40
2.1.6.	Antiviraller	40
2.1.7.	Bilgisayar Yazılımları	40
2.2.	Metot	40
2.2.1.	<i>Jantibacterium</i> sp GMG-1 ve <i>Jantibacterium</i> sp GK Bakterilerinden Kaba Viyolasin'in Elde Edilmesi	41
2.2.2.	<i>Jantibacterium</i> sp. GK Viyolasin'inin Saflaştırma	42
2.2.3.	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	44
2.2.4.	Antimikrobiyal Etkinlik Testi	44
2.2.5.	HIV-RT İnhibisyon Testi	45
2.2.6.	SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2-Biyotin İnhibisyon Testi.....	47
2.2.7.	Biyofilm Oluşumu İnhibisyonu Testi.....	50
2.2.8.	İstatistiksel Analizler	51
3.	BULGULAR	52
3.1.	İnce Kağıt Kromatografisi.....	52
3.2.	Minimum İnhibitör Konsantrasyon	53
3.3.	Antiviral Testler.....	57
3.3.1.	HIV-RT İnhibisyon	57
3.3.2.	SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2-Biyotin İnhibisyonu	59
3.4.	Biyofilm Oluşumu İnhibisyonu.....	61
4.	TARTIŞMA.....	68
5.	SONUÇLAR	76
6.	ÖNERİLER	77
7.	KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

Janthinobacterium sp. SUŞLARININ VİYOLASİN PİGMENTLERİNİN ANTİVİRAL, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve Ayşe DOĞANCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2022, 91 Sayfa

Bu çalışmada *Janthinobacterium* sp. GMG-1 ve *Janthinobacterium* sp. GK bakterilerinin doğal metaboliti olan Viyolasin pigmenti kaba ekstratlarının antimikrobiyal, antiviral ve biyofilm oluşum inhibisyonu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla antimikrobiyal analizler için CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) mikrodilüsyon yöntemi kullanılırken, antiviral analizler için HIV-1 RT inhibisyonu ve SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 Biyotin inhibisyon kitleri kullanıldı. Ayrıca biyofilm oluşumu inhibisyonunun araştırılmasında Gram pozitif bir bakteri olan *Enterococcus faecalis* 74, *E. faecalis* 29212 ve *E. faecalis* OG1RF suşları kullanıldı. GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstraktları, saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in, sırasıyla 0,8 mg/ml - 0,1 mg/ml, 2-0,05 mM ve 1,5-0,5 mM konsantrasyon aralıklarında, HIV-1 RT inhibisyon oranlarında ve Spike S1: ACE2 üzerinde konsantrasyona bağlı olarak inhibisyon oranında artışa neden oldu. Ayrıca GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstraktlarının (0,8- 0,1 mg/ml) *E. faecalis* biyofilm oluşumunu doz artışına bağlı olarak inhibe ettiği gözlemlendi. Sonuç olarak bu çalışma, *Janthinobacterium*'a ait GMG-1 ve GK suşlarından elde edilen Viyolasin'in antimikrobiyal, antiviral etkinliği olduğunu ve biyofilm oluşumunu engellediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Janthinobacterium* sp., Viyolasin, HIV-RT, SARS-Cov 2, *Enterococcus faecalis*, Biyofilm.

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF ANTIVIRAL, ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF VIOLACEIN PIGMENTS FROM *Jantynobacterium* sp.

Merve Ayşe DOĞANCI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2022, 91 Pages

In this study, it was aimed to investigate the antimicrobial, antiviral and biofilm formation inhibition effects of Violacein pigments crude extracts, which is the natural metabolite of *Jantynobacterium* sp. GMG-1 and *Jantynobacterium* sp. GK. For this purpose, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) microdilution method was used for antimicrobial analyses, while HIV-1 RT inhibition and SARS-CoV 2 Spike S1: ACE2 Biotin inhibition kits were used for antiviral analyses. In addition, the Gram positive bacteria *Enterococcus faecalis* 74, *E. faecalis* 29212 and *E. faecalis* OG1RF strains were used to investigate the inhibition of biofilm formation. GMG-1 and GK crude Violacein extracts, pure Violacein and Deoxyviolacein in the concentration ranges of 0.8 mg/ml - 0.1 mg/ml, 2-0.05 Mm, 1.5-0.5 mM respectively, caused concentration dependent increase in inhibition on HIV-1 RT and Spike S1: ACE2. Also, it was observed that GMG-1 and GK crude violacein extracts (0.8-0.1 mg/ml) inhibited biofilm formation of *E. faecalis* depending on the dose increase. In conclusion, this study suggests that Violacein obtained from GMG-1 and GK strains of *Jantynobacterium* has antimicrobial and antiviral activity and prevents biofilm formation.

Key Words: *Jantynobacterium* sp., Violacein, HIV-RT, SARS-CoV 2, *Enterococcus faecalis*, Biofilm.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Viyolasinin NMR yapısı	3
Şekil 2.	Viyolosin çekirdeğini oluşturan atomların biyosentetik orjinleri	4
Şekil 3.	Viyolasin biyosentezinin enzimatik yolağı	5
Şekil 4.	Viyolasin biyosentezinin enzimatik olmayan yolağı	6
Şekil 5.	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472' de Viyolasin biyosentezini kodlayan DNA' nın bölgesi (Varsayılan Transkripsiyonel terminatör (Ω) ve promotor (P) birlikte)	6
Şekil 6.	Viyolasin (1) ve Deoksiviyolasin'in (2) kimyasal yapısı	7
Şekil 7.	<i>Jantionobacterium</i> sp GK ve <i>Jantionobacterium</i> sp GMG-1 bakterilerinin 16S rRNA dizileme ile oluşturulan filogenetik ağacı	15
Şekil 8.	Biyofilm oluşum aşamaları	17
Şekil 9.	SARS-CoV-2 virüsünün yapısı, İnsan koronavirüs Spike proteini ve konak ACE2 reseptörü	26
Şekil 10.	Sars-CoV-2'nin hücreye girişini gösteren şema	29
Şekil 11.	SARS-CoV-2 Spike proteini ve ACE2 bağlanma aşamalarını gösteren şema	30
Şekil 12.	A. Trimerik Spike proteininin kapalı konformasyon yapısı ve kısımları. B. Konak hücreye girişte Spike (S) protein ve ACE2'nin etkileşim şeması	31
Şekil 13.	Soxhlet ekstrasyonu ile <i>Jantionobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasinin kısmi saflaştırılması	42
Şekil 14.	Saf Viyolasin eldesi için vakum sıvı kolon kromatografisi (VLCC) işleminin yapılışı	43
Şekil 15.	HIV-1 reverse transkriptaz kolorimetrik test kitinin çalışma prensibi	47
Şekil 16.	SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2-Biyotin test kitinin çalışma prensibini gösteren şema	49
Şekil 17.	<i>Jantionobacterium</i> sp. GMG-1 ve <i>Jantionobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin ekstesinin TLC sonuçlarının UV altındaki görüntüsü.	52
Şekil 18.	MİK için <i>Jantionobacterium</i> sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların hazırlanışı	54
Şekil 19.	<i>Jantionobacterium</i> sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Yersina pseudotuberculosis</i> ATCC 911 için MİK sonuçları.	54

Şekil 20.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Enterobacter cloacea</i> ATCC 13047, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ve <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 için MİK sonuçları.	54
Şekil 21.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633, <i>Pseudomonas aeroginosa</i> ATCC 27853, <i>Yersina pseudotuberculosis</i> ATCC 911 için MİK sonuçları.	55
Şekil 22.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin ekstraktına ait farklı konsantrasyonların <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Enterobacter cloacea</i> ATCC 13047, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ve <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 için MİK sonuçları.	56
Şekil 23.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 ve <i>Jantynobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin ekstraktlarına ait farklı konsantrasyonların <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 suşu için MİK sonuçları.....	56
Şekil 24.	Farklı konsantrasyonlardaki <i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 ve <i>Jantynobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin ekstrelerinin HIV-1 RT inhibisyon etkinliklerinin karşılaştırılması.	58
Şekil 25.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK Saf Viyolasin (V, açık renk) ve Deoksiviyolasin (DV, koyu renk) konsantrasyonlarının HIV-1 RT inhibisyonunu gösteren grafik.....	59
Şekil 26.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 and <i>Jantynobacterium</i> sp. GK kaba Viyolasin'lerinin farklı konsantrasyonlarının SARS-CoV-2 inhibisyon etkinliklerinin karşılaştırılması	60
Şekil 27.	Saf Viyolasin (V, açık renk) ve Deoksiviyolasin'in (DV, koyu renk) farklı konsantrasyonlarının SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 inhibisyon oranları.....	61
Şekil 28.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> 29212'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri	62
Şekil 29.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> 29212'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri	62
Şekil 30.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri.	64
Şekil 31.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri	64
Şekil 32.	<i>Jantynobacterium</i> sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> 74'ün 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri	66

Şekil 33. <i>Jantibacterium</i> sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin <i>Enterococcus faecalis</i> 74'ün 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri	66
---	----



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları.....	36
Tablo 2. Nutrient Broth ve Agar (Merck).....	36
Tablo 3. Muller Hinton Agar (Merck)	36
Tablo 4. Katyon Ayarlı Muller Hinton Broth (HiMedia)	37
Tablo 5. Tryptic Soy Broth ve Tryptic Soy Agar	37
Tablo 6. Fosfat Tuzu Tamponu (PBS- Phosphate Buffer Saline).....	38
Tablo 7. Fizyolojik Tuz Çözeltisi (% 0.9)	38
Tablo 8. Kristal viyole çözeltisi (%1)	38
Tablo 9. 1 Normal(N)Hidroklorik Asit (HCl).....	39
Tablo 10. % 33' ük Asetik Asit.....	39
Tablo 11. Mikrodilüsyon metodu ile antimikrobiyal etkinliği belirlemek için kullanılan mikroorganizmaların listesi	44
Tablo 12. HIV-RT İnhibisyon test kiti çalışmasında kuyucuk içerikleri.....	45
Tablo 13. Spike S1(SARS-CoV-2): ACE 2 test kiti çalışmasında kuyucuk içerikleri	47
Tablo 14. <i>Jantınobacterium</i> sp. GMG-1 ve GK suşlarına ait kaba Viyolasin ekstrelerinin MİK değerleri	52

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

° C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
agg	: Agregasyon Maddesi
ACE2	: Angiotensin Dönüştürücü Enzim 2
AIDS	: Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
Ang II	: Angiotensin II
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
AI-2	: Otoindükleyici-2
AIP	: Otoindükleyici protein/Auto Inducer Protein
APN	: Aminopeptidaz N
ARDS	: Akut Solunum Depresyonu Sendromu
<i>asaI</i>	: Yüzey Agregasyon Proteini
CCR5	: Kemokin Reseptör Tip 5
CD4	: Yardımcı T Hücreleri
CLSI	: Clinical Laboratory Standarts Institute
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı
CXCR4	: Kemokin Reseptör Tip 4
<i>cylB</i>	: Sitolizin B
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPP4	: Dipeptidil peptidaz 4
DV	: Deoksiviyolasin
EC50	: Efektif doz/ konsantrasyon 50
eDNA	: Ekstraselüler/ Çevresel DNA
efaA	: Endokardite özgü antijen A
EPS	: Ekstraselüler polisakkarit

FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
Fe ⁺²	: Demir 2 iyonu
<i>gelE</i>	: Jelatinaz geni
HAART	: Yüksek Düzeyde Aktif Terapi
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IC ₅₀	: İnhibitör Konsantrasyon % 50
IN	: İntegraz
INTSI	: İntegraz İnhibitörleri
IPA	: İndol 3 Pirüvik Asit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LNP-mRNA	: Lipit Nanı Partikül Mesajcı Ribonükleik Asit
MBEK	: Minimum Biyofilm Eradike / Yok Eden Konsantrasyon
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MERS-CoV	: Orta Duğu Solunum Sendromu Virüsü
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normalite
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NK	: Nükleokapsit Proteini
NRTI	: Nükleozit Reverse Transkriptaz İnhibitörü
NNRTI	: Nükleozit Olmayan Reverse Transkriptaz İnhibitörleri
PBS	: Fosfat Tamponu Tuzu
PDB	: Protein Veri Bankası
PI	: Proteaz İnhibitörleri
p51	:RT' ın Alt Birimi

p66	:RT'ın DNA Bağlanma Bölgesi
pINT	: <i>p</i> -Iodonitrotetrazolium klorür
RBD	: Reseptör Bağlanma Domaini
RNA	: Ribonükleik Asit
RSV	: Respiratory SyncytialVirus/ Solunum Sinsityal Virüs
RT	: Reverse/Ters Transkriptaz
QQ	: Quarum Quenching/ Yeterli Sayı Algılamanın İnhibisyonu
QS	: Quarum Sensing/ Yeterli Sayı Algılama
TMPRSS2	: Transmembran Proteaz Serin 2
TSB	: Triptik Soy Broth/ Sıvı besiyeri
TSBG	: Triptik Soy Broth/ Sıvı ve Glukoz besiyeri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
V	: Viyolasin
VLCC	: Vakum Sıvı Kolon Kromatografisi
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hayatı tehdit eden bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların artan prevalansı ve insan patojenleri arasında yer alan bu mikroorganizmalar, mevcut tedavi stratejilerine karşı direnç geliştirme yetenekleri, bu canlılar ile mücadele etmeyi gerektirmektedir. Bu hususta yeni bileşiklerin bulunmasına ve bu bileşiklerin geliştirilmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bileşiklerin, düşük toksisite, spesifik aktivite ve yüksek biyoyararlanıma sahip olmaları nedeniyle en güçlü adaylar doğal kaynaklardan (hayvan, bitki ve mikroorganizmalar) elde edilen bileşiklerdir (Stan vd., 2021).

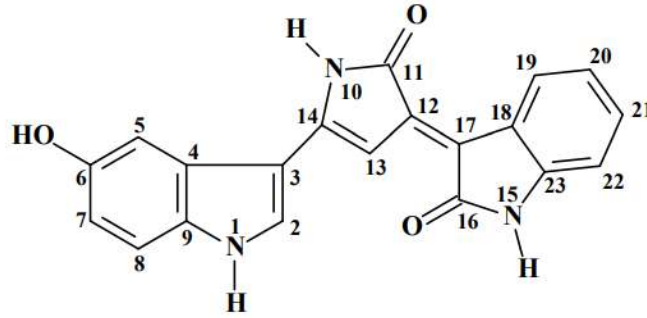
Birbirine yapışmış ve kendi ürettiği hücre dışı polimerik matris (EPS) ile çevrelenmiş mikrobiyal hücreler tarafından oluşturulan, canlı veya hareketsiz bir yüzeye bağlı yapılandırılmış topluluklar, biyofilm olarak adlandırılır (Wu vd., 2015). Biyofilmler, olumsuz koşullar altında bakterilerin hayatta kalması için önemlidir (Guan vd., 2015). Biyofilm oluşturan bakterilerin gıda ürünlerine veya ürünlerin temas ettiği yüzeylere tutunması hem ekonomik kayıplara hem de gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkların artmasına neden olur (Winkelströter vd., 2014). Cihazlarla ilgili biyofilm temelli enfeksiyonlardan muzdarip çok sayıda hasta nedeniyle, son yirmi yılda bunların önlenmesi için bir dizi strateji geliştirilmiştir. Mikrobiyal tutunmayı önleme ve oluşan biyofilm yapısını yok etme amaçlı antimikrobiyal veya hidrofobik maddelerle kaplanmış ürünlerin geliştirilmesi, bakterilerin çevresel algılama sinyalleri ve yolaklarını bozmaya yönelik uygulamalar, ultrasonikasyon gibi fiziksel uygulamalar, bakteriyofajlar ile çeşitli antimikrobiyaller ile kombine çalışmalar verilebilir (Francolini ve Donelli, 2010). Ancak bu uygulamaların hiçbiri tek başına yeterli olmamıştır. Bununla birlikte biyofilm tabakası ile çevrelenmiş organizmaya uygulanan antimikrobiyal maddelerin çoğu bu tabakayı aşp hücrelere erişemediği veya kısmi olarak erişebildiği için, çok daha yüksek dozda uygulamalar yapmayı gerektirir ya da tamamen etkisiz kalır. Bu nedenle biyofilm oluşumunun engellenmesi için etkin madde arayışları halen devam etmektedir (Balcazar vd., 2015 ve Anderson vd.,2016).

HIV RT inhibitörleri, AIDS tedavisi için önemli ilaçlardır ve yeni inhibitörleri belirleyebilmek için doğal bileşikler taranmaktadır. Farklı kaynaklardan (mikroorganizmalar, bitkiler ve deniz canlıları gibi) elde edilen doğal bileşikler, HIV RT enzimini inhibe edebilir (Matthee vd., 1999). Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, COVID-19 patojenlerinin farklı bileşenleriyle mücadele etmek için potansiyel farmakolojik madde kaynakları olarak geniş çapta önerilmiştir (Kumar vd., 2020). 2019 yılının Aralık ayından bu yana yaşanan küresel salgında COVID-19 hastalığı etmeni SARS-CoV-2 sebebiyle her gün binlerce insan ölmeye devam etmektedir (Paidi vd., 2021). SARS-CoV-2 virüs enfeksiyonu 1918 yılındaki grip salgınından sonra enfeksiyon kaynaklı hastalık ve ölümlerin en büyük nedeni haline gelmiştir (Nishima ve Kulik, 2021).

Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında *Jantionobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantionobacterium* sp. GK bakterilerinden elde edilen sekonder bir metabolit olan Viyolasin'in antimikrobiyal, antioksidant, antiviral ve anti biyofilm etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Viyolasin

Viyolasin'in (Şekil 1) moleküler ağırlığı 343,33 g/mol ve açık formülü $C_{20}H_{13}N_3O_3$ tür. Morumsu siyah renkli, iğne prizması şekilli, suda çözünmeyen, etanolde çok az çözünebilir, dioksan ve aseton ile orta derecede çözünebilir, DMSO, etil asetat ve metanol ile tamamen çözünebilir bir bisindol türevidir. İki molekül triptofanın kondensasyonu sonucu oluşur (Hoshino vd., 1987). Erime noktası, 290 °C olup UV-Vis görünür absorpsiyon spektrumu, etanolde 258, 372 ve 575 nm'de ($\epsilon_{575} = 2.97 \pm 0.09 \times 10^{-2}$ ml/ μ g/cm) maksimum absorpsiyonları sergiler (Rettori ve Duran, 1998). 575 nm'lik bir uyarma dalga boyundaki floresan emisyon spektrumunda, 675 nm'de (etanol içinde 1,5 μ g/ml, 4,4 μ M) bir emisyon bandı gösterir. Metanolde maksimum absorpsiyon, 585 nm'dedir (Blosser ve Gray, 2000).



Şekil 1. Viyolasin'in NMR ile oluşturulan yapısı (Batista vd., 2017).

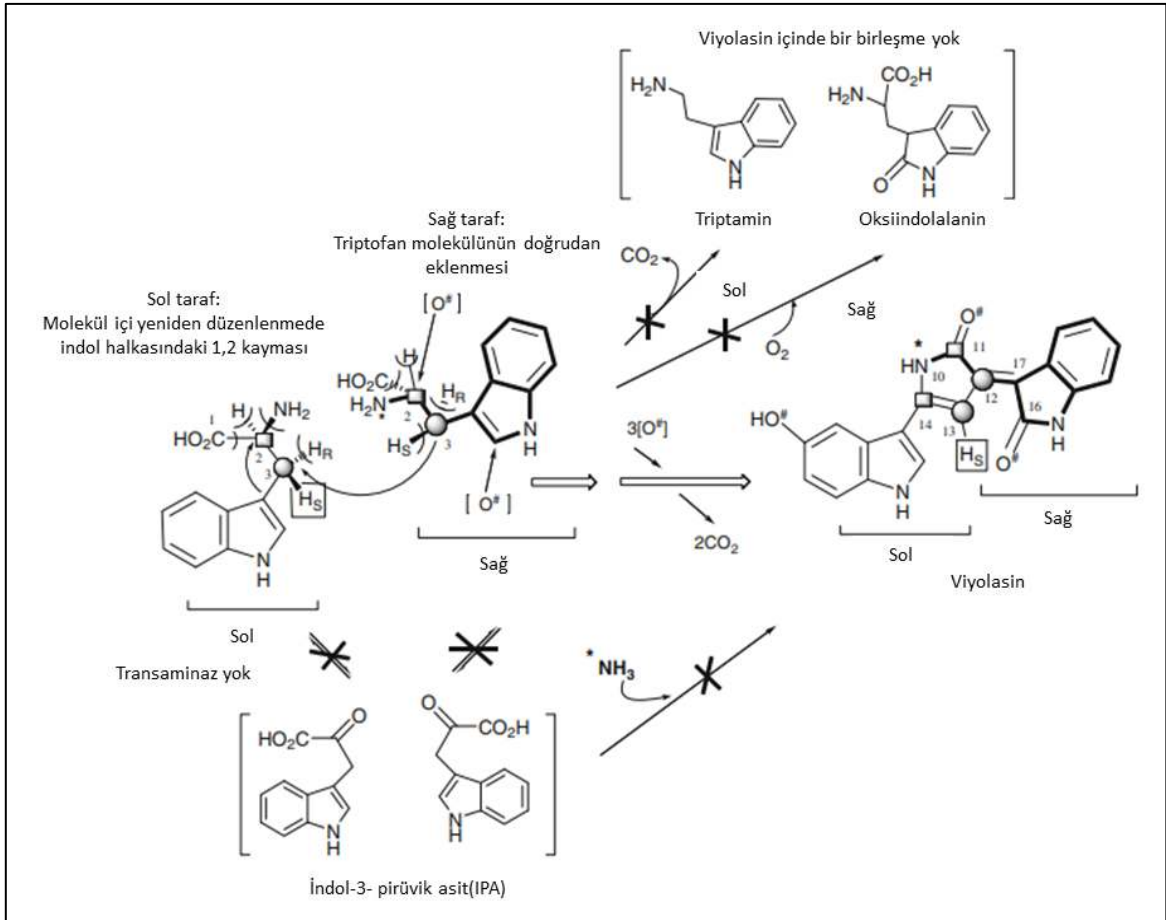
İlk olarak 1882 yılında Boisbaudran tarafından bakteri kültüründen ekstre edilmiş ve absorpsiyon spektrumu kaydedilen mor renkli pigmentin, sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *Chromobacterium violaceum*'dan elde edilen kristal Viyolasin ile benzerliği tespit edilmiştir. Ayrıca Ballantine vd. (1958) tarafından Viyolasin analogu olan Deoksiviyolasin sentez edilmiştir. DeMoss ve Evans (1959) refere ettikleri mavi ve mor bileşenlerin, Viyolasin (5-hidroksiindolil türevi) ve Deoksiviyolasin (5-(3-indolil) -3- (3-oksindol iliden) - 2 oksopiridin) olduğu kesin olarak belirlenmiştir (DeMoss, 1967). Viyolasin, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Collimonas* ve *Pseudoalteromonas* dahil olmak üzere çeşitli çevrelerde yaşayan farklı cinslere ait bakteri suşları tarafından üretilir (Baricz vd., 2018). Örneğin *Janthinobacterium* bir buzuldan, *Chromobacteria* bir nehirde, *Duganella* tarım ve orman topraklarından ve *Collimonas* denizden izole edilmiştir (Fang vd., 2015). *Chromobacterium violaceum* bakterisinden elde edilen Viyolasin çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle tıp, kozmetik ve tekstil gibi endüstriyel pazarlarda artan öneme sahip çok yönlü bir pigmenttir (Duran vd., 2012).

Viyolasin üretimi mikroorganizmaların çevresel strese karşı verdiği bir yanıttır ve organizmanın dışarıdaki tehlikelerden korunmasına katkıda bulunur (Pantenella vd., 2007).

1.3. Viyolasin'in Biyosentezi

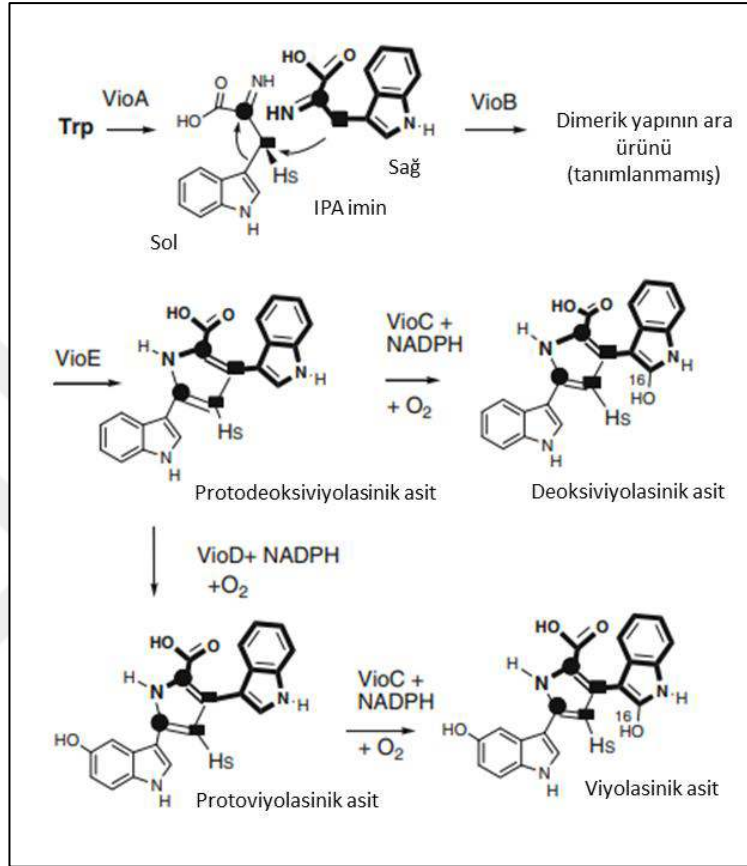
Viyolasin'in yapısı üç birimden oluşur: 5 - hidroksiindol, oksindol ve 2 - pirolidon. Pirolidon çekirdeğindeki hidrojen, azot ve karbonun biyosentetik kökenleri (Şekil 2), çeşitli kararlı izotopik olarak etiketlenmiş triptofanlar (Trp) kullanılarak yapılan besleme/doyurma deneyleriyle oluşturulmuştur. CH₂'nin Pro-S hidrojeni, biyosentez sırasında triptofanın 3.

pozisyonunda tutulur. Azot atomu yalnızca α -amino grubundandır ve iskelet karbon atomları iki Trp molekülünün yan zincirlerinden kaynaklanır. Viyolasin çekirdeğindeki üç oksijen atomunun tamamı moleküler oksijenden türetilmiştir. Biyosentetik mekanizmanın en ilginç yanı, Viyolasin iskelesinin sol tarafındaki indol çekirdeğinin 1-2 kaymasıdır. Alternatif triptofan molekülü, Viyolasin çekirdeğinin sağ tarafına doğrudan eklenmiştir. Bu indol kayması, çok sayıda doğal ürün izole edilmiş olmasına rağmen sadece Viyolasin biyosentezinde gözlemlenmiştir.

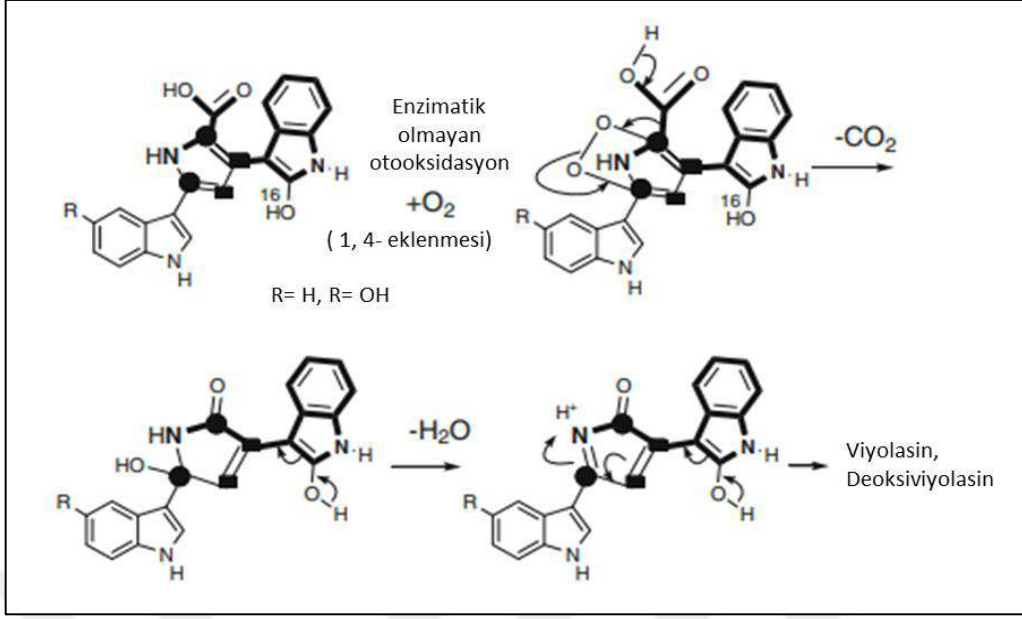


Şekil 2. Viyolasin çekirdeğini oluşturan atomların biyosentetik orijinleri. Tüm karbon ve azot atomları sadece iki molekül triptofandan kaynaklanır. Üç oksijen atomu moleküler oksijenden kaynaklanır. İkinci ve üçüncü karbonu işaretli Trp ile indol halkasının sağ ve sol tarafındaki 1-2 kayması belirlenmiştir. Viyolasin çekirdeğinin 13. pozisyonundaki Hidrojen atomu, Trp' nın 3. pozisyonundaki CH₂ grubunun pro-S hidrojeninden gelmektedir. Bu durum IPA (İndol 3 pirüvik asit), Triptamin ve Oksiindolamin' in ara ürün olmadığını gösterir. Trp'nin 2-C13 ve α -N15 doyurulması ile etiketlenmiş Viyolasin türlerinin etiketlenen pozisyonları ve ürün oranlarının detaylı analizleri Trp'nin Viyolasin çekirdeğine katılımının çekirdeğin sağ tarafından olduğunu göstermiştir (Hoshino, 2011).

Viyolasin biyosentezinde beş enzim (VioABCDE) tarafından katalize edilen enzimatik süreç (Şekil 3) ve enzimatik olmayan alternatif oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonları (Şekil 4) olmak üzere iki bağımsız süreç söz konusudur (Hoshino, 2011).

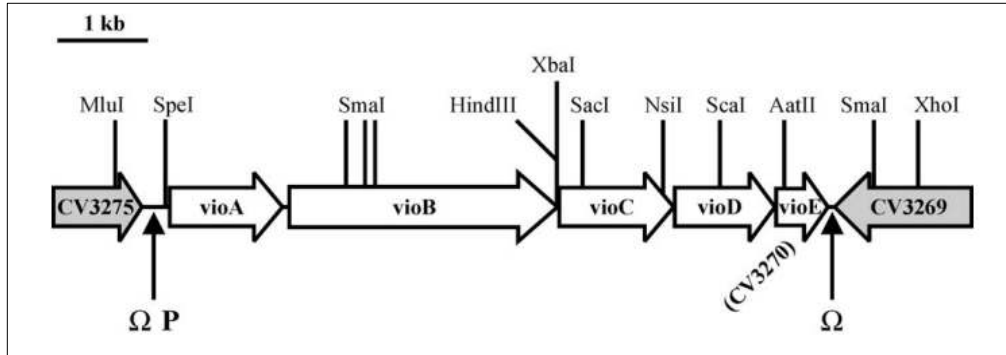


Şekil 3. Viyolasin biyosentezinin enzimatik yolağı (Hoshino, 2011).



Şekil 4. Viyolasin biyosentezinin enzimatik olmayan yolağı (Hoshino, 2011).

Viyolasin'in biyosentetik kökenleri ve mekanizmaları, kararlı izotopik olarak etiketlenmiş öncülerin beslenme deneyleriyle kesin olarak ortaya çıkarılmıştır. Ek olarak, biyosentetik gen kümesinin (Şekil 5) izolasyonu, *Escherichia coli*'deki fonksiyonel ekspresyon ve doğru biyosentetik ara ürünün izolasyonu, triptofandan (Trp) esaslı biyosentetik yolda dikkate değer ilerlemeler sağlamıştır (Hoshino, 2011).



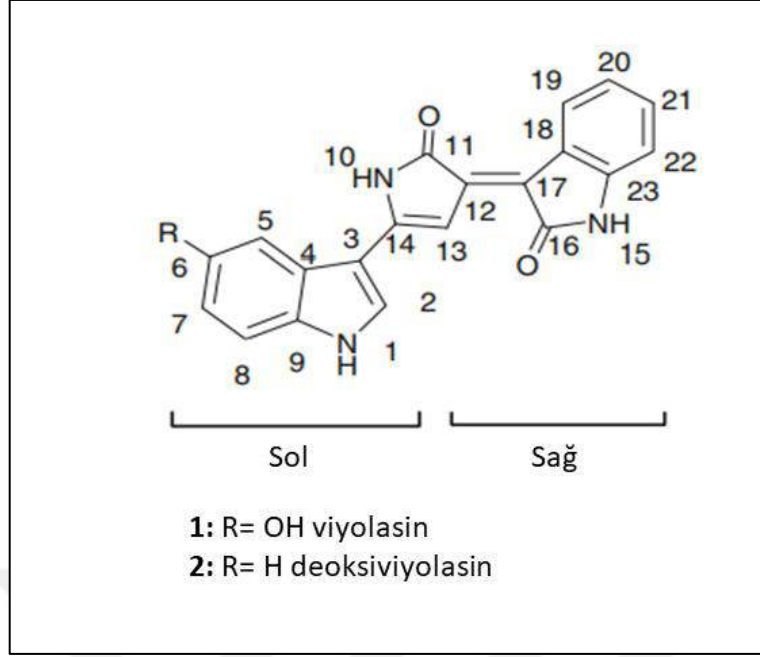
Şekil 5. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'de Viyolasin biyosentezinin kodlayan DNA bölgesi (Varsayılan Transkripsiyonel terminatör (Ω) ve promotor (P) birlikte) (Sánchez vd., 2006).

Hoshino vd., *Chromobacterium violaceum* (JCM1249 veya ATCC12472; NCBI erişim numarası AB032799)'daki biyosentetik sentezden sorumlu yaklaşık 9 kb'lık gen

kümesini pVBG04 olarak adlandırılan vektöre aktarmışlardır ve aynı zamanda August vd. (2000) Viyolasin biyosentezi için VioABCD adı verilen 4 enzimin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu dört enzim *E. coli*' de ifade edilmesine karşın ortama triptofan eklendiğinde Viyolasin üretimi görülmemiştir. Sánchez vd., (2006) yaptıkları çalışma ile VioE' nin Viyolasin biyosentezi için temel olan 21,8 KDa'luk küçük bir proteinin sentezinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Hoshino, 2011).

Viyolasin'in yapısı $\text{VioA} \rightarrow \text{VioB} \rightarrow \text{VioE} \rightarrow \text{VioD} \rightarrow \text{VioC}$ biyosentetik yolağı ve ardından oksidatif dekarboksilasyonun enzimatik olmayan reaksiyonlarıyla beraber altı adımdan oluşur. VioA, VioC ve VioD flavin bağımlı oksijenazlardır (Hoshino, 2011). NADPH, VioC ve Vio D' nin katalitik etkisi için gereklidir. VioC ve VioD tarafından katalize edilen iki oksijen atomunun birleşmesi dikkat çekicidir, ancak kalan oksijen atomu 2-pirolidon çekirdeğine enzimatik olmayan bir şekilde eklenir. Viyolasin biyosentezinde içinde Fe^{+2} iyonu bulunan VioB dışında hiçbir metal iyonu yer almaz. VioB, iki Trp molekülünün benzilik β -karbonları arasındaki C-C bağ oluşumundan kaynaklanan dimerik yapıyı (indole-3-pirüvik asit imin) veren bir hem proteinidir; ancak, VioB' nin aktivitesi sonucu oluşan ürünün tam yapısı (VioE' nin substratı) belirlenememiştir (Hoshino, 2011; Füller vd., 2016)

Fizyolojik koşullar altında, Viyolasin biyosentetik yolağı ayrıca deoksiviyolasin oluşumu ile sonuçlanır. 5. pozisyonda hidroksil grubundan yoksun olan Deoksiviyolasin, VioD' nin katılımı olmadan sentezlenir; bu durumda VioC substrat tanıma için belirli bir derecede esneklik gösterebilir (Füller vd., 2016).



Şekil 6. Violasin (1) ve Deoksiviyolasin'in (2) kimyasal yapısı (Hoshino, 2011).

1.4. Violasin'in Biyolojik Etkinlikleri

Viyolosinin çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Bunlar; antibakteriyel (O'sullivan vd., 1990; Duran vd., 2012, Asencio vd., 2014), antileishmanial (Leon vd., 2001), antiviral (May vd., 1991; Andrighetti-Frohner, 2003), antitümoral (Bromberg vd., 2010) antiinflamatuvar (Duran vd., 2016), antilösemik (Ferreira vd., 2004), antimikobakteriyel (Duran vd., 2007), antifungal, antiparazitik, antiprotozoal, antioksidant, antinosiseptif, immünmodulator ve antiülserojenik (Duran vd., 2012) aktivitelerdir.

Viyolasin'in inhibisyon etkisi üzerine yapılan farklı çalışmalarda, orta derecede dirençli olan *Clostridium welchii* hariç gram pozitif bakterilerin üremesi üzerinde güçlü inhibitör etkisinin olduğu ve oldukça duyarlı olan *Neisseria meningitidis* hariç gram negatif bakterilerin üremesi üzerinde hafif inhibisyon sağladığı bildirilmiştir (Duran vd., 2012). Viyolasin'in gram pozitif bakterileri hangi mekanizma ile öldürdüğünü anlayabilmek için Cauz vd. (2019) *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Floresan mikroskopisi çalışmaları sonucunda Viyolasin'in membran geçirgenliğini önemli ölçüde arttırarak boşluklar ve yırtıklar oluşturduğu ancak membran geçirgenliği tamamen bozulmuş olsa da her iki hücrenin biçimlerini korumaya devam

ettikleri görülmüştür. Bu durumun sonucu olarak Viyolasin'in hücre duvarı üzerine bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. *In vitro* deneyler ile ticari ve bakteriyel fosfolipitlerle üretilen lipozomlara doğrudan bağlanarak lipozomların yapılarını ve geçirgenliklerini bozduğunu gözlemişlerdir. Buna ek olarak Viyolasin'in çift katmanlı lipitlere nasıl yerleştiğini anlamak için moleküler dinamik simülasyonları kullanmışlardır.

Cazoto vd. (2011) sığır matistisine neden olan *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* suşlarını izole etmiş ve bu suşlar üzerinde Viyolasin'in tekil olarak ve farklı antibiyotik gruplarıyla sinerjistik olarak anti-bakteriyel etkinliği test etmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Viyolasin'in *E. coli* suşları üzerinde 200 μM 'a kadar etkinlik gösteremediği tespit edilmiştir. Buna karşın *S. aureus* suşları üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri 6,25 - 25 μM aralığındadır. Viyolasin'in en düşük MİK konsantrasyonu başka bir anti-mikrobiyalin en düşük konsantrasyonu birleştirildiğinde büyümeyi inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Batista vd. (2017) *Chromobacterium violaceum*'dan elde ettikleri Viyolasin'in, planktonik kültürlerde ve biyofilm oluşumunda *S. aureus*'u inhibe etme ve öldürmede mükemmel antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Viyolasin'in minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) olan 5 $\mu\text{g/ml}$ 'ye, 3 - 4 saatlik maruziyetten sonra *S. aureus*'un ölümüne neden olmuş ve Viyolasin'in minimum inhibitör konsantrasyonunun (1,25 $\mu\text{g/ml}$) temasın ilk 8 saati içinde bakteri üremesini engellediği belirlenmiştir. Viyolasin'in *S. aureus*'un olgun biyofilmi için doğrulanmış yüksek konsantrasyon (40 $\mu\text{g/ml}$) ihtiyacının aksine, biyofilm oluşumunda düşük konsantrasyonunun (1,25 $\mu\text{g/ml}$) güçlü inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir.

Dodou vd., (2017) *C. violaceum* ATCC 12472' den ekstrakte ettikleri Viyolasin'le yaptıkları çalışmada *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmayan suşları (ATCC 35984 ve ATCC 12228) üzerinde mükemmel anti-mikrobiyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada; kısa süreli maruziyette bakteriyostatik (MİK = 20 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$) ve bakterisidal (MBK = 20 $\mu\text{g/ml}$ her iki suş için) etkisi görülmüştür. Viyolasin'in bakteriyosidal konsantrasyonuna 2 - 3 saatlik maruziyette *S. epidermidis*'in öldüğü gözlenmiştir. Ek olarak, Viyolasin'in *S. epidermidis* ATCC 12228 (% 81,8; n = 9) ve *S. epidermidis* ATCC 35984 (% 54,5; n = 6) üzerinde farklı antibiyotik sınıflarının aktivitesini sinerjistik olarak modüle ettiği ve bu antibiyotiklerin MİK değerini 16 kat düşürdüğü belirlenmiştir.

Kanelli vd., (2018) *Jantibacterium lividium*' dan elde ettikleri Viyolasin metanol ekstraktını DMSO ile çözerek 50 mg/ml stok konsantrasyon oluşturmuş ve bu stoktan hazırlamış oldukları farklı konsantrasyonlarla *S. aureus* ve *C. albicans*'ın biyofilmleri üzerinde testler yapmışlardır. Biyofilm oluşumuna inhibisyon etkisini belirlemek için *S. aureus*'u 24 saat ve *C. albicans*'ı 48 saat süresince 1 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 0,25 mg/ml Viyolasin'e maruz bırakmışlardır. Viyolasin'in biyofilmin parçalama potansiyelini belirlemek için *S. aureus* ve *C. albicans*'ın 24 saatlik olgun biyofilmine 2 mg/ml, 1 mg/ml ve 0,50 mg/ml Viyolasin konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Kontrol olarak DMSO'yu kullanmışlardır. *S.aureus*'un biyofilm oluşumu üzerine en etkili konsantrasyonun 1 mg/ml olduğu ve diğer dozlardaki azalmanın anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Olgun biyofilme Viyolasin uygulanması sonucunda $p < 0,05$ olarak *S. aureus* biyofilminde tüm dozlarda kalan biyofilm miktarında hafif bir azalma görülürken, *C. albicans* için sadece 2 mg/ml kalan biyofilmin en az olduğu konsantrasyondur.

Gao vd. (2019) biyoviyolasin içeren fonksiyonel ipek kompozitler ve gümüş nanopartiküllerinin sinerjistik olarak antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Fonksiyonel ipek kompozitlerin anti-mikrobiyal aktivitesi *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* ile test edilmiş ve Viyolasin'li ipek kumaşın, % 81,25'lik bir bakteriyel azalma ile *S. aureus*'a karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca gümüş nanopartikülü ile birleştirilen fonksiyonel ipek kompozit iyi sinerjistik özellik göstermenin yanı sıra *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* üzerinde sırasıyla % 99,98, % 99,90 ve % 99,85 mikrobiyal azalma sağlayarak güçlü anti-mikrobiyal etkinlik göstermiştir.

Dodou vd. (2020), Viyolasin'in *S. epidermidis* üzerindeki antimikrobiyal potansiyelini belirlemek için; minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu, minimum biyofilm yok etme konsantrasyonu ve Viyolasin'e maruz kalma süresinin olgun biyofilmdeki mikrobiyal canlılık üzerine etkisini çalışmıştır. Viyolasin, sırasıyla 20 µg/ml konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu inhibe ederek ve 160 µg/ml konsantrasyonunda olgun *S. epidermidis*' in biyofilmini yok ederek iyi bir antibiyofilm etkisi göstermiştir. Viyolasin'in MBEK (Minimum biyofilm eradike eden konsantrasyon) ve MBEK'in iki katına eşit konsantrasyonlarında, *S. epidermidis* biyofilmi sırasıyla 3 saat ve 2 saat 30 dakikalık inkübasyonda yok edilmiştir. Klinik olarak kullanılan ilaçların (vankomisin, sefepim, siprofloksasin ve meropenem) etkisi üzerindeki Viyolasin'in modüle edici etkisi değerlendirilirken, Viyolasin-siprofloksasin birlikteliğinde özel bir sinerjizm olduğu, 1/2 xMBEK ve 1/4xMBEK konsantrasyonlarında olgun biyofilmi tamamen yok edebildiği

gözlenmiştir. Viyolasin, *S. epidermidis* biyofilmi üzerinde iyi bir antimikrobiyal etki gösterir ve klinik olarak kullanılan antimikrobiklerin aktivitesini sinerjik olarak modüle etme potansiyeline sahiptir.

Viyolasin biyolojik işlevlerinden dolayı önemli bir antioksidan aktivite sergilediği farklı çalışmalarla tanımlanmıştır. Farklı deneysel modellerde Viyolasin ve β -siklodekstrin kompleksinin gastrik ülseri önlemede (anti-ülserojenik) etkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar, peroksidatif hasara karşı korumanın mukozal savunma mekanizmasının muhtemel bir uyarıcı aktivitesiyle birlikte bu tür bir etkisinin olabileceği fikrini desteklemektedir (Duran vd., 2012). Bu gözlemle birlikte Viyolasin ve Viyolasinin 1:2 β -siklodekstrin kompleksinin izole edilmiş sıçan hepatositlerinde peroksidatif hasara karşı doz bağımlı olarak koruyucu etki göstermiştir. Bu sonuçlar, sıçan karaciğer mikrozomları, yumurta ve soya fasulyesi fosfatidilkolin lipozomları dâhil olmak üzere üç lipid membran modelinde, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı mikromolar aralıkta, Viyolasin korumasını belirleyen bir çalışma ile de desteklenmiştir. Viyolasin'in membranlarda yeniden yapılandırılması, antioksidan etkisini arttırmıştır. Yoğunluk fonksiyonel teorisi yöntemiyle, Viyolasin'in güçlü bir elektron verme kabiliyetine, ancak zayıf bir hidrojen atomu transfer kabiliyetine sahip olduğu bulunmuştur. Eş düzlemli izomerleri, elektron verme kabiliyetinin yanı sıra güçlü hidrojen atomu transfer kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiş ve N7-H7 bandının, antioksidan aktivitesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Cao vd., 2007). Farklı bir deneysel yaklaşım kullanarak, Sousa vd. (2005), Viyolasin'in, plazmit DNA üzerinde metilen mavisinin neden olduğu zincir kırma etkisini önlediğini tespit etmiştir (Duran vd., 2012).

Anti-mikobakteriyel etkisine örnek olarak; De Souza vd. (1999)' nin *in vitro* çalışmada, zayıflatılmış *Mycobacterium tuberculosis*'e (H37Ra) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) 64 μ g/ml ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) 128 μ g/ml olarak belirlediği çalışma verilebilir (Duran vd., 2012).

Anti-fungal aktivitesine örnek olarak; Sasidharan vd. (2015) saflaştırılan Viyolasin'in, *Cryptococcus gastrikus*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* ve *Candida albicans* gibi bir dizi bitki ve insan patojeni mantar ve maya türüne karşı etkili olduğu belirlemiştir. En iyi aktivitesi ise, atlet ayağı enfeksiyonuna neden olmaktan sorumlu bir insan patojeni olan *Trichophyton rubrum*'a (2 μ g/ml) karşı olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışma, saflaştırılmış Viyolasin'in patojenik mantarlara ve mayalara karşı antifungal aktivitesinin tanımlandığı ilk çalışmadır (Sasidharan

vd., 2015). Ayrıca, bitki patojeni bir fungus olan *Rosellinia necatrix*'e (Dut'ta beyaz kök çürüğüne neden olan patojen) karşı, potansiyel bir antifungal ajan olabileceği bildirilmiştir (Shirata vd., 1997).

Antiviral etkisine örnek olarak; May vd. (1991) HSV (Herpes Simpleks Virüs) ve Poliovirüs ile enfekte HeLa hücre kültürlerinde % 10 Deoksiviyolasin içeren Viyolasin'in 0,25 µg/ml'lik konsantrasyonunun HSV üzerinde % 62 ve 0,063 µg/ml'lik konsantrasyonun poliovirüs üzerinde % 56 inhibitör etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Andrighetti-Frohner vd. (2003), Viyolasin'in antiviral ve sitotoksik aktivitesini incelemek için üç deneysel yaklaşım kullanmış ve daha önce May vd. (1991) tarafından bildirilen sonuçlara karşıt sonuçlar belirlemişlerdir. Önceki araştırma grubu tarafından FRhK-4, Vero, MA104 ve Hep-2 hücreleri için doğrudan sitotoksikite gösteren Viyolasin'in IC₅₀ değeri 1-1,2 µg/ml (2,2 – 2,7 µM) olarak belirlenmiştir. Hücre çoğalmasını engellemeyen konsantrasyonlar kullanıldığında Viyolasin, asiklovire dirençli HSV suşu, hepatit A virüsü (HN175 ve HAF-203 suşları) ve adenovirüs tip 5'e karşı sitopatik veya antiviral aktivite göstermezken, KOS ve ATCC/VR-733 HSV suşları, poliovirüs tip 2 ve simian rotavirüs SA11 suşunun viral replikasyonunda zayıf inhibisyon göstermiştir. Buna karşılık, May vd. (1991), aktivitelereki farklılıkları Viyolasin'in saflaştırmada kullanılan yöntemlere ve saflık derecelerine bağlı olarak değiştiğini ileri sürmektedirler (Andrighetti-Frohner vd., 2003; Duran vd., 2012).

Ballestriero vd., (2014) *Caenorhabditis elegans* ile yaptıkları çalışmada *Microbulbifer* sp. D250 Viyolasin'inin nematod öldürme aktivitesini tespit etmiştir.

Leon vd., (2001) *Leishmania amazonensis*'in promastigote formları için efektif doz 50 (EC₅₀) değerini 24 saat için 4,3 µM olarak belirlemiştir. Wilkonson vd. (2020) *Plasmodium falciparum* 3D7 suşunun yanı sıra hastalardan izole edilen ilaca duyarlı ve ilaca dirençli izole suşlara karşı Viyolasin'in anti-malaryal özelliği olduğunu tespit etmiştir. Aynı çalışmada biyosentetik Viyolasin türevlerinin her birinin aseksüel parazit büyümesine karşı farklı anti-malaryal özellik gösterdiği bildirilmiştir. Biyosentetik Viyolasin'in etki yolunu tanımlamaya yönelik yaptıkları çalışmada; biyosentetik Viyolasin'in parazit aktin hücre iskeleti üzerine tesirli olduğu ve aktin polimerizasyonundan bağımsız bir aktin sinyali birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Wilkinson v.d. 2020).

Viyolasin'in ayrıca; *Spumella* sp. ve *Ochromonas* sp. üzerinde saflaştırılmış Viyolasin'in yüksek toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Matz vd., 2004).

Melo vd. (2000) saflaştırılmış Viyolasin'in; hücre çoğalmasını % 50 oranında inhibe eden konsantrasyonunun MOLT-4 lösemi, NCI-H460 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve KM12 kolon kanseri hücre dizilerine karşı kuvvetli antitümoral aktivitesi olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmalar, farklı histolojik kökenli hücre hatları üzerinde Viyolasin'in etki mekanizması ve potansiyel antitümoral olup olamayacağı yönündeki araştırmaları teşvik etmiştir. Çin hamster fibroblast hücreleri (V79) ve insan lösemi hücreleri (HL60) üzerine serbest Viyolasin'in sitotoksikite deneyleri, Çin hamster fibroblast hücrelerinde (V79) hücre canlılığına (IC₅₀) %50 inhibitör etkiye ulaşan konsantrasyonu 5 µM iken, insan lösemi hücrelerinde (HL60) 0,8 µM olduğunu göstermiştir. HL60 hücrelerinde Viyolasin direkt ve spesifik olarak TNFRF1' i (TNF reseptör 1) aktive eder. TNF kaskad aktivasyonu diğer lösemi hücre hatlarında (U937 CE K652) ve normal insan kan hücrelerinde görülmez. Viyolasin'in normal lenfositlerle IC₅₀ < 3,4 µg/ml veya IC₅₀ < 10 µM), karşılaştırıldığında lösemi hücreleri (IC₅₀ <0,34 µg/ml veya IC₅₀ < 1µM) üzerine daha yüksek sitotoksik aktivite göstermesi, bu bileşiğin Lösemi tedavisinde umut verici bir aday olduğuna işaret eder (Duran vd., 2012).

1.5. *Janthinobacterium* sp.'nin Genel Özellikleri

Janthinobacterium cinsi, *Proteobacteria* filumu, *Betaproteobacteria* sınıfı ve *Oxalobacteraceae* familyasına üye gram negatif, hareketli, çubuk şekilli ve kolonileri mor renkli bakterilerdir. Kendine özgü menekşe renginden dolayı tür ismi, menekşe anlamına gelen latince *janthinus* kelimesinden türetilmiştir (Pantenella vd., 2007). *Janthinobacterium* üyeleri kemoorganoheterotrofturlar ve kesinlikle aerobiktirler (Friedrich vd., 2020). Genellikle orman topraklarından, Antarktika buzullarından, göllerden, nehir sularının mikrobiyotasından ve sedimanlarından izole edilirler. Optimum üreme sıcaklıkları 25-30 °C olsa da, 4 °C gibi düşük sıcaklıklarda çoğalabilen sakrofilik izolatları mevcuttur. Bu cins; *J. lividum* (Kämpfer vd., 2008), *Janthinobacterium svalbardensis* (Ambrozic Avgustin vd., 2013) ve *J. agaricidamnorum* türlerini (Lincoln vd., 1999) ve yakın zamanda duyurulan *Janthinobacterium violaceinigrum* sp. nov., *Janthinobacterium aquaticum* sp. nov. ve *Janthinobacterium rivuli* sp. nov. türlerini içerir (Huibin vd., 2020) (Friedrich vd., 2020). Pigmentasyon, metabolizma sırasında organizmanın biyokimyasal aktivitesi tarafından üretilen bir bileşik olan Viyolasin'in oluşumundan kaynaklanır. Bu renkli ikincil metabolitin antimikrobiyal, antiviral ve antitümör özellikler gösterdiği bilinmektedir (Andrighetti-

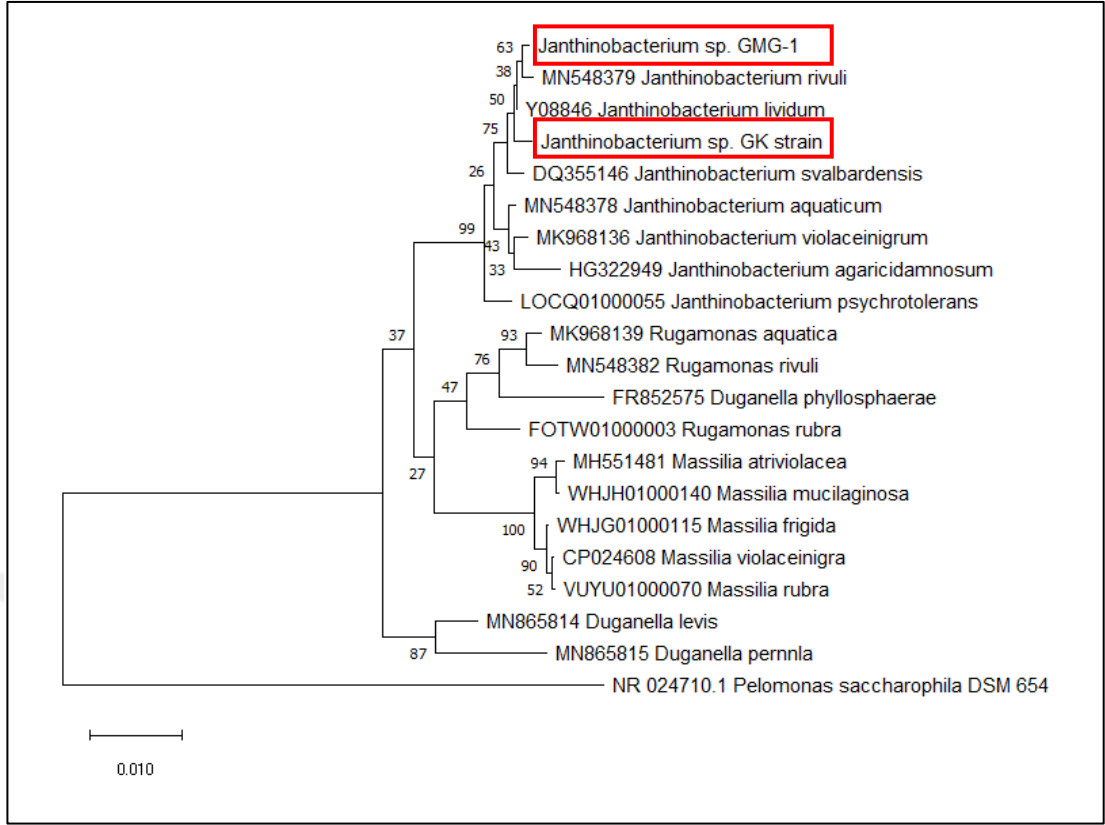
Froöhner vd., 2003; Bromberg vd., 2010; Asencio vd., 2014) ve bu nedenle biyoteknolojik uygulamalar için büyük bir potansiyel taşır (Friedrich vd., 2020).

Bazı *Janthinobacterium* izolatları, amfibilerin yararlı cilt simbiyontları (Brucker vd., 2008; Harris vd., 2009) ve gökkuşağı alabalıklarının patojenleri olarak da bilinir (Oh vd., 2019).

Çevresel olarak rastlanmasına karşın, *J. lividum* bazen ölümcül sepsisemiye de içeren fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilir. Ayrıca, *J. lividum*, birkaç β -laktam antibiyotiğe direnç sağlayan bir metallo- β -laktamaz üretir (Pantenella vd., 2007).

Çalışmada kullandığımız Viyolasin üreticisi olan bakteriler Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Hatice KATI ve ekibi tarafından izole edilmiştir. *Janthinobacterium* sp. GK suşu (Şekil 7), 2015 yılında Giresun ilinin Kümbet Yaylası'ndaki bir kaplıca suyunun etrafında bulunan çamur örneğinden izole edilmiştir. *Janthinobacterium* sp. GMG-1 suşu (Şekil 7), 2020 yılının Mart ayında Şebinkarahisar-Giresun yolunun hemen kenarında bulunan "Mavi Göl" diye adlandırılan gölün kaynak suyu ve etrafındaki çamurlu sudan izole edilmiştir.

Çalışmada, Viyolasin'i ekstrakte edilmiş *Janthinobacterium* sp. GMG-1 ve *Janthinobacterium* sp. GK bakterilerinin filogenetik ağacı 16S rRNA dizilerine göre oluşturulmuş olup Şekil 7' de görülmektedir.



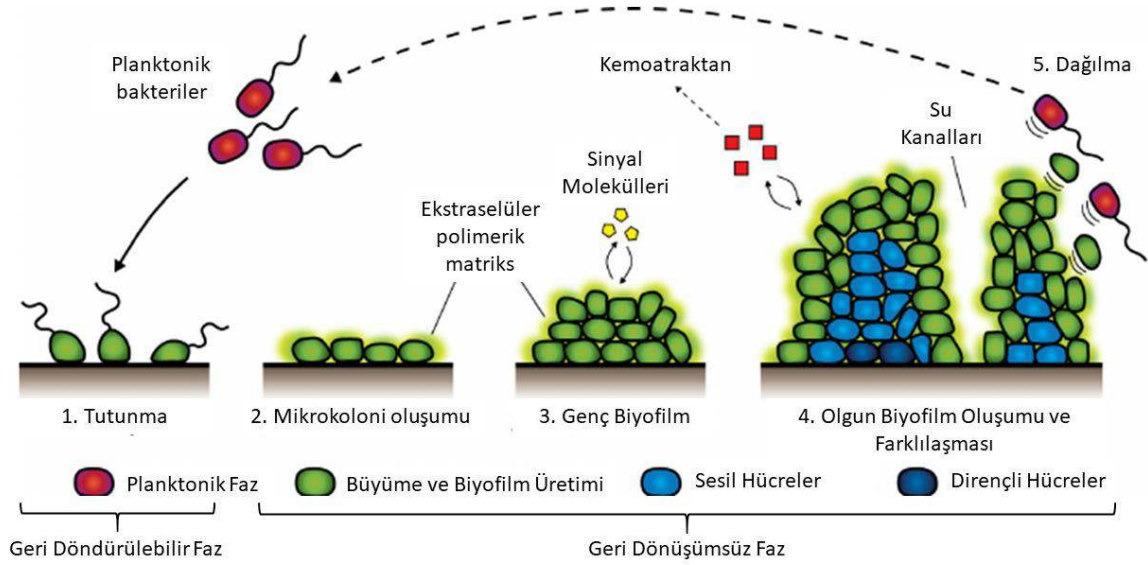
Şekil 7. *Janthinobacterium* sp GK ve *Janthinobacterium* sp GMG-1 bakterilerinin 16S rRNA dizileme ile oluşturulan filogenetik ağacı. 1000 tekrarlı seç bağla testleri ile komşu birleştirme yöntemleri, bir dış grup olarak MEGA 7.0 *Pelomonas saccharophila* DSM 654 (GenBank erişim numarası: MZ434950, MZ434955) kullanılarak araştırma gerçekleştirilmiştir.

1.6. Biyofilmin Tanımı ve Oluşumu

Birbirine yapışmış ve kendi ürettiği hücre dışı polimerik matriks ile çevrelenmiş mikrobiyal hücreler tarafından oluşturulan, biyotik veya abiyotik bir yüzeye bağlı yapılandırılmış topluluklar *biyofilm* olarak adlandırılır (Wu vd., 2015) ve biyofilm içindeki bakterileri planktonik durumdaki hücrelerden farklı bir fenotip sergilerler (Crouzet vd., 2014). Biyofilmler, dünyadaki en yaygın ve başarılı yaşam formlarından biri olarak kabul edilir ve çoğu doğal ortamda, baskın mikrobiyal yaşam tarzıdır (Yin vd., 2019). Biyofilmler, tek bir organizmadan oluşabileceği gibi, bir grup mikroorganizma tarafından da oluşturulabilen kompleks yapılardır ve oluşumları çok basamaklı bir süreçtir (Winkelströter vd., 2014). Biyofilm matriksi, polisakkaritler, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşan polimerik karışımlardır (Mah ve O'Toole, 2001). Biyofilm oluşumu için besin, nem varlığı

ve hammaddelerin mikroorganizmalarla teması gibi birçok elverişli koşul bulunur. Mikroorganizmalar biyofilmleri kendilerini su ve besin maddeleri yokluğu, antimikrobiyal ajanlar (antibiyotikler ve biyosidler) bakımından zengin ortamlar gibi çevresel stres ve düşman ortamlara karşı korunmak için ‘yaşlılık hali stratejisi’ olarak kullanırlar (Mah ve O’Toole, 2001, Wu vd., 2015).

Tipik bir biyofilm oluşumu (Şekil 8); yüzeye tutunma, mikrokolonilerin oluşumu, genç biyofilm gelişimi, yapılandırılmış olgun biyofilmin farklılaşması ve olgun biyofilmin dağılması olmak üzere beş basamaktan oluşur (Wu vd., 2015). Biyofilm içindeki, durağan veya hareketsiz büyüme fazındaki bakteriler ‘sesil’ olarak adlandırılır ve ‘planktonik’ adı verilen, ekzopolisakkarit (EPS) dışındaki serbest hareketli/yüzen bakterilerden, farklı fenotip sergilerler (Crouzet vd., 2014). Planktonik hücreler bir yüzeye ilk temaslarında gevşek bir şekilde tutunurlar ve kolayca ayrılabilirler. Bu hal, ‘tersine çevrilebilir bağlanma aşaması veya geri dönüşümlü bağlanma’ olarak adlandırılır ve genellikle polar olarak bağlanmış hücrelerle karakterize edilir. Bu ilk bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri ile gerçekleşen zayıf bir bağlanmadır ve hücrelerin yüzeye direkt teması söz konusu değildir. Mikrobiyal tutunmayı, yüzeyin özellikleri, mikrobiyal çoğalmanın hızı, sıcaklığı ve mikrobiyal hareketlilik dâhil olmak üzere birçok faktör etkileyebilir (Ünlü, 2020). En iyi tutunmanın pürüzlü, hidrofobik ve farklı organik maddelerle kaplı yüzeylerde olduğu bildirilmiştir. Fimbria, pili ve flagella gibi bakteriyel yapılar, bakteri ve tutunma yüzeyi arasındaki etkileşimi artırır (Abebe, 2020). Belirli bir süre sonra, bazı hücreler, yüzeye temas ettiği ve onları fiziksel olarak yerinden oynatma girişimlerine direndiği ‘geri dönüşü olmayan/ dönüşümsüz bağlanma’ aşamasına girer. Geri dönüşümsüz bağlanmanın ardından hücreler çoğalmaya ve biyofilm matris bileşenlerini üretmeye başlayarak ‘mikrokoloniler’ adı verilen küçük bakteri kümelerini oluşturur. Sonunda, bir matriks tarafından çevrelenen büyük hücresel kümeler dönüşürler (Armbruster ve Parsek, 2018). Olgun bir biyofilmin bileşenleri, % 5-25 bakteri hücrelerinden ve % 75-95 glikolikalik matriksten oluşur (Huang vd., 2011).



Şekil 8. Biyofilm oluşum aşamaları (Gilmore, 2011).

Halk sağlığı ile ilgili olarak bakteriyel biyofilmlere, tıbbi araç-gereçler (özellikle tıbbi tedavi amaçlı kalıcı cihazlara sahip hastalarda), endüstriyel su sistemlerinde, atık su kanallarında, banyolarda, hastane laboratuvarlarında, gıda işleme ve üretim tesisleri ekipmanlarında vb. birçok alanda sıklıkla rastlanırlar (Wu vd., 2015 ve Sharahi vd., 2019)

Bakteriyel biyofilmler, antibiyotik tedavisine ve bağışıklık tepkilerine oldukça dirençli olarak karakterize edilir. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, biyofilm oluşturan bakteri hücrelerinin, planktonik hücrelere göre antibiyotiklere ve konak bağışıklık savunmasına karşı çok daha dirençli olduğunu açıkça göstermiştir. *In vitro* ve *in vivo* deneyler, biyofilm bakteri hücreleri için, minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) genellikle planktonik bakteri hücrelerinden çok daha yüksek (yaklaşık 10–1000 kat) olduğunu göstermiştir. Azalan duyarlılığa, farklı faktörlerin bir birleşimi neden olmaktadır. Bu faktörler; polisakkarit matrisine antibiyotik penetrasyonunun zayıf olması, dirençli bir fenotip (dirençli/kalıcı hücreler) gösteren hücrelerin rastgele mevcudiyeti, biyofilm matrisi içinde çoğalmayan hücrelerin varlığı veya olumsuz kimyasal koşullar altında stres tepkilerini tetikleyen hücrelerin varlığıdır. Bu mekanizmalar antibiyotik direncini sinerjistik olarak, antibiyotik direnç genlerinin varlığıyla veya ekstrakromozomal elemanlara bağlı olarak artırır (Balcazar vd., 2015). Bu nedenle, bir bakteriyel biyofilm enfeksiyonu oluştuğunda, yok

edilmesi zorlaşır. Mikrobiyal enfeksiyonların kontrolü için en önemli ve etkili yöntem antibiyotik tedavisi olmasına karşın, *in vivo* olarak biyofilm eradikasyonu (yok edilmesi) için etkili antibiyotik minimum bakterisidal konsantrasyonuna (MBK), böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının sınırlamaları, antibiyotiklerin toksisiteleri ve yan etkilerinden dolayı geleneksel uygulamalarla eradikasyon imkansız hale gelmektedir (Wu vd., 2015). Agresif ve yoğun antibiyotik tedavileri genellikle; dağılmış bakterilerin neden olduğu kronik biyofilm enfeksiyon nöbetlerini/alevlenmelerini kontrol etmede ve biyofilmleri azaltmada yardımcı olur, ancak biyofilm enfeksiyonlarını yok edemez. Biyofilm tedavilerinin bu zorlayıcı durumu bilimsel olarak oldukça ilgi çekicidir. Biyofilm oluşumunu önlemek için, biyofilm oluşumu için kritik olan biyokimyasal yolların ve biyolojik faktörlerin tanımlanması önemlidir (Crouzet vd., 2014).

Biyofilm oluşumları, farklı koşul ve durumlarda insanlara faydalı veya zararlı olabilir (Gutiérrez, 2019). Örneğin; bitki büyümesinin teşviki, çevresel kirleticilerin biyodegradasyonu ve yaşayan organizmalarda mikrobiyal dengenin kontrolü gibi konularda yararlı olabilir. Bakterilerin gıda ürünlerine veya ürünlerin temas ettiği yüzeylere tutunması hem ekonomik kayıplara hem de gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkların artmasına neden olarak zararlı da olabilir. Örneğin, 2001 yılında Fransa'da yapılan bir araştırmada ekipmanların biyofilmler ile kontaminasyonunun gıda kaynaklı salgınlara katkısının % 59 olduğu belirtilmiştir (Winkelströter vd., 2014).

Sağlık endüstrisinde mikrobiyal biyofilmler, medikal cihazlarda ve hastaların organlarında kolonileşmesi ile hastane enfeksiyonlarının % 60' ından fazlasını oluşturan kalıcı bir hastane enfeksiyonu kaynağıdır. İnsan mikrobiyal enfeksiyonlarının % 60-80' ine biyofilm üreticisi bakteriler neden olur. Bu durum, biyofilmleri önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirir (Crouzet vd., 2014). Tıp biliminin ilerlemesiyle birlikte, giderek daha fazla tıbbi cihaz ve/veya yapay organlar insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta ve sonuç olarak, bakteriyel biyofilm enfeksiyonları da sıklaşmaktadır (Wu vd., 2015). Yerleşik biyofilm içeren enfeksiyon süreçleri arasında bakteriyel vajinit, idrar yolu enfeksiyonları, kateterle ilgili enfeksiyonlar, orta kulak enfeksiyonu, diş plağı, diş eti iltihabı, diş çürümesi, kontakt lenslerde tabakalaşma ve kistik fibroz gibi genel sorunlar yer alır (Sharahi vd., 2019).

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin çoğunda, quorum sensing/yeterli sayı algılama (QS) olarak adlandırılan temel bir hücrel iletişim sistemi, *otoindükleyiciler* olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin yoğunluğuna göre çeşitli genleri düzenler. Sinyal

molekülleri bazında quorum algılama üç sınıfa ayrılır. Bunlar, Gram-pozitif bakteriler için otoindükleyici peptitler (AIP-tabanlı), Gram-negatif bakteriler için N-açıl homoserin laktonlar (AHL'ler-tabanlı) ve son olarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin her ikisi için otoindükleyici-2 (AI-2-tabanlı)'dır. İlk bağlanmadan sonra biyofilm oluştuğunda hücreler, mikrobiyal genin ekspresyonunu değiştiren yeterli sayı algılama molekülleri (QS) salgılayarak planktonik formu sabit bir forma dönüştürür. Ayrıca, yeterli sayı algılama biyofilm gelişiminde önemli bir rol oynar, bu nedenle yeterli sayı algılama sinyallerinin inhibisyonu/*Quorum Quencing* (QQ), biyofilm oluşumunu kontrol etmek için etkili bir yaklaşımdır. QS sisteminin yeni antimikrobiyal ajanlar geliştirmek için bir hedef olduğu düşünülmekte, ayrıca QS sistemi çeşitli patojenlerde patojenetik faktörlerin ve ayrıca virülans faktörlerinin üretiminin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. QQ ile biyofilm oluşumunu önlemenin en önemli yararı, bu yaklaşımın çoklu ilaç direnci riskini azaltması ve böylece klinik ortamlarda biyofilm bazlı enfeksiyonları önlemek için bu yaklaşımı fark edilir hale getirmesidir (Shahid vd., 2019).

1.7. Biyofilm Oluşumunu Önleme Stratejileri

Mevcut anti-biyofilm teknolojileri iki gruba ayrılabilir. İlk grup, biyofilm oluşumunun moleküler mekanizmasını anlamaya odaklanarak bakterilerin biyofilm oluşturma sürecini (mikrobiyal üremeyi/çoğalmayı) hedefler. Bu grupta biyofilm oluşumunu engellemek veya bozmak için küçük moleküller ve enzimler geliştirilmiştir. İkinci grup, biyofilm oluşumuna karşı dirençli hale getirmek (mikrobiyal tutunmayı önlemek) için, tıbbi cihazlarda kullanılan biyomalzemeleri değiştirmeye odaklanan anti-biyofilm teknolojileridir. Bu yeni anti-biyofilm yaklaşımları hala gelişme aşamasındayken, bu teknolojilere yönelik çabalar sonunda mevcut antibiyotik tedavisinden daha üstün olan anti-biyofilm tedavilerini de beraberinde getirebilir (Chen vd., 2013).

1.8. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar, gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, aerobik veya fakültatif anaerobik kok morfolojisi ile karakterize organizmalardır (Kajihara vd., 2016; Anderson vd., 2016). Doğaları gereği ekstrem sıcaklıklar (10-45 °C), pH (4,5-10) ve yüksek tuzluluk gibi

çok çeşitli ortamlarda uzun süre hayatta kalabilirler (Marinho vd., 2013; Anderson vd., 2016).

Enterokoklar, laktik asit bakterileri (LAB) grubuna aittir ve gıdaların bozulmasında ve gıda fermentasyonlarında starter kültür suşları olarak kullanımlarının yanı sıra insanlarda ve kesim hayvanlarında probiyotik olarak kullanılmaları nedeniyle önem taşırlar (Franz vd., 2011). Enterokoklar, hem insan hem de hayvanların ağız boşluğunun, gastrointestinal sistemin ve dişi genital yolunun doğal sakinleri olan fırsatçı patojenlerdir (Mohamed ve Huang, 2007). Enterokokların yapay tıbbi cihazların biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarına katkısı yakın zamanda gözlenmiştir. Gıda kökenli enterokokların *in vivo* olarak oral biyofilme entegrasyonu gözlemlenmiştir (Anderson vd., 2016).

Enterococcus cinsine ait iki tür, *Enterococcus faecalis* (baskın olarak) ve *Enterococcus faecium*, son yıllarda hastane enfeksiyonlarına sebep olan önde gelen fırsatçı patojenlerdir (Kajihara vd., 2015; Li vd., 2020a). Ayrıca gıda kontaminantları ve dişi hastalıklarıyla bağlantılıdır (Anderson vd., 2016). *Enterococcus faecalis*, en yaygın enterokok türüdür ve insan enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumludur (Mohamed ve Huang, 2007). *E. faecalis*, normalde bir bağırsak kommensali iken, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi, yara enfeksiyonları dahil olmak üzere birçok ciddi insan enfeksiyonunun sıklıkla görülme nedenidir (Kau vd., 2005). Bunlar idrar yollarını, kan dolaşımını, karın içi ve pelvik bölgeleri, cerrahi alanları ve merkezi sinir sistemini enfekte eden yaygın hastane ajanlarıdır. Ayrıca çeşitli peynirlerin spesifik aromalarının geliştirilmesinde ve gıdayı olgunlaştırmada önemli rol oynarlar ve bazı etlerin bozulmasına neden olabilirler (Anderson vd., 2016).

E. faecalis, yatay gen transferi yoluyla virülans ve antibiyotik direnç genlerini yayma konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. *E. faecalis* enfeksiyonlarının tedavisi, bir çok gram pozitif bakteride etkili bir ilaç olan vankomisin dahil sıklıkla çoklu antibiyotik direnci göstermeleri sebebiyle güç olabilmektedir (Kau vd., 2005). *E. faecalis*'in patojenitesi ve ortadan kaldırılmasının zorluğu, bakteriyel enfeksiyonlarının %65'inin biyofilm oluşturma yeteneğinden kaynaklanabilir. *E. faecalis* biyofilmi medikal aletlerin üzerinde gelişerek hastane kaynaklı enfeksiyonların sebebi olarak bilinir (Kim vd., 2020). Biyofilm oluşumuyla artan antibiyotik direnci nedeniyle tedavisi zordur (Anderson vd., 2016).

1.9. *E. faecalis* Biyofilmi

Enterokoklar, insan ekolojisi üzerinde ikili bir role sahiptir. Gastrointestinal sistemin kommensal organizmalarıdır ancak eş zamanlı olarak çoklu antibiyotik direncine sahip hastane kaynaklı enfeksiyonlarının da başlıca nedenleridir. Hastane enfeksiyonlarının birçoğu, mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kabiliyetinden kaynaklanır (Tendolkar vd., 2004).

E. faecalis'in biyofilm oluşumu ile ilgili birkaç virülans faktörü vardır. Birçok araştırmacı tarafından klinik olarak izole edilmiş *E. faecalis*'te virülans faktörleri araştırılmış ve enterokokal yüzey proteini (Esp), jelatinaz (GelE), agregasyon maddesi (Agg), sitolizin B (CylB) ve endokardite özgü antijen A'nın (EfaA) olduğunu bildirmiştir (Zheng vd., 2018).

Enterokokal yüzey proteininin (Esp) abiyotik yüzeylere yapıştığı ve kolonize olduğu, *E. faecalis* biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Zheng vd., 2018). Esp (Enterococcal Surface Protein), *E. faecalis* biyofilmi oluşumuna katkıda bulunan bir yüzey proteindir ancak son çalışmalar enterokokların biyofilm oluşturma kabiliyetinin Esp ifadesinden bağımsız olduğunu ileri sürmüştür. Esp'nin *E. faecalis* biyofilm oluşumunda oynadığı rolü belirleyebilmek için, genetik olarak iyi tanımlanmış, doğal Esp eksikliği olan suşların hücre yüzeyinde ifade edilmiş ve izogenik Esp-pozitif suşlar ile Esp eksikliği olan suşların biyofilm oluşturma yetenekleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, Esp ifadesinin, test edilen suştan bağımsız olarak biyofilm oluşumunda önemli bir artış sağladığını göstermektedir. Esp'nin biyofilm oluşumuna katkısının en fazla olduğu durumun %0,5 (ağırlık/hacim) veya daha fazla glukoz varlığı olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar, açık bir şekilde Esp'yi *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğine önemli bir katkı olarak tanımlamaktadır (Tendolkar vd., 2004). *E. faecalis* jelatinaz, jelatini kollajen ve hemoglobine hidrolize edebilen ve bakteriyel tutunma ve biyofilm oluşumunda rol aldığı bildirilen hücre dışı bir metalloproteazdır. *E. faecalis* izolatlarının geniş bir koleksiyonunda *esp*, *gelE* ve biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Benzer şekilde, Chuang-Smith ve diğerleri *E. faecalis* agregasyon maddesinin (Agg) biyofilm oluşumunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir, ancak bu diğer çalışmalarla doğrulanmamıştır. Bu nedenle, virülans faktörlerinin *E. faecalis* biyofilm oluşumu ile ilişkisi tartışmalıdır ve çözülmemiştir (Zheng vd., 2018).

Agregasyon maddesinin ayrıca ökaryotik hücrelerin yapışmasını ve istilasını arttırdığı ve ayrıca biyofilm oluşumunu desteklediği farklı araştırma grupları tarafından bildirilmiştir.

Hiyaluronidaz (Hyl), konak doku istilasında enterokokların virölansı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *E. faecalis* endokardit antijen A'nın (EfaA), endokarditte *E. faecalis*'in kalp hücrelerine yapışmasına katkıda bulunduğı düşünülmektedir. Son olarak, sitolizin (Cyl, beta-hemolizin), insanlarda enterokok enfeksiyonlarını alevlendiren potansiyel bir bakteriyosindir. Birçok prokaryotik hücrenin yanı sıra eritrositleri ve diğerk ökaryotik hücreleri parçalayabilir (Anderson vd., 2016).

Marinho vd.'nin 2013 yılında yaptıkları çalışmaya göre, polisitren üzerinde % 0,75 glukoz içeren Tryptik soy broth (TSB) besiyerinde, *E. faecalis*' in biyofilm oluşturabildiğı optimum sıcaklık 37 °C' dir (Marinho vd., 2013).

Kim vd., (2020) farklı kültür koşullarının *E. faecalis* üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada ve %1 sakkaroz bulunan ortamda en yüksek canlılık ve eDNA seviyesine ulaştığını saptamışlardır. Aynı çalışmada qRT - PCR sonuçları, % 1 sakkaroz ve % 1 glukoz bulunan planktonik kültürlerde virölansla ilgili genlerin ekspresyonlarının en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, *E. faecalis*'te eDNA ve EPS üretiminin ve virölansla ilişkili genlerin ifadesinin, biyofilm veya planktonik kültürdeki karbohidrat konsantrasyonundan etkilendiğini göstermektedir (Kim vd., 2020).

1.10. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)

HIV-1 (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü), AIDS (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu)'e sebep olan bir tip retrovirüstür. Retrovirüsler, revers transkriptaz içeren virüslerdir. Revers transkriptaz, RNA molekülünü kalıp olarak kullanarak DNA üretir. Revers transkriptaz taşıyan virüsler, santral dogmaya zıt aktivitelerinden dolayı retrovirüs adını alırlar. HIV-1, retrovirüslerin en kompleks grubu olan lentivirüs üyesidir. Lentivirüsler, diğerk retrovirüslerin aksine bölünmeyen hücrelerin genomuna entegre olurlar. (Narayan ve Clements, 1989).

1.11. HIV Enfeksiyonu ve İnhibitörleri

1970'lerde başlayan ve 1980'lerde en ciddi salgın tehditlerinden biri haline gelen küresel HIV salgını nedeniyle bugüne kadar 79,3 milyon insan enfekte olmuş ve 36,3 milyon

kişi ise HIV ile ilişkili hastalıklardan dolayı hayatını kaybetmiştir (Das ve Arnold 2013, URL-1, 2021).

HIV-1 enfeksiyonu, viral ve hücrel membranların füzyonu ile başlar. Füzyon reaksiyonuna viral zarf glikoproteininin konaktaki (CD4) reseptörü ve bir yardımcı reseptörün (genellikle CCR5 veya CXCR4) etkileşimleri neden olur (Coffin vd.,1997). Reseptör ve yardımcı reseptörün bağlanması, zarf glikoproteininin yapısında değişikliklere neden olur ve membran füzyonuna yol açar. Membran füzyonu, Reverse/Ters transkriptaz (RT) içeren viral çekirdeği hücrenin sitoplazmasına yerleştirir. Virüs genomunun replikasyonu için zarftan çıkarılması ile viral çekirdek ters transkripsiyonu teşvik edecek şekilde değişir (Sarafianos vd. 2008). HIV-1 virionu, viral proteinlere ek olarak, tek sarmallı bir RNA genomunun iki kopyasını içerir. RT'ın iki enzimatik aktivitesi vardır, bunlar DNA veya RNA kalıbını kopyalayabilen bir DNA polimeraz ve RNA/DNA dubleksinin bir parçası olan RNA' yı parçalayan bir RNaz H aktivitesi. RT'ın iki enzimatik işlevi olan polimeraz ve RNaz H, birlikte RNA'yı çift sarmallı doğrusal bir DNA'ya dönüştürmek için çalışır. Bu dönüşüm, enfekte olmuş hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir; DNA sentezi tamamlandıktan sonra, elde edilen lineer çift sarmallı viral DNA, viral DNA'nın integrasyonu (IN) tarafından konak genomunun yer aldığı çekirdeğe geçer. Provirus adı verilen bu DNA kopyası, konak DNA'ya bağımlı RNA polimeraz tarafından üretilen hem viral genomik hem de viral haberci RNA'ların kaynağıdır. Her ne kadar diğer viral proteinler (özellikle nükleik asit şaperon nükleokapsidi ve belki de IN) ve bazı hücrel faktörler, RT'ın viral RNA'yı DNA'ya dönüştüren reaksiyonları gerçekleştirmesine yardımcı olsa da, RT dönüşüm için gerekli tüm enzimatik aktiviteleri kapsar.

HIV-1 RNA genomunun çift sarmallı DNA'ya ters transkripsiyonu, enfeksiyonda merkezi bir adımdır ve antiretroviral ajanların ortak hedefidir (Mitsuya vd. 1985; Fischl vd. 1987). HIV tedavisinde kullanılan Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış 30'dan fazla ilaç bulunmaktadır. Bazı HIV ilaçları tedavide birlikte kullanılabilir. HIV tedavisinde kullanılan bu ilaçlar etki mekanizmalarına göre 7 gruba ayrılır. Bunlar; nükleozit olmayan reverse transkriptaz inhibitörleri (NNRTI), nükleozit reverse transkriptaz inhibitörleri (NRTI), proteaz inhibitörleri (PI), füzyon inhibitörleri, CCR5 antagonistleri, integrasyon inhibitörleri (INSTI) ve bağlanma sonrası inhibitörleridir (URL-2, 2021). HIV, ters transkriptazı RNA'yı DNA'ya dönüştürmek için kullanır. Nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri (NRTI) HIV reverse transkriptazını inhibe ederek RNA'nın DNA'ya dönüşmesini engeller. Ters transkriptaz ve ters transkripsiyonu bloke

etmek, HIV'in replikasyonunu engeller (URL-3, 2021). Nükleozid olmayan revers transkriptaz inhibitörleri (NNRTI) ters transkriptaz enzimine bağlanır ve ters transkriptazı inhibe eder (URL-4, 2021). İntegraz inhibitörleri (INSTI) HIV'e ait bir enzim olan integrasyonu engelleyerek HIV viral DNA'sının konak CD4 hücre DNA'sına entegre olmasını/girmesini engelleyerek HIV'in replikasyonunu engeller (URL-5, 2021). CCR5 antagonistleri bağışıklık hücre yüzeyindeki CCR5 koreseptörünü engelleyerek, HIV' in CD4 T lenfosit hücresi içine girişini bloke eder (URL-6, 2021). Bağlanma sonrası inhibitörleri konağın CD4 hücresindeki CD4 reseptörüne bağlanır ve HIV'in CCR5 ve CXCR4 koreseptörlerine bağlanmasını engelleyerek hücreye girişini engeller. Bu inhibitörler, HIV giriş inhibitörlerinin bir grubudur (URL-7, 2021). Füzyon inhibitörleri HIV zarfının konağın CD4 hücre membranı ile birleşmesini engeller. Söz konusu inhibitörler sayesinde HIV' in CD4 hücresi içine girişini engeller (URL-8, 2021). Proteaz inhibitörleri, HIV'in proteazını engelleyerek yeni HIV'lerin olgunlaşmasını önler. Böylece konağın diğer CD4 hücreleri enfeksiyondan korunmuş olur (URL-9, 2021).

HIV-1, yüksek genetik değişkenlik sergiler ve bu nedenle, HIV-1, mevcut ilaçlara direnç geliştirir ve AIDS aşısı adayları tarafından ortaya çıkarılan konak bağışıklık tepkilerinden kaçır (Das ve Arnold, 2013).

Yüksek düzeyde aktif antiretroviral terapi (HAART) olarak adlandırılan, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalar için standart tedavi, üç veya daha fazla HIV ilacından oluşur, çoğunlukla önerilen iki nükleozid revers transkriptaz inhibitörü (NRTI'ler), nükleozid olmayan bir revers transkriptaz (NNRTI) veya proteaz inhibitörü ile kombinasyon halindeki tedavidir. İkinci olarak; integrasyonu (INTSI) veya giriş inhibitörleri, RT inhibitörü ve PI kombine edilir (Das ve Arnold, 2013).

1.12. HIV Reverse Transkriptaz (HIV-1 RT)

Revers transkriptaz enzimi, HIV-1'in kritik bir moleküler makinasıdır ve anti-AIDS ilaçlarının en fazla hedeflediği yapıdır. Aynı zamanda, RT tüm anti-AIDS ilaçlarına direncin gelişiminden sorumludur: öncelikle doğrudan moleküler seviyede RT inhibitörlerine ve /veya dolaylı olarak genetik varyasyonların tanımlanmasında primer kaynaktır (Das ve Arnold, 2013).

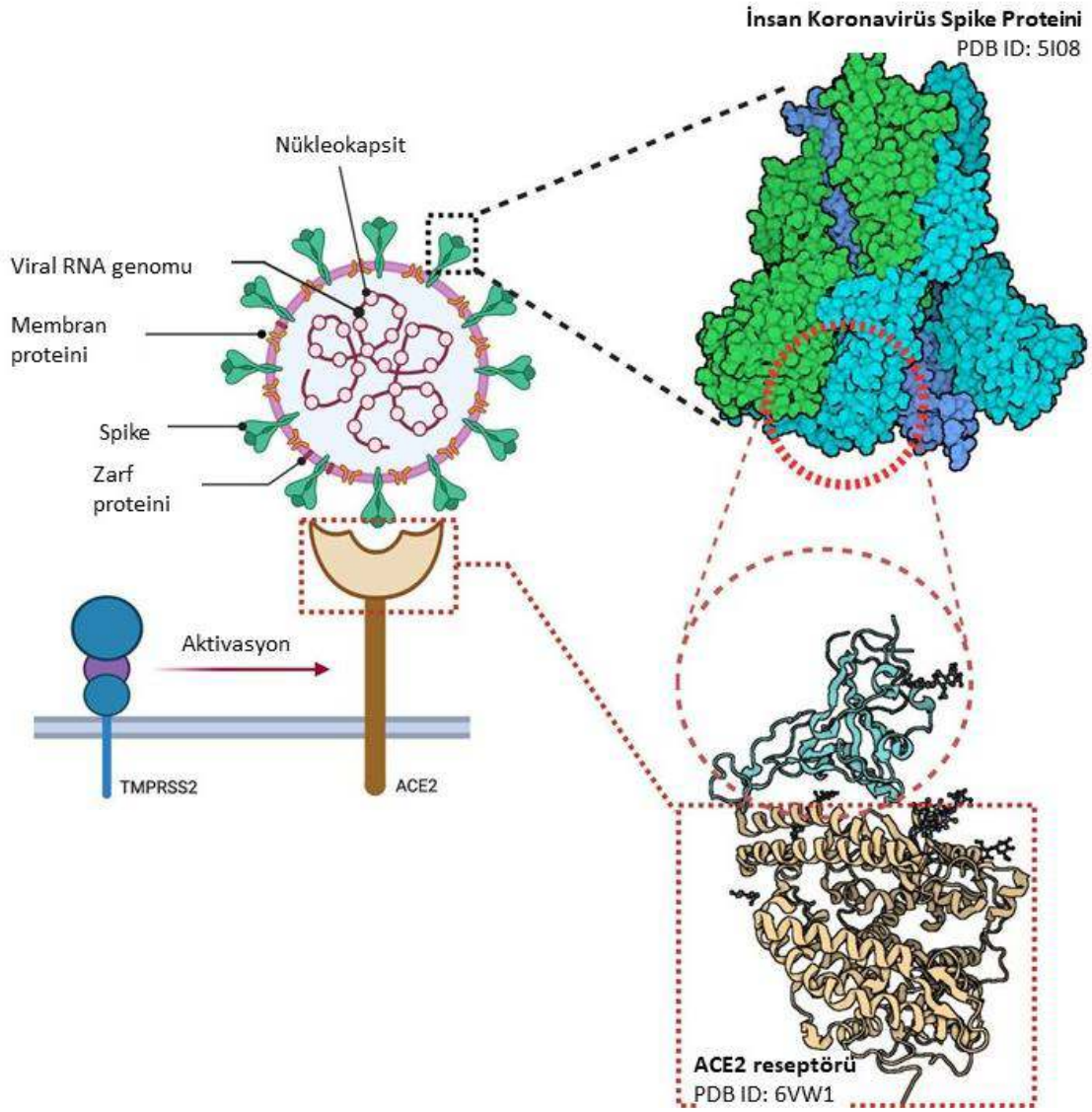
RT inhibitörlerinin iki sınıfı mevcuttur: nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri (NRTI'ler) ve nükleozid olmayan revers transkriptaz inhibitörleri (NNRTI'ler). NRTI'ler,

yeni oluşan viral DNA'ya dâhil olur, bu da DNA zincirinin sonlanmasına ve DNA'nın daha fazla uzamasının engellenmesine yol açar. NNRTI'ler, RT enziminin p66 alt birimi içindeki hidrofobik cebe bağlanarak HIV-1 replikasyonunu durdurur ve böylece viral RNA'yı DNA'ya dönüştürmesini önler (Ren vd., 1995; D'Cruz ve Uckun, 2006). NNRTI'ler, HIV-1 RT'nin rekabetçi olmayan inhibitörleridir ve aktivasyon gerektirmez. Nevirapin NNRTI sınıfı anti-HIV ilaçların ilkidir (Vazquez, 1996). HIV-1 RT'nin düşük bağılılığı, yüksek düzeyde HIV-1 replikasyonu ve RT aracılı rekombinasyonun yüksek oranı, birlikte RT inhibitörlerine karşı direncin ortaya çıkmasına katkıda bulunur (Bushman vd., 1990; Ho vd., 1995; Asahchop vd, 2012).

1.13. Koronavirüsler (CoV)

Koronavirüsler (CoV'ler), zarflı, pozitif anlamlı, tek zincirli RNA virüsleridir (Weiss ve Leibowitz, 2011) Tek sarmallı RNA virüslerinin geniş bir ailesi olan koronavirüsler (CoV'ler) alfa-coronavirüs, beta-coronavirüs, gama-coronavirüs ve delta-coronavirüs olmak üzere dört cinse ayrılır (Yang ve Leibowitz, 2015). Tarihsel olarak, insanları enfekte ettiğı bilinen yedi Coronavirüs (CoV) vardır. Bunlar; insan CoV (HCoV)-229E (1962), HCoV-OC43 (1967), şiddetli akut solunum sendromu (SARS)-CoV 1 (SARS1) (2002), HCoV-NL63 (2004), HCoV-HKU1 (2005), Orta Doğı solunum sendromu (MERS)-CoV (2012) ve SARS-CoV 2 (SARS2) (2019)'dir (Hamre ve Procknow, 1966; Kapikian vd., 1969; Ksiazek vd., 2003; Fouchier vd., 2004; Woo vd.,2005; Zki vd., 2012; Zhu vd.,2019).

Genel olarak CoV'ler hem insan hem de hayvan konaklar için ciddi sağık sorunlarına neden olur, enfeksiyonları ise özellikle solunum ve gastrointestinal yolları etkiler (Hulswit vd., 2016). Ayrıca, CoV'ler bilinen tüm RNA virüsleri arasında en büyük genoma (yaklaşık 30 kb) sahiptir (Sanjuán vd., 2010). Bu genom bir nükleokapsid proteinden (NK) oluşan sarmal bir yapı içinde paketlenir ve yapısal proteinlerle ilişkili olan viral bir zarfla çevrilir (şekil 9) , yani sırayla zar, zarf ve Spike yapısal birimlerinden oluşur (Li, 2016).



Şekil 9. SARS-CoV-2 virüsünün yapısı, İnsan koronavirüs Spike proteini ve konak ACE2 reseptörü (Wiese vd., 2021).

Spike protein konak hücreye viral girişe aracılık etmede, konak tropizminin belirlenmesinde, viral patogenezi ve konak immün yanıtlarının indüklenmesinde görev alır (Lu, 2015; Millet ve Whittaker, 2015; Hulswit vd., 2016; Li, 2016). Bu durum, CoV Spike proteininin viral patogenez açısından önemini vurgular (Cueno ve Imai, 2021).

1.14. SARS-CoV-2

Aralık 2019'un sonlarında, bir grup yerel sağlık yetkilisi, Çin'in, Hubei Eyaleti, Wuhan'daki bir deniz ürünleri pazarıyla epidemiyolojik olarak bağlantılı, nedeni bilinmeyen pnömoni hasta kümeleri bildirmiştir (Zhu vd., 2019). Salgının nedeni, 2003'teki şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsünün (SARS-CoV-1) genomik dizisi ile % 79 benzerliğe sahip bir betakoronavirüs olarak tanımlanmış ve yeni virüs SARS-CoV-2 (COVID-19) adını almıştır. (Gorbalenya vd., 2020; Wu vd., 2020; Zhou vd., 2020; Zhu vd., 2020, Amanat ve Krammer, 2020). 30 Ocak 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO), COVID-19'un "uluslararası endişe yaratan bir halk sağlığı acil durumu" olduğunu ilan etmiştir (Li vd., 2020b). Virüs ilk olarak Aralık 2019'da ortaya çıkmasına rağmen pandeminin etkileri halen artarak devam etmektedir (Korber vd., 2020; Yoshimoto, 2021).

COVID-19'un semptomları spesifik değildir ve hastalık seyri asemptomatik ile şiddetli pnömoni ve ölüm arasında değişebilir. Huang vd., 2020 yılında yaptıkları bir çalışma ile en yaygın semptomların ateş (% 98), öksürük (% 76), kas ağrısı veya yorgunluk (% 44); atipik semptomları ise balgam (% 28), baş ağrısı (% 8), hemoptizi (% 5) ve diyare (% 3) olarak belirlemişlerdir (Wu vd., 2020).

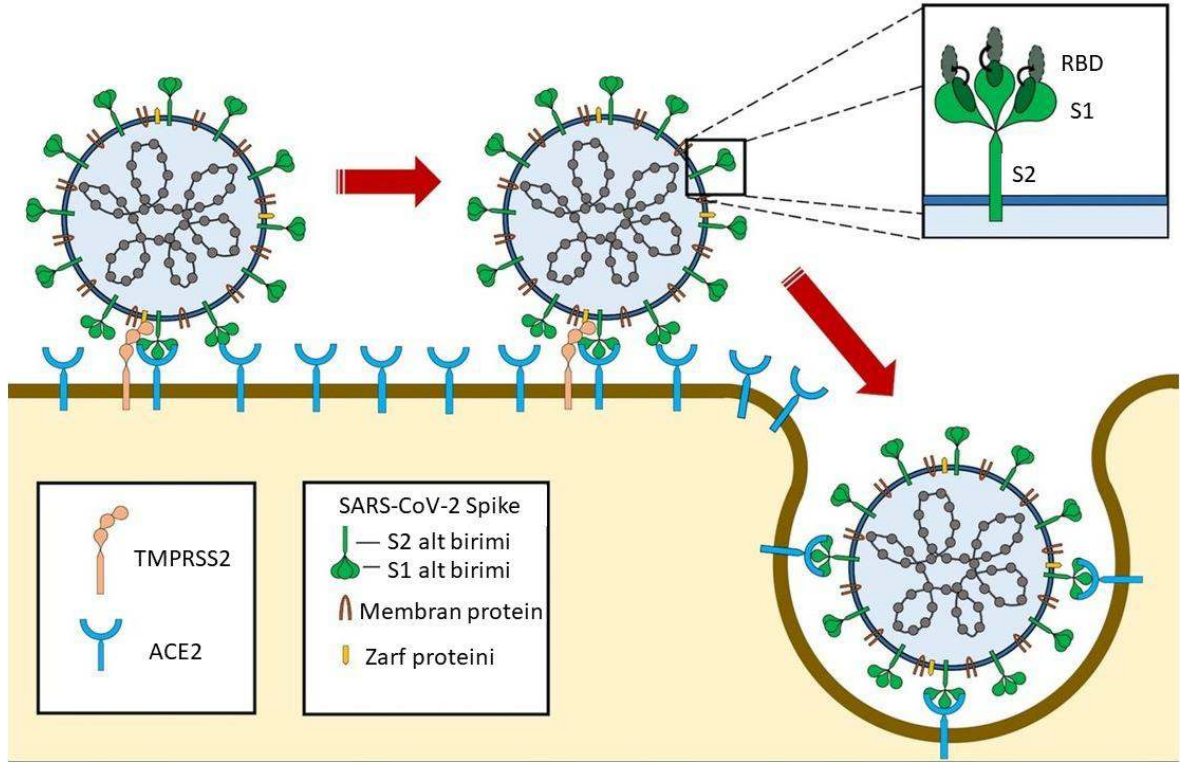
COVID-19'un şiddeti, yaşla birlikte hipertansiyon, obezite, astım veya diyabet gibi önceden var olan hastalıklarla birlikte artar. Ağır COVID-19 hastalarının sitokin saldırısı, ağır akciğer hasarı ve çoklu organ yetmezliğinden muzdarip olduğu bulunmuştur (Pia 2020). Akut solunum depresyonu sendromu (ARDS) ve organ hasarı gibi SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile ilişkili ağır semptomlar ve komplikasyonlar, SARS-CoV-2 Spike protein S1'in indüklediği bağışıklık hücreleri tarafından artırılmış proinflamatuvar sitokin üretimiyle ilişkilendirilmiştir (Olajide vd., 2021).

Birçok virüs için ortaya çıkma sürecindeki kilit adımlardan biri hayvanlardan insanlara geçiştir. Bu nedenle, virüsün kaynağının belirlenmesi, COVID-19'un yayılmasını (Perlman, 2020) ve bulaşmasını kontrol etmeye yardımcı olur. Son araştırmalar, virüsün tüm genom analizinde bir yarası koronavirüsü ile % 96 benzerlik olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar yarasaların SARS-CoV-2'nin en olası konağı olduğu anlamına gelmektedir (Perlman, 2020; Zhou vd., 2020). Ancak SARS-CoV-2'nin neden olduğu zatürre enfeksiyonunun doğrudan yarasalardan mı yoksa bir ara konak aracılığıyla mı bulaştığının daha fazla doğrulanması gerekir (Perlman, 2020; Jin vd., 2020; Zhou vd., 2020). Sağlık yetkilileri, virüsün 4 'kuşak' zinciri boyunca (virüsü ilk başta insan olmayan bir kaynaktan kapan bir kişi bir başkasına

bulaştırır, enfekte kişi başka bir bireye bulaştırır ve daha sonra başka bir bireye bulaşır) bulaşma kanıtlarını belirlemiş ve bu kanıtlar insandan insana sürekli geçiş olduğunu düşündürmüştür (Phelan ve RebeccaKatz, 2020; Wu vd., 2020). Yeni koronavirüsler, temel olarak koronavirüslerin yüksek prevalansı ve geniş dağılımı, geniş genetik çeşitliliği, genomlarının sık rekombinasyonu ve insan-hayvan arayüz aktivitelerinin artması nedeniyle periyodik olarak ortaya çıkıyor gibi görünmektedir (Cui vd., 2019; Zhu vd., 2019).

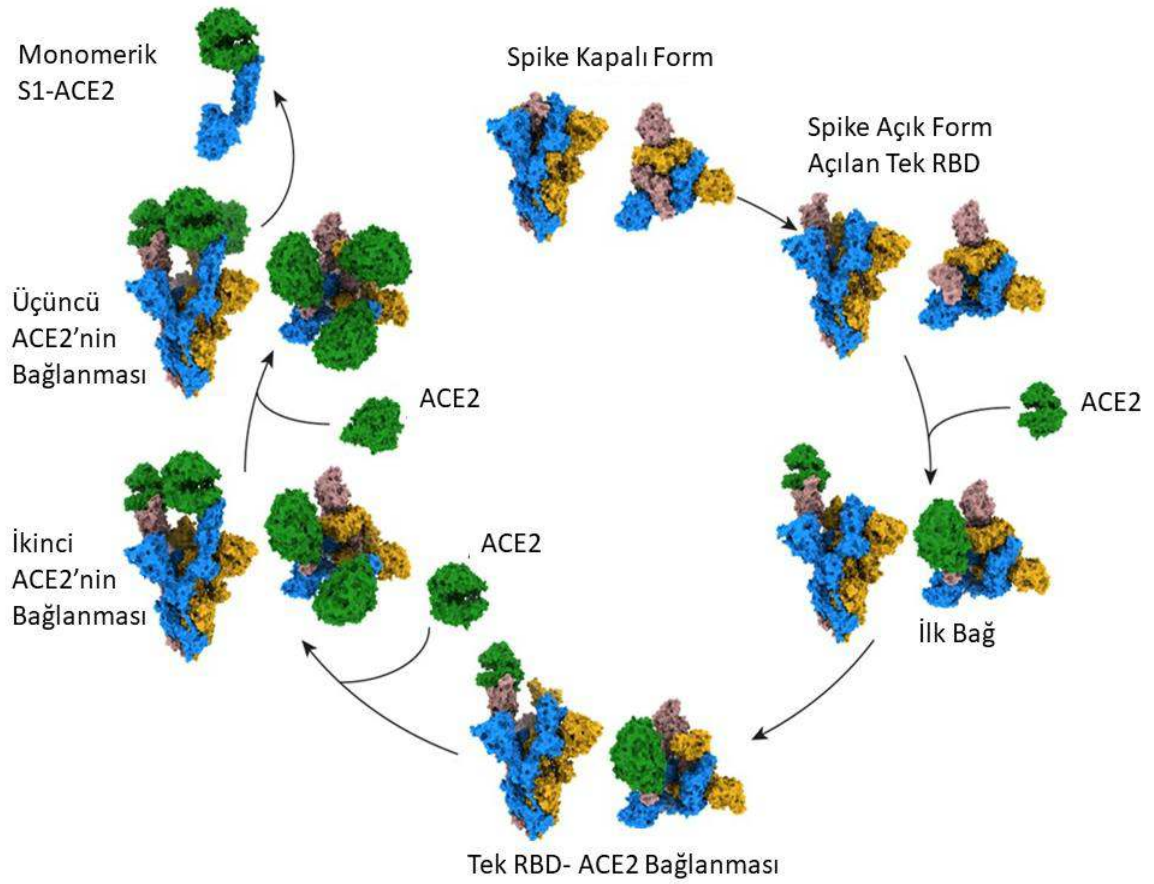
1.15. Spike S1 ve ACE2'nin Enfeksiyondaki Rolü

SARS-CoV-2' nin enfeksiyon süreci (Şekil 10), viral Spike proteinin, konağın aynı kökenli reseptörüne ya da reseptörlerine bağlanmasıyla başlar ve ardından Spike protein viral RNA'yı konak hücreye iletmek için membran füzyonunu tetikler. Viral membran füzyonu, Spike proteinin S1/S2 ve S20 bölgelerinde proteolitik kesimin karmaşık bir yapısal geçiş sürecini içerir. S1/S2 ve S20 proteolitik ayrılma bölgeleri, Spike proteinini S1, S1/S2-S20 ve S20 olmak üzere üç alt birime böler. Bölünme olaylarının, füzyon öncesi durumu, virüsle konağın membran füzyonu ve füzyon sonrası durumunu içeren büyük bir yapısal geçişi uyardığı düşünülmektedir. Spike proteini trimer (Şekil 10) yapıdadır ve her bir domaini, süreç boyunca farklı bir rol oynar (Bangaru vd., 2020; Nishima ve Kulik, 2021). Spike proteinin trimerini oluşturmak için bir araya gelen 3 birim; reseptör bağlanma domaini (RBD), S1 birimi ve S2 birimidir (Bangaru vd., 2020). S1 birimi, ACE2 reseptörüne (Ord vd., 2020) bağlanır, S1-S2 bölgesi proteaz ile furinin parçalandığı yerdir ve S2 birimi, viral ve hücre zarlarının füzyonuna aracılık eder (Walls vd., 2020). Spike proteinlerin aynı zamanda lipidler, glikanlar ve transmembran proteinler gibi diğer bağlanma faktörleriyle etkileşime girdiği düşünülmektedir. Bazı hücre kültürlerinde koronavirüs girişi için lipid yığınlarının tutulduğu bildirilmiştir (Lu vd., 2008; Guo vd., 2017; Nishima ve Kulik, 2021).

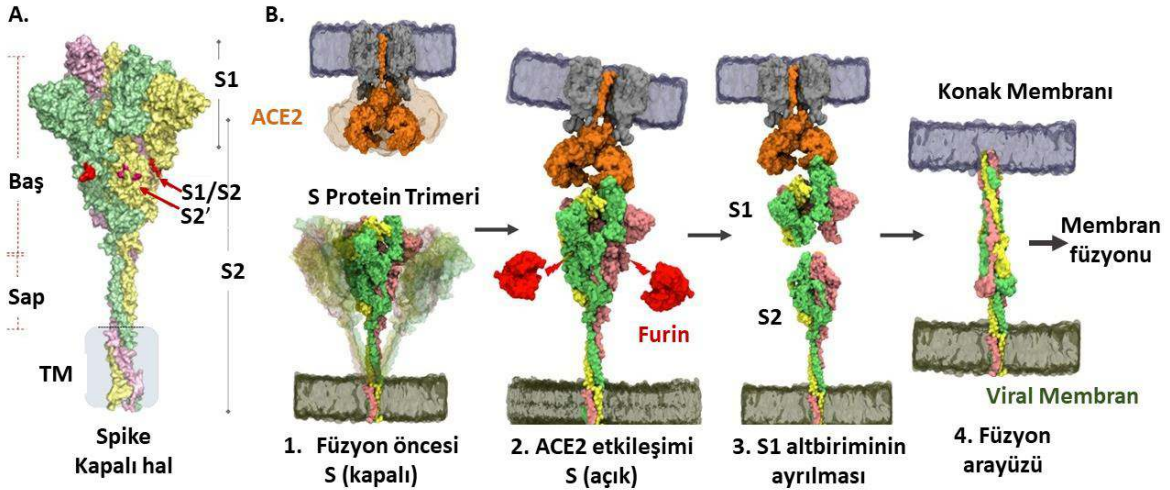


Şekil 10. SARS-CoV-2'nin hücreye girişini gösteren şema. SARS-CoV-2, Spike proteinin reseptör bağlama domaini (RBD) aracılığıyla ACE2'ye bağlanır. Giriş için, S1 ve S2 alt birimleri, TMPRSS2 gibi bir proteaz tarafından kesilerek birbirlerinden ayrılır. Ek olarak özellikle düşük TMPRSS2 ekspresyonuna sahip hücrelerde alternatif aktivasyon yolu olarak Furin SARS-CoV-2 Spike proteininin hem S1 hem de S2 alt birimleri arasındaki bölgeyi keser (Chaudhry vd., 2020).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'yi (AngII) bir vazodilatör olan Ang1-7'ye dönüştüren faydalı bir moleküldür (Vickers vd., 2002; Zaman vd., 2002). SARS-CoV-2 yüzeyindeki Spike proteininin S1 birimindeki RBD ile insan hücreleri içine girebilmek için ACE2'ye bağlanır (Machhi vd., 2020; Stower 2020; Paidi vd., 2021) . Başlangıçta Spike proteininin RBD'si açılır ve konağın ACE2 proteinine bağlanmaya hazır hale gelir. Spike proteini iki ACE2 proteinine bağlandıktan sonra üçüncü ACE2 proteinine de bağlanır (Şekil 11). Son olarak Spike protein kompleksi Furin ve transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) ile kesilerek ACE2-S1 fragmentini serbest bırakır. Furin, S1/S2 bölgesini ve TMPRSS2, S2' bölgesini ayırır (Bestle vd., 2020; Shang vd., 2020) (Şekil 12). Proteolitik kesimin ardından konağa giriş için hazır olan Spike proteininin S2 domaini kalır (Bestle vd., 2020; Yoshimoto, 2021).



Şekil 11. SARS-CoV-2 Spike proteini ve ACE2 bağlanma aşamalarını gösteren şema (Benton vd., 2020). Mavi, pembe-kahverengi ve sarı renkli bölgeler trimer yapıdaki Spike proteininin monomerlerini ve yeşil renkli bölgeler, ACE2'yi temsil etmektedir. Her aşamada Spike trimerinin önden ve üstten görüntüsü birlikte verilmiştir. Sırasıyla yukarıdan aşağıya saat yönünde; kapalı, açık ancak bağlı olmayan RBD, tamamen açık RBD, üç ACE2'ye bağlanmış Spike protein durumuna ulaşana kadar, sıralı, ACE2 bağlanması gösterilmiştir. Son trimerik türden monomerik S1-ACE2 ayrışması gösterilmiştir ki bu ayrışma bir veya iki ACE2 ile bağlanmış Spike proteininde de meydana gelebilmektedir (Benton vd.,2020) .



Şekil 12. A. Trimerik Spike proteininin kapalı konformasyon yapısı ve kısımları. Füzyon öncesi S protein trimeri kapalı formdadır, monomerleri sarı yeşil ve pembe renk ile gösterilmiştir S protein yapısının baş, sap ve transmembran (TM) segmentlerini görülmektedir. S1/S2 ve S2' bölünme bölgeleri kırmızı renktedir. B. Konak hücreye girişte Spike (S) protein ve ACE2'nin etkileşim şeması. (1) SARS-CoV-2'yi süsleyen prefüzyon S protein trimerinin içsel dinamikleri, konak ACE2 dimerik yapısı ve S:ACE2 tanınmasını kolaylaştırmak için S proteini ve ACE2'nin süpürme hareketleri gösterilmiştir. (2) Açık konformasyonda (S_{açık}), reseptör bağlanma alanı, konak membrana bağlı ACE2 reseptörünü tanımak ve bağlamak için bir "yukarı" yönelimi benimser (Protein Veri Bankası [PDB] ID: 1R42). ACE2 bağlanması, S1/S2 bölünme bölgesinde (kırmızı oklar), Furin (kırmızı-Furin burada ayrıca ilgili proteazları ifade eder) proteolizini destekleyen konformasyonel değişiklikleri indükler ve mekanizması bilinmeyen S1 ve S2 alt birimlerinin ayrışmasına yol açar. (3) Artık, ACE2'ye bağlı S1 alt birimi, ACE2'ye kararlı bir şekilde bağlı hale gelir ve S2 alt birimleri ayrılır. (4) Ayrılmış S2 alt birimindeki konformasyonel değişiklikler, konak hücre zarına füzyon, zar füzyonu ve konak hücreye viral giriş için genişletilmiş bir sarmal füzyon ara maddesinin (PDB ID: 6M3W) (Fan vd., 2020) oluşumunu teşvik eder (Hoffmann vd., 2020, Raghuvamsi vd., 2021).

SARS-CoV-1 ve HCoVNL63'ün (Hoffman vd., 2005) anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörü ile, HCoV-229E (Li vd., 2019) ve MERS CoV'nin (Liv d., 2020) ise aminopeptidaz N (APN) ve dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Aslında, DPP4'ün ayrıca SARS-CoV-2'nin Spike proteini için bir reseptör görevi görebileceği öne sürülmüştür (Li vd., 2020c, Amanat ve Kramer, 2020).

Tüm koronavirüs cinsleri arasında Spike proteinleri, yüksek oranda korunmuştur (Jaimes vd., 2020). Örneğin, SARS-CoV-2 Spike proteini, SARS-CoV-1 Spike proteinine % 76 sekans özdeşliği sergiler. Ancak, koronavirüs Spike proteinleri arasında enfeksiyon derecesi bakımından farklılıklar gösterebilecek kritik yapısal değişiklikler mevcuttur. Bu yapısal değişiklikler, reseptör bağlanma domaini (RBD) ve S1/S2 kesim bölgesi

konumundadır. Örneğin, SARS-CoV-1 ve MERS-CoV/HKU4'ün RBD'leri S1'in N-terminalinde bulunurken, MHV ve BCoV/OC43'ün RBD'leri S1'in C-terminalinde bulunur. MERSCoV/HKU4, MHV ve BCoV/OC43 Spike proteinleri sırasıyla DPP4 ve CEACAM1 reseptörlerine ve glikanlara bağlanırken, SARS-CoV-1 Spike proteini insan ACE2 reseptörünü tanır (Li, 2016).

Çalışmalar sonucunda aşı için hedef S proteini olarak belirlenmiş ve aşı adaylarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Genellikle bir aşının klinik deneylere çıkmadan önce tipik olarak ihtiyaç duyulan iki önemli adım vardır. İlk olarak aşı, koruyuculuğunun olup olmadığını görmek için uygun hayvan modellerinde test edilir (Bao vd., 2020). İkinci adım olarak, aşılardan hayvanlarda, örneğin tavşanlarda toksisite açısından test edilmesi gerekir. Genellikle viral tehdit bu sürecin bir parçası değildir, çünkü yalnızca aşının güvenliği değerlendirilecektir (Erbelding vd., 2018; Amanat ve Kramer, 2020). Ancak, SARS-CoV-2 için hayvan modellerinin geliştirilmesi zor olabilir. Çünkü virüs, yabanî tür farelerde replike olmaz ve sadece insan ACE2'sini ekspres eden transgenik hayvanlarda hafif hastalığa neden olur (Bao vd., 2020).

BioNtech/Pfizer tarafından geliştirilen başarılı LNP-mRNA temelli aşılarından biri olan BNT162b2, iki prolin değişikliği (K986P ve V987P) ile modifiye edilmiş tam uzunlukta bir Spike protein kullanır (Dai ve Gao, 2021). Bu değişiklikler, Spike proteininin füzyon öncesi durumdan füzyon sonrası duruma yapısal geçişini engeller ve füzyon öncesi (inaktif) durumu korur. Prolin değişikliklerinin Spike proteinleri stabilize etme yeteneği HIV-1, MERS-CoV, RSV ve SARS-CoV-1'den kalıtsaldır; bu nedenle, SARS-CoV-2 Spike proteininin yapısal ve işlevsel geçişinin daha iyi anlaşılmasıyla, COVID-19'a karşı yeni nesil aşıların ve terapötiklerin tasarımı için biyomedikal uygunluğa sahip olacaktır (Chen vd., 2021; Nishima ve Kulik, 2021).

Bu pandeminin son zamanlardaki ana odak noktalarından biri, giderek daha fazla ortaya çıkan ve daha bulaşıcı olan SARS-CoV-2 varyant suşlarıdır. D614G olarak adlandırılan bir suş, Spike proteinin 614. konumunda bir aspartat (D) yerine bir glisine (G) sahiptir (Volz vd., 2021). Bu 614G varyantı, artan enfeksiyon şiddetinin artışı ile ilişkili değildir, ancak 614G varyantının, D varyantına göre artan enfektiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür (Zhang vd., 2020). Ek olarak, 501Y.V1 ve 501Y.V2 olarak adlandırılan diğer varyantlar, Spike proteinin reseptör bağlama alanında (N501Y) ve diğer bölgelerde birkaç farklılığa sahiptir. Bu yapısal değişiklikler, Spike proteini ile konağın ACE2 reseptörü arasındaki etkileşimi artırarak enfeksiyonu artırabilir (Yoshimoto, 2021).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2), SARS-CoV-2 için önerilen reseptördür ve bir insan rekombinant çözünür ACE2'sinin yakın zamanda modifiye edilmiş insan dokusunda SARS-CoV-2 enfeksiyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Monteil vd., 2020). ACE2'ye bağlı bir Spike protein yapısı da rapor edilmiştir.

Spike protein 22 farklı glikozilasyon bölgesine sahiptir (Watanabe vd., 2020). Glikozilasyon bölgelerini anlamak önemlidir çünkü Biontech aşısı tarafından üretilen Spike proteini ve virüsten gelen Spike proteininin farklı glikozilasyon modellerine sahip olduğu gösterilmiştir (Brun vd., 2020; Yoshimoto vd., 2021). Glikanlar, protein katlanmasında ve konak bağışıklık sisteminden kaçmada önemli bir rol oynar (Gasteigher vd., 2005).

1.16. Amaç ve Hipotez

Önceki çalışmalarda, *Chromobacterium violaceum*'dan elde edilmiş Viyolasin'in çeşitli biyolojik aktiviteleri tespit edilmiştir (Duran vd., 2012). Bu pigmentin çok çeşitli biyolojik aktivitelerinin olması, farklı mikroorganizmalardan da bu pigmentin eldesini ilgi çekici hale getirmektedir. Farklı cins ve bakterilerden elde edilen kaba ekstraktlar içindeki Viyolasin ve Deoksiviyolasin miktarları değişkenlik gösterebilmektedir. *Jantynobacterium* cinsi ile yapılmış olan çalışmalar, Viyolasin sentezi yapan bu bakterilerin çoğunlukla farklı çevrelerden izolasyonu, pigment üretiminin artırımı, pigment üretiminin optimize edilmesi ve pigmentlerinin ekstrasyonu üzerinedir. Ancak *Jantynobacterium* sp.'den elde edilen Viyolasin ile yapılan biyolojik etkinlik çalışmaları oldukça sınırlıdır. Sıklıkla antimikrobiyal etkinlik çalışmalarına literatürde rastlanılmaktadır. Antifungal etkinliği üzerine de çalışmalar mevcuttur. Viyolasinin antiviral etkinliği *Chromobacterium violaceum*' dan elde edilen farklı virüslerle ve hücre kültürü ortamında test edilmiştir. Ancak literatürde HIV, HIV-1 RT enzimi ve SARS-CoV-2, Sars-CoV-2: ACE2 inhibiyonuna ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Yapılan literatür taramalarında Viyolasin'in antimikrobiyal etkinliğinin Gram pozitif bakterilerde (*S. aureus*, *S. epidermitis*), Gram negatif (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) bakterilere göre çok daha etkili olduğu bilgisine rastlanmıştır. Biyofilm oluşumu ve eradikasyonuna ilişkin yapılan araştırmalarda, *J. lividium* Viyolasin'inin metanol ekstraktının, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231 biyofilmi üzerine etkisini konu alan bir çalışma olduğu gözlenmiştir. Ancak halk sağlığı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan *E. faecalis* biyofilmi üzerine bir çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir.

Yukarıdaki belirtilen sebeplerden dolayı bu çalışmada:

Jantynobacterium sp. GMG-1 ve *Jantynobacterium* sp. GK suşlarının kaba Viyolasin pigment ekstraterinin antimikrobiyal etkinliğinin, HIV-1 RT enzimi inhibisyon etkisinin, SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin inhibisyon etkisinin, *E. faecalis*' in biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesine ve saflaştırılmış Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in HIV-1 RT enzimi inhibisyon etkisinin, SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin inhibisyon etkisinin incelenmesine karar verilmiştir.

Bu tez ülkemizden izole edilmiş *Jantynobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantynobacterium* sp. GK suşlarından elde edilen Viyolasin pigmenti ile yapılan biyolojik aktiviteleri içeren ilk çalışmadır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

NaCl (BBi Life Sciences), KCl (Merck), HCl (Sigma), Metanol (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (J.T. Baker), D(+)Glukoz Monohidrat (Tekkim), Tryptic Soy Broth (Merck), Tryptik Soy Agar (Merck), Agar (Conda Lab), Nutrient Broth (Merck), Nutrient Agar (Merck), Asetik asit (IsoLab), İzopropanol (Sigma), Amonyak Solusyonu (IsoLab), Gliserol (Applichem), Kloroform (Reidel de Haen), Di Etil Eter (J.T. Baker), N-Hekzan (Merck), pINT (Sigma Aldrich), Muller Hinton Broth (Merck), Katyon Ayarlı MHB (HiMedia), Dimetil Sülfoksit (Sigma-Aldrich), Kristal Viyole (Merck) kimyasalları belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Üreme Koşulları

Tez çalışmasında kullanılan 1 adet gıda kökenli *E. faecalis* suşu 74 ve 2 adet kontrol suşu (*E. faecalis* ATCC OG1RF ve *E. faecalis* ATCC 29212), Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. TSA (Tryptik Soy Agar) inoküle şekilde elimize ulaşan kültürlerden yeni TSA besiyerine ekim yapılarak 1 gece 37 °C’de üremeye bırakılmıştır. Süre sonunda herhangi bir kontaminasyon olmadığı belirlenen kültürlerden 3 ml TSB sıvı besiyerine ekim yapılmış, 150 rpm’ de 37 °C’de 1 gece geliştirildikten sonra gliserol stokları oluşturulmuştur. %20 gliserol içeren bakteri stokları -20 °C’ de saklanmıştır. Çalışma süresince kullanılan kültürler, stok solüsyonlarından alınarak 1/10 oranında TSB sıvı besin ortamına inoküle edilmiş ve 37 °C’de 1 gece üretildikten sonra deneylerde kullanılmıştır.

Jantrobacterium sp. GK ve *Jantrobacterium* sp. GMG-1 bakterileri Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hatice KATI’ dan Temin edilmiştir. Temin edilen bakteri suşları Nutrient Broth 150 rpm’ de 20 °C’ de 3 gün ve Nutrient Agar besiyerlerine ekilerek 3 gün süreyle 20 °C’de üremeye bırakılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Bakteriler	Referans	Özellikler
<i>Jantibacterium</i> sp. GK	Giresun Üniversitesi Prof. Dr. Hatice KATI	Viyolasin üreticisi
<i>Jantibacterium</i> sp. GMG-1	Giresun Üniversitesi Prof. Dr. Hatice KATI	Viyolasin üreticisi
<i>E.faecalis</i> 29212	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı	Kontrol suşu
<i>E.faecalis</i> OG1RF	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı	Kontrol suşu
<i>E.faecalis</i> 74	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı	Gıda kökenli biyofilm üreticisi
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Kontrol suşu
<i>Enterobacter cloacea</i> ATCC 13047	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı	Antimikrobiyal etkinlik kontrol suşu

2.1.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

Tablo 2. Nutrient Broth ve Agar (Merck)

İçerik	Miktar (g/L)
Pepton	15
Maya ekstraktı	3
Sodyum Klorür	6
D(+) Glukoz	1
Agar	15

Tablo 3. Muller Hinton Agar (Merck)

İçerik	Miktar (g/L)
Et infüzyonu	2
Kazein hidrolizatı	17,5
Nişasta	1,5
Agar Agar	13

1 litrede 34,0 g olacak şekilde tartılır. 800 ml de çözülür ve pH $7,4 \pm 0,2$ olacak şekilde ayarlanır son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C 15 dakika otoklavlanır.

Tablo 4. Katyon Ayarlı Muller Hinton Broth (HiMedia)

İçerik	Miktar (g/L)
Sığır ekstresi	3
Kazein asit hidrolizatı	17,5
Nişasta	1,5

Üretici firma tarafından performans parametrelerine uyması için 20-25 mg/L kalsiyum ve 10-12.5 mg/L magnezyum sağlamak için uygun tuzlarla desteklenmiş olan MHB' dir. 1000 ml hacimde 22 gram olacak şekilde tartılmış ve 800 ml' de çözülerek pH 7.3 ± 0.1 olarak ayarlanmıştır. Son hacim 1000 ml' ye tamamlanıp 121 °C 15 dakika otoklav kullanılarak sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

Tablo 5. Tryptic Soy Broth ve Tryptic Soy Agar

İçerik	Miktar (g/L)
Pepton (Kazein'den)	17
Pepton (Soya'dan)	3
Di-Potasyum Hidrojen Fosfat	2,5
D(+)-Glukoz	2,5
NaCl	5
Agar Agar	10

Besiyeri içerikleri 800 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Ortam pH'sı $7,3 \pm 0,02$ 'ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri Durham şişesi içinde, şişenin kapağı gevşek bırakılarak ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.3.1. Triptik Soy Broth % 1 Glukoz (TSBG) Sıvı Besiyeri

100 ml TSBG sıvı besiyeri için, steril kabin içerisinde otoklavlanmış 10 ml TSB sıvı besiyeri steril bir falkon içerisine aktarılmıştır. 1 g glukoz tartılarak TSB bulunan falkona aktarılmış ve vorteks yardımı ile tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Steril bir erlen içerisine 90 ml TSB aktarılmıştır. Aseptik şartlarda tek kullanımlık steril enjektör yardımı ile falkondaki % 10' luk 10 ml TSBG karışımı alınmıştır. Enjektöre steril 0,22 µm gözenek çaplı selüloz asetat şırınga filtresi (AISIMO) bağlandıktan sonra %10' luk TSBG çözeltisi 90 ml TSB sıvı besiyeri içeren erlen içerisine filtre edilmiştir.

2.1.4. Çözeltiler

Tablo 6. Fosfat Tuzu Tamponu (PBS- Phosphate Buffer Saline)

İçerik	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

İçerikler 800 ml steril dH₂O içerisinde çözüldükten sonra, çözeltinin hacmi yine dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 7. Fizyolojik Tuz Çözeltisi (% 0,9)

İçerik	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	9

NaCl 9g 1000 ml' de çözülmüş ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 8. Kristal viyole çözeltisi (%1)

İçerik	<u>Miktar (g/L)</u>
Kristal Viyole	10

5 g kristal viyole 500 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra tortuların uzaklaştırılması için kurutma kağıdı ile filtre edilerek kullanılmıştır.

Tablo 9. 1 Normal (N) Hidroklorik Asit (HCl)

İçerik	<u>Miktar (ml/ L)</u>
HCl	83,33

110 ml dH₂O içerisine 10 ml 12 N HCl eklenmiş ve 1 N' lik çalışma çözeltisi oluşturulmuştur.

Tablo 10. % 33' ük Asetik asit

İçerik	<u>Miktar (ml/ L)</u>
Glasiyel Asetik Asit	330

100 mL için 67 ml dH₂O içerisine 33 ml glasiyel asetik asit eklenerek hazırlanmış ve çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.5. Kitler

HIV-1 RT İnhibisyon Kolorimetrik Test Kiti (Roche Diagnosis, Almanya) ve SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2-Biyotin İnhibisyonu Test Kiti (BPS Bioscience, Kat. No. 79954, USA) belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.6. Antiviraller

Viramune (Nevirapin) 200 mg (Boehringer Ingelheim) belirtilen firmadan temin edilmiştir.

2.1.7. Bilgisayar Yazılımları

İstatistiki verilerin hesaplanmasında IBM Corp. Release 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. programı kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. *Jantynobacterium sp.* GMG-1 ve *Jantynobacterium sp.* GK Bakterilerinden Kaba Viyolasin'in Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılacak olan Viyolasin maddesi *Jantynobacterium sp.* GMG-1 ve *Jantynobacterium sp.* GK suşlarından, Yada vd. (2008) yöntemine göre elde edildi. Elde edilen kaba Viyolasin ile antimikrobiyal etkinlik testi, antioksidan etkinlik testi, HIV-1 RT inhibisyon testi, SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 inhibisyon testi ve biyofilm formasyonu inhibisyonu testleri yapıldı. Tüm deneylerde kaba Viyolasin'e ait tozdan istenilen mg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanarak kullanıldı.

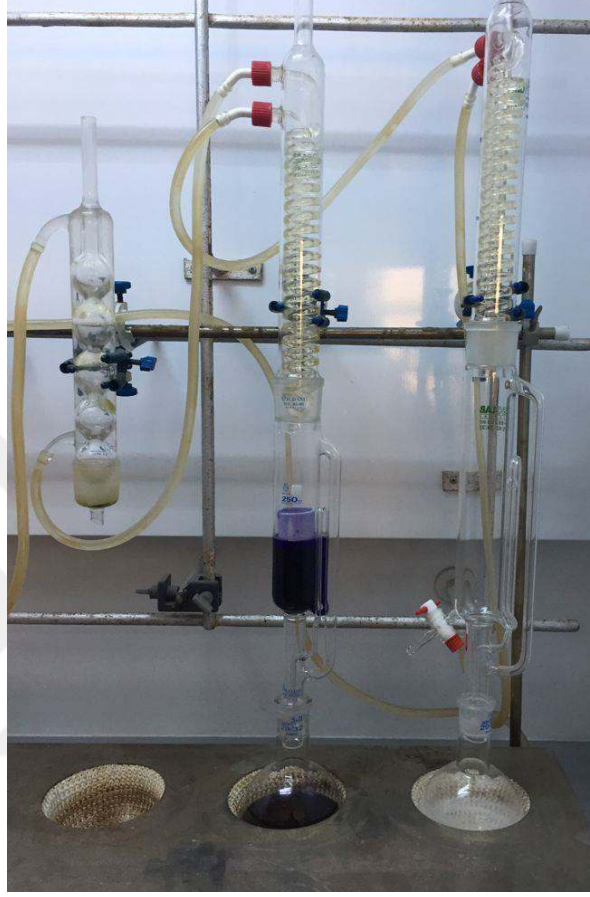
Viyolasin pigment ekstrasyonu için; *Jantynobacterium sp.* GK ve *Jantynobacterium sp.* GMG-1 suşları, Nutrient Broth Agar besiyerine ekildi. 20 °C'de 3 gün süre ile üretilen kültürlerin yüzeyindeki bakteri kolonileri steril spatula yardımıyla sıyrılarak ve steril bir falkon tüpü içerisine toplandı. Viyolasin ekstraksiyonu, Yada vd. (2008) geliştirdiği metot ile gerçekleştirildi. Bakteri kolonilerinin oluşturduğu pellet steril distile su ile yıkandı ve 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Yıkama işleminden sonra pigmentin ayrıştırılması için 100 mg pellet 1 ml metanol içerisinde çözülerek süspanse edildi. Pellet sallayıcıda 1 saat sallamaya bırakıldı. Daha sonra tekrar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pigmenti içeren kısım olan süpernatantlar erlenlerde toplandı. Pellet mor renginden gri-beyaz renge dönünceye kadar çözücü ekleme basamağından itibaren işlemler tekrarlandı. Toplanan süpernatantlar evaporatör ile içerisinde bir miktar çözücü kalacak şekilde buharlaştırıldı. Kalan çözücünün tamamen uçması için 40 °C'de 1 gece bekletildi.

Tüm deneysel çalışmalarda elde edilen kaba Viyolasin ile antimikrobiyal etkinlik testi, antioksidan etkinlik testi, HIV-1 RT inhibisyon testi, SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 inhibisyon testi ve biyofilm formasyonu inhibisyonu testleri yapıldı. Tüm deneysel çalışmalarda kaba Viyolasin ekstreleri istenilen konsantrasyona (mg/ml) göre % 10 DMSO içerisinde çözüldü.

2.2.2. *Jantynobacterium sp.* GK Viyolasin'inin Saflaştırması

Saflaştırma *Jantynobacterium sp.* GK' dan elde edilmiş olan kaba Viyolasin ekstresi için Rettori ve Duran (1998) metoduna göre gerçekleştirildi. 590 mg *Jantynobacterium sp.* GK suşu kaba Viyolasin'i, bir filtre kağıdı içerisine paketleni ve 250 ml'lik Soxhlet içerisine yerleştirildi. İlk olarak 250 ml kloroform ile, ikinci olarak dietil eter ile 3-4 saat ve

üçüncü olarak etanol ile 3 saat boyunca sürekli Soxhlet ekstraksiyonları uygulandı (Rettori ve Duran, 1998) (Şekil 13).



Şekil 13. Soxhlet ekstrasyonu ile *Jantionobacterium* sp. GK kaba Viyolasin'in kısmi saflaştırılması.

Her adım sonrasında elde edilen özler, ayrı ayrı darası önceden kaydedilmiş olan balonların içerisine aktarıldı. Evaporatör ile kloroform, eter ve etanol özlerinin çözücülerini 50 °C' de buharlaştırıldı. Tamamen kurumuş olan özler sırasıyla kloroform için 197 mg, di etil eter için 8,4 mg ve metanol için 90,4 mg yarı saflaştırılmış özütler verdi. Elde edilen özlerin saflığı ince tabaka kromatografisi (TLC) ile kontrol edildi. Kaba etanolik Viyolasin özü (90,4 mg), metanol (30 ml) içerisinde çözüldü ve 15 g silika jele (Silica gel 60) emdirildi, ardından çözücü indirgenmiş basınç altında 50 °C' de buharlaştırıldı. Silikaya emdirilmiş olan Viyolasin kolona yüklendi ve vakum sıvı kolon kromatografisi (VLCC, Silicagel 60, 230-400 ağ geçiş hızı) ile ayırma tabi tutuldu (Şekil 14).



Şekil 14. Saf Viyolasin eldesi için vakum sıvı kolon kromatografisi (VLCC) işleminin yapılışı.

Gradyan elüsyonuyla N-heksan (100 ml), n-heksan-kloroform (30:10, 30:20, her 100 ml) , kloroform (100 ml), kloroform-metanol (50:3, 50:4, 60:4, 60:5, 40:20, 50:50, her biri 100 ml) ve metanol (100 ml) çözücü ve çözücü karışımları kullanılarak 32 alt fraksiyon (her biri yaklaşık 30 ml) elde edildi. Her fraksiyon ince tabaka kromatografisi(TLC) ile kontrol edildi. Aynı yerde bant veren 3-5 numaralı alt fraksiyonlar Deoksiviyolasin (18,3 mg), 18-21 numaralı alt fraksiyonlar karışım (25,9 mg) ve 22-29 numaralı, Viyolasin (45,3 mg) verdi.

VLCC ile elde edilmiş olan saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin maddeleri % 10 DMSO ile çözülerek ana stoklar (Viyolasin için 10 mM ve Deoksiviyolasin için 5 mM) oluşturuldu ve 4 °C' de muhafaza edildi. Oluşturulan stoklar çalışılmak istenilen konsantrasyonlara seyreltilerek HIV-1 RT inhibisyonu ve SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 testlerinde kullanıldı.

2.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Kaba GK ve GMG-1 ekstralarında Viyolasin pigmentinin varlığını belirlemek için ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanıldı. TLC (Merck Silicagel 60F254, Kat.105554) üzerine metanol ile çözülmüş kaba Viyolasin ekstralarının farklı konsantrasyonlarından (4, 3, 2 ve 1 mg/ml) 10' ar µl olacak şekilde TLC levhasına uygulandı. Kurutma makinası yardımı ile iyice çözücü uzaklaştırıldıktan sonra levha izopropanol/amonyak/su (8:1:1) karışımı (yürütme çözeltisi) bulunan tank içerisine yerleştirildi (Malar vd, 2014). Numunelerin levhanın yaklaşık ¾'ü kadar yürütmesine izin verildi. Plakalar, UV ışığı ile nitel olarak incelendi. R_f (Retention Factor) değerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı:

$$R_f = \frac{\text{Örneğin aldığı mesafe}}{\text{Çözücünün aldığı mesafe}}$$

2.2.4. Antimikrobiyal Etkinlik Testi

Jantionobacterium sp. GK ve *Jantionobacterium sp.* GMG-1 suşlarından elde edilen kaba Viyolasin maddesine ait antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde CLSI'ya (Clinical and Laboratory Standarts Institute) göre belirlenen mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan "U" tabanlı ve 96 kuyucuklu steril polistren mikrolaka (Corning Costar, Referans no 3795) içerisindeki tüm kuyucuklara 100 µl Muller Hinton Broth besiyeri eklendi. Antimikrobiyal etkinlik testinde kullanılacak olan her bir bakteriye ait ilk kuyucuğa 100 µl 10 mg/ml'lik kabaViyolasin'den eklenip karıştırılarak homojenize edildi. Ardından ilk kuyudan alınan 100 µl karışım bir sonraki kuyucuğa eklenerek dilüye edildi ve homojen olacak şekilde tekrar pipetaj işlemi yapıldı. Bu işlemler 10. kuyucuğa kadar tekrar edildi. 10. kuyucuktan elde edilen karışımın 100 µl'si negatif kontrol (besiyeri ve test maddesi karışımı) olarak kullanılan 11. kuyucuğa aktarıldı. Besiyeri ve bakteri karışımının bulunduğu 12. kuyucuk ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kaba Viyolasin'lere ait 10 mg/ml (%100 DMSO içinde) stok çözelti kullanıldı. 10 mg/ml stok çözeltiden hazırlanan 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,312mg/ml, 0,156 mg/ml ve 0,078 mg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Negatif kontrol hariç diğer tüm kuyuların son hacmi 100 µl' dir.

Viyolasin'in antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan bakteriler (Tablo 11) 4 ml steril %0,9'lik tuz çözeltisi içerisinde McFarland 0,5 standartına uygun bulanıklıkta densometer kullanılarak hazırlandı. Bu işlemin ardından hazırlanan bakteriler steril %0,9'lik tuz çözeltisi ile 1/10 oranında dilüye edildi ve her birinden alınan 5 µl süspansiyon negatif kontrol kuyucuğu hariç diğer mikropkaya kuyucuklarına aktarıldı. Her bakteri için ayrı ayrı hazırlanan mikropkalar 37 °C etüvde (Nüve, EN 500) 24 saat ve *Candida albicans* ise oda sıcaklığında 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakterilerdeki üremelerin görüntülenmesi için pINT (*p*-Iodonitrotetrazolium chloride) ile boyama işlemi gerçekleştirildi (Kuate vd., 2012). 200 µg/ml' lik pINT boyasından her bir kuyucuğa 40 µl eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Rengin pembeye döndüğü kuyucuklarda her bakteri ve fungus üremesi pozitif olarak değerlendirilirken, renk değişiminin gözlenmediği kuyularda üreme negatif olarak değerlendirildi (Kuate v.d., 2012). GMG-1 ve GK kaba Viyolasin'lerin farklı konsantrasyonları için antimikrobiyal etkinin olduğu kuyular nitel olarak gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar fotoğraf ile kayıt altına alındı.

Tablo 11. Mikrodilüsyon metodu ile Antimikrobiyal etkinliği belirlemek için kullanılan mikroorganizmaların listesi

	Mikroorganizma Adı
1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633
2	<i>Enterobacter cloacea</i> ATCC 13047
3	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
4	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
6	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
8	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911
9	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

2.2.5. HIV-1 RT İnhibisyon Testi

Viyolosinin HIV-1 RT üzerindeki etkinliğinin belirlenmesinde ticari olarak satın alınan HIV-1 Reverse Transkriptaz Kolorimetrik Test kiti (Roche Diagnostic, Almanya, Kat.

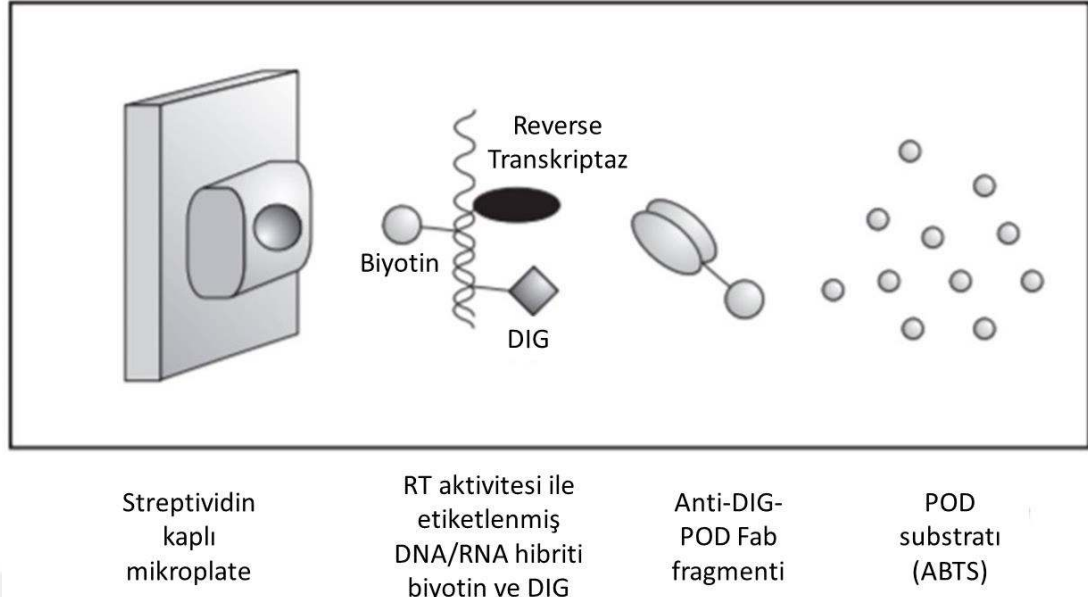
No: 11 468 120 910) kullanıldı. Uygulama kit prosedürü takip edilerek gerçekleştirildi. Temiz bir mini santrifüj tüpü içerisinde soğuk lizis tamponu ve her bir kuyu için 20 µl olacak şekilde rekombinat HIV-1 RT (son konsantrasyon 4 ng) eklenerek hazırlandı. Test için yeterli olacak kadar kuyu modülü çıkarıldı ve mikropilaka çerçevesi içine yerleştirildi. Kuyulara 60 µl test edilecek madde (GMG-1 ve GK Kaba ekstraktlarının % 10 DMSO ile çözünmüş farklı konsantrasyonları) aktarıldı.

Tablo 12. HIV-1 RT İnhibisyon test kiti çalışmasında kuyucuk içerikleri

	Kör	Pozitif Kontrol	Test Grubu
Lizis Tamponu	40 µl	20 µl	20 µl
HIV-1 RT	20 µl	20 µl	20 µl
Nevirapine (20 mM)	-	20 µl	-
%10 DMSO		-	-
RT İnhibitörü	-	-	20 µl
TOPLAM	60 µl	60 µl	60 µl

* RT İnhibitörü (%10 DMSO ile çözünmüş GMG-1 ve GK Viyolasin ekstre dilüsyonları)

Alüminyum folyo ile kaplanan modül, 37 °C sıcaklıkta 250 rpm’ de 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucukların içerisindeki solüsyonlar tamamen uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından 250 µl yıkama çözeltisi ile 30 saniye süreyle yıkama işlemi yapıldı ve bu işlem 5 kez tekrar edildi. Dikkatli bir şekilde uzaklaştırılan yıkama solüsyonunun sonrasında her bir kuyucuğa 200 µl anti-DIG-POD (200 mU/ml) eklenerek karanlıkta 37 °C sıcaklıkta 250 rpm’ de 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklarda bulunan çözeltiler uzaklaştırılarak yukarıda bahsedildiği gibi 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında tüm kuyucukların herbirine 200 µl ABTS substrat çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında yeşil renk oluşana kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikropilaka okuyucu cihazda (Molecular Devices Spectramax M2 Multimode Microplate Reader) 405 nm dalga boyunda (referans dalgaboyu 490 nm alındı) ve 405 nm değerinden 490 nm değeri çıkarılarak, okuma yapıldı. Pozitif kontrol ve negatif kontrol kuyularının farkına bağlı olarak örneklerin inhibisyon yüzdeleri hesaplandı. Tüm örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı.



Şekil 15. HIV-1 reverse transkriptaz kolorimetrik test kitinin çalışma prensibi (Soldan sağa). RT aktivitesi için bir parametre olarak sentezlenen DNA'nın saptanması ve nicelenmesi, bir sandviç ELISA protokolünü takip eder: Biotin etiketli DNA, streptavidin ile önceden kaplanmış mikrolaka (MP) modüllerinin yüzeyine bağlanır. Sonraki adımda, peroksidaza (anti-DIG-POD) konjuge olan digoksinin antikoru, digoksinin etiketli DNA'ya bağlanır. Son adımda, ortama peroksidaz substratı ABTS eklenir. Peroksidaz enzimi, renkli bir reaksiyon ürünü üreterek substratın bölünmesini katalize eder. Bir mikrolaka (ELISA) okuyucu kullanılarak numunelerin absorbansı belirlenir ve numunedeki RT aktivitesinin derecesi ile doğrudan ilişkilidir (URL-10).

2.2.6. Spike S1 (SARS-CoV-2): ACE 2 İnhibisyon Testi

Viyolasin'in SARS-CoV-2 üzerindeki etkinliğinin belirlenmesinde ticari olarak satın alınan Spike S1 (SARS-CoV-2): ACE 2 İnhibisyon Testi kiti (BPS Bioscience, USA, Kat. No 79954) kullanıldı. Spike S1 proteini ve ACE2-Biyotin çözüldü. Her iki protein için ayrı ayrı tek kullanımlık alikotlar (bir mikrosantrifüj tüpünde 8 kuyu çalışılacak kadar Spike S1 proteini içeren) hazırlandı ve hemen -80 °C'ye kaldırıldı. Kit ile çalışmadan 1 gün önce çalışılacak örnek sayısına uygun miktarda Spike S1 proteini çözündürülerek PBS ile 2 µg/ml konsantrasyona dilüye edildi. 2 µg/ml Spike S1 dilüsyonundan kit içerisinden çıkan mikrolakanın çalışılacak kuyularına 50 µl aktarıldı. Test mikrolakası, 4 °C' de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üst sıvı uzaklaştırıldı. Çalışılacak kuyular, 100 µl 1X İmmüno Buffer ile 3 kere yıkandı. Mikrolaka temiz bir peçeteye ters çevrilerek kalan sıvının uzaklaşması sağlandı. 100 µl Bloklama tamponu 2 eklenerek 10 dakika oda

sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kuyular, 100 µl 1X İmmüno tamponu ile 3 kere yıkandı ve temiz bir peçeteye mikropilaka ters çevrilerek kurutuldu.

1. Basamak:

İnhibitör etkinliği test edilmek istenen GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstraları (Şu andan itibaren ‘Test inhibitör’ olarak adlandırılacaktır) steril mikrosantrifüj tüpleri içerisinde % 10 DMSO ile çalışılmak istenen konsantrasyonlara dilüye edildi.

Çalışmaya yetecek miktarda ACE2-Biyotin -80 °C’ den çıkarıldı ve buz üzerinde çözülmesi sağlandı. Ardından hızlı santrifüj ile tüm içeriğin tüpün dibine toplanması sağlandı ve son konsantrasyonu 1 ng/µl (yaklaşık 12 nM) olacak şekilde 1X İmmüno tamponu ile dilüye edildi. Kullanılacağı ana kadar ACE2-Biyotin proteini buz üzerinde bekletildi. Pozitif kontrol ve test inhibitör kuyularının hepsine ACE2-Biyotin 1 ng/ µl’den 20 µl eklendi.

Kontrol olarak kullanılan kör kuyu içeriği, 40 µl 1X İmmüno tamponu ve 10 µl % 10 DMSO olarak tasarlandı.

Pozitif kontrol kuyu içeriği olarak, 20 µl 1X İmmüno tamponu, 10 µl % 10 DMSO ve 20 µl ACE2-Biyotin (1 ng/µl) kullanıldı. Viyolasin ekstresi kuyu içeriği olarak 20 µl 1X İmmüno tamponu, 10 µl Test inhibitör (GMG-1 ve GK kaba ekstralarının farklı konsantrasyonları) ve 20 µl ACE2-Biyotin (1 ng/µl) kullanıldı.

Test kuyuları ilgili gruplar için aşağıdaki tabloya göre oluşturuldu:

Tablo 13. Spike S1(SARS-CoV-2): ACE 2 test kiti çalışmasında kuyucuk içerikleri

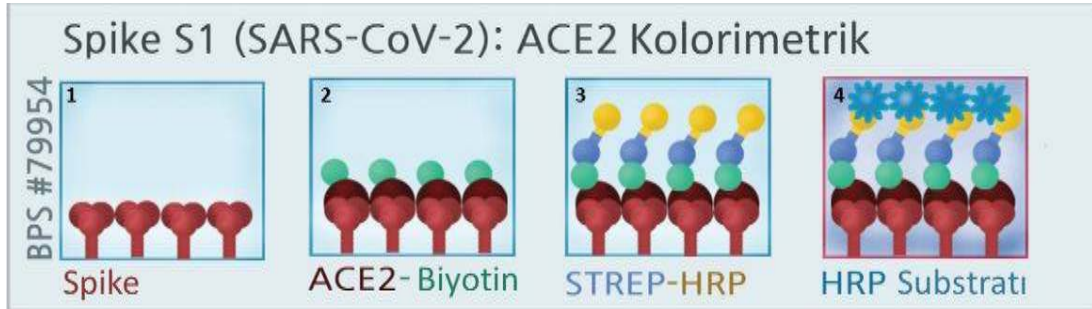
	Kör	Pozitif Kontrol	Test İnhibitör
1X İmmüno Tamponu	40 µl	20 µl	20 µl
Viyolasin ekstresi (%10 DMSO)	-	-	10 µl
İnhibitör Tamponu (% 10 DMSO)	10 µl	10 µl	-
ACE2-Biyotin (1 ng/µl)	-	20 µl	20 µl
Toplam	50 µl	50 µl	50 µl

Test plakası, oda sıcaklığında 250 rpm’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 100 µl 1 X İmmüno tamponu ile 3 tekrarlı olarak yıkandı. Kalan solüsyon mikropilakanın temiz bir kağıt havluya ters kapatılması ile uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklara 100 µl bloklama tamponu 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika

inkübe edildi. Bu işlem sonrasında daha önce bahsedilen 100 µl 1X immuno tamponuyla 3 kez yıkama ve kurulama işlemi yapıldı.

2. Basamak:

Streptavidin-HRP, Bloklama tamponu 2 kullanılarak 1000 kat dilüye edildi. Dilüye edilen Streptavidin-HRP'den tüm kuyucuklara 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 250 rpm hızda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası daha önce bahsedildiği gibi yıkama ve kurulama işlemleri yapıldı. Yıkama sonrası her kuyucuğa 100 µl bloklama tamponu 2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika boyunca beklendi. Ardından daha önce bahsedildiği gibi tekrar yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa 100 µl kolorimetrik HRP substratı eklendi ve pozitif kontrol kuyusunda mavi renk oluşumu gerçekleşene kadar (yaklaşık 3-4 dk) inkübe edildi. Pozitif kontrol kuyucuğunda renk oluşumunun ardından tüm kuyucuklara 100 µl HCl (1 N) eklendi ve mikroparka okuyucu cihazda (Molecular Devices Spectramax M2 Multimode Microplate Reader) 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Kör/negatif kontrol için lizis tamponu kullanıldı ve test inhibitör grubu ile pozitif kontrolün absorbans değerlerinden kör değeri çıkarıldı. Pozitif kontrol ile test grubunun absorbans değerleri karşılaştırılarak % inhibisyon değerleri hesaplandı. Tüm çalışma 3 tekrar halinde yapıldı.



Şekil 16. SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2-Biyotin test kitinin çalışma prensibini gösteren şema. Sırasıyla; 1. Spike S1 proteini 96 kuyulu transparan mikroparkaya bağlanır, 2. ACE2-Biyotin Spike S1' in bağlandığı mikroparkadaki kutucuklara eklenir ve inkübe edilir. 3: Son olarak mikroparkaya Streptavidin-HRP substratı eklenir, 4. Streptavidin-HRP substratının eklenmesini takiben HRP substratı renk oluşturur. Bu sayede UV/Vis spektrofotometre aracılığı ile transmittens ölçülerek, inhibisyon olup olmadığı veya miktarı belirlenir. (URL-11)

2.2.7. Biyofilm Formasyonunun İnhibisyonu Testi

Kaba Viyolosin'lerin biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi için Extremina ve diğerlerinin (2010) önerdiği yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla *E. faecalis* 29212, *E. faecalis* OG1RF ve *E. faecalis* 74 bakterileri TSB (Tryptik Soy Broth) besiyeri içerisine alınarak, 37 °C sıcaklıkta aerobik koşullarda 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan kültür ortamından aktif kültür hazırlamak için, ilk oluşturulan kültür içerisinden 1/100 oranında alınan bakteri 50 ml'lik erlendeki 5 ml TSB içerisine inoküle edildi ve 37 °C sıcaklıkta aerobik koşullarda 18 saat inkübe edildi. Hazırlanan aktif kültürden steril % 1 glukozlu TSB içerisinde McFarland 0,5 bulanıklık standartına uygun olarak yeni bakteri kültürü hazırlandı. Steril düz tabanlı mikropalakada farklı kuyucuklar içerisine sırasıyla (Sarstedt, Ref. No 83.3924) besiyerinin sterilitesinin kontrolü için %1' lik TSB' den 200 µl, negatif kontrol grubu için bakteri süspansiyonundan 200 µl, test grubu için bakteri süspansiyonundan 190' ar µl aktarıldı. Test grubu için ve farklı konsantrasyonlardaki (%10 DMSO içinde 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ ml, 2,5 mg/ ml) GMG-1 ve GK kaba ekstratlarından 10'ar µl hazırlanmış olan mikropalaka içerisindeki ilgili kuyulara aktarıldı. Hazırlanan mikropalakalar 150 rpm hızda, 37 °C sıcaklıkta ve aerobik koşullarda 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bakteri üremesinin belirlenmesi için mikropalaka okuyucu cihazda (Molecular Devices Spectramax M2 Multimode Microplate Reader) 570 nm absorbansta ölçüm yapıldı. Tüm kuyucuklar steril 200 µl PBS ile 2 kez yıkanarak biyofilm tabakasının fiksasyonu ve kurutma için 60 °C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. Ardından 200 µl % 95 metanol eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve biyofilmin fiksasyonu sağlandı. Bu işlem sonrasında metanol uzaklaştırıldı ve mikropalaka oda sıcaklığında kurutuldu. Biyofilm tabakasının boyanması için, kuyucuklara 200 µl % 1 kristal viyole aktarıldı ve biyofilm tabakasına boyanın nüfuz etmesi için 20 dakika bekletildi. Süre sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için 300 µl steril distile suyla 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası mikropalaka temiz bir kağıt havlu üzerine ters çevrildi ve hafifçe vurularak kalan su uzaklaştırıldı. Biyofilm tabakası içine hapsolmuş kristal viyolenin salınımı için, kuyucuklara 200 µl % 33 glasiyel asetik asit eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bu işlem sonrasında biyofilm tabakasından salınan kristal viyole miktarını belirlemek için Mikropalaka okuyucu cihazda 595 nm absorbans değerinde ölçüm yapıldı. Çalışma her konsantrasyon için 4 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen absorbans değerleri ile aşağıdaki formül kullanılarak % biyofilm formasyon inhibisyonu (BFI) hesaplandı:

$$\% \text{ BFI} = ((\text{O.D. KONTROL} - \text{O.D. NUMUNE})) \times 100$$

2.2.8. İstatistiksel Analizler

Jantibacterium sp. GK ve *Jantibacterium sp.* GMG-1 suşlarından elde edilen kaba Viyolasin maddesine ait antimikrobiyal etkinlik, HIV-1 RT inhibisyonu ve Spike S1 (SARS-CoV-2): ACE 2 inhibisyonuna ait veriler nitel ve az sayıda veriye sahip olduğundan istatistiksel analize gerek olmamıştır. Biyofilm oluşum inhibisyonunda ise elde edilen veriler SPSS veri analiz yazılım programı (IBM Corp. Release 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ile analiz edildi. Öncelikle biyofilm oluşum inhibisyonları yüzde olarak hesaplandığından, bu verilere ait yüzde oranları Arcsin dönüşümleri yapılarak doğrusal hale getirildi. Bu işlem sonrasında biyofilm inhibisyonuna ait tüm verilerin Lavene's testi ile normal dağılıp dağılmadıkları belirlendi. Lavene's testine ait önemlilik analizleri sonrası normal dağılım gösteren inhibisyon verileri için One Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) uygulanarak, gruplar arası güvenilirlik testleri LSD (Least Significant Difference) ile geręekleřtirildi. Biyofilm oluşum inhibisyon oranlarına ait elde edilen tüm sonuçlar, % 95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi ($p < 0.05$).

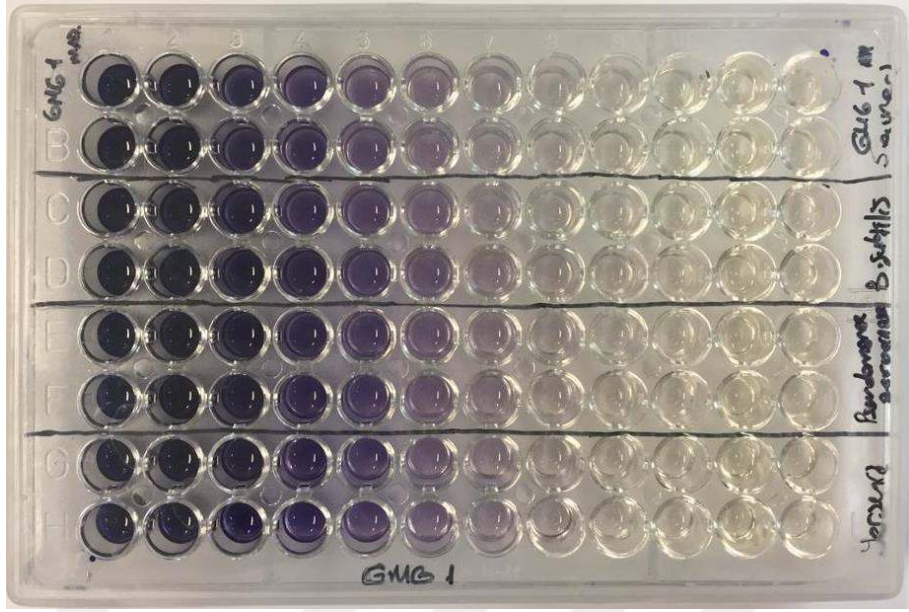
Şekil 17. *Jantınobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantınobacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstesinin TLC sonuçlarının UV altındaki görüntüsü.

3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi

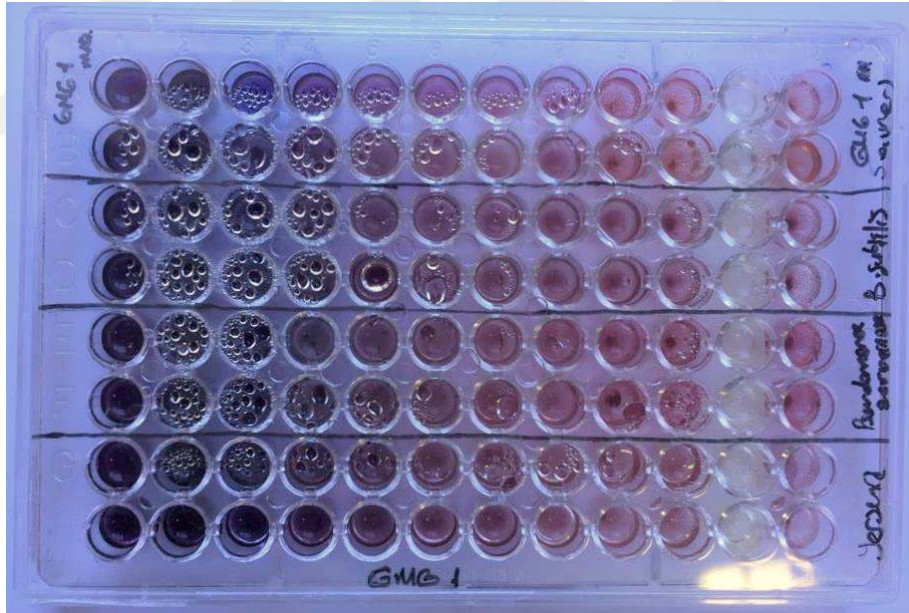
GMG-1 ve GK suşlarından elde edilmiş kaba Viyolasin ekstraktlarının ana stoğu %100 DMSO ile çözülmüş ve % 10' dan az DMSO içeren kuyular (5-10 numaralı) antimikrobiyal özellikleri bakımından test edilmiştir. Testlerde kullanılan organizmaların MİK değerleri Tablo 14' te gösterilmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmasının sonuçları şekil 19, 20, 21, 22 ve 23' te gösterilmektedir. Her şekil içerisindeki fotoğraflarda hangi ekstrenin hangi bakteriye uygulandığı belirtilmiştir. Her iki kaba ekstrenin kuyulardaki son konsantrasyonları soldan sağa (1-10 numara) 5- 0,00975 mg/ml' dir. 11 numaralı kuyu negatif kontrol ve 12 numaralı kuyular pozitif kontroldür. Her mikroorganizma türü için çift tekrar yapılmıştır. Fotoğraflarda pembe rengin görüldüğü her kuyu bakteriyel üremenin varlığını gösterirken, pembe rengin görülmediği kuyular bakteriyel üremenin baskılandığını ve dolayısıyla etkili minimum konsantrasyon değerini belirtir.

Tablo 14. *Jantrobacterium* sp. GMG-1 ve GK suşlarına ait kaba Viyolasin ekstraktlarının MİK değerleri

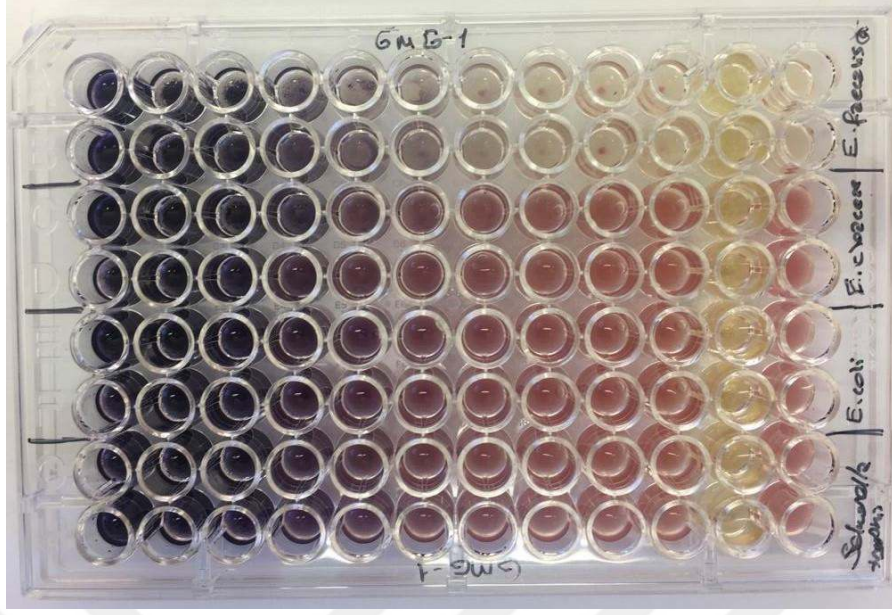
Mikroorganizma Türü	MİK değeri (mg/ml)	
	GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktı	GK kaba Viyolasin ekstraktı
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	0,0195	0,039
<i>Enterobacter cloacea</i> ATCC 13047	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,156	0,3125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,039	0,00975
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	-	0,156
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-



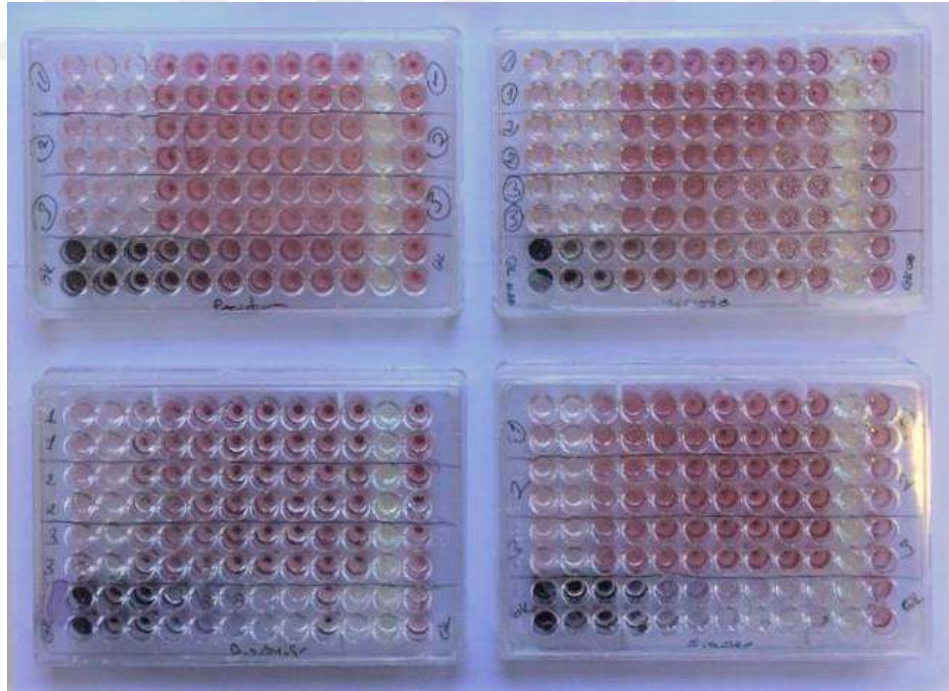
Şekil 18. MİK için *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların (1-10 numaralı kuyularda son konsantrasyonlar soldan sağa, 5 mg/ml-0,00975 mg/ml) hazırlanışı.



Şekil 19. *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersina pseudotuberculosis* ATCC 911 için MİK sonuçları.

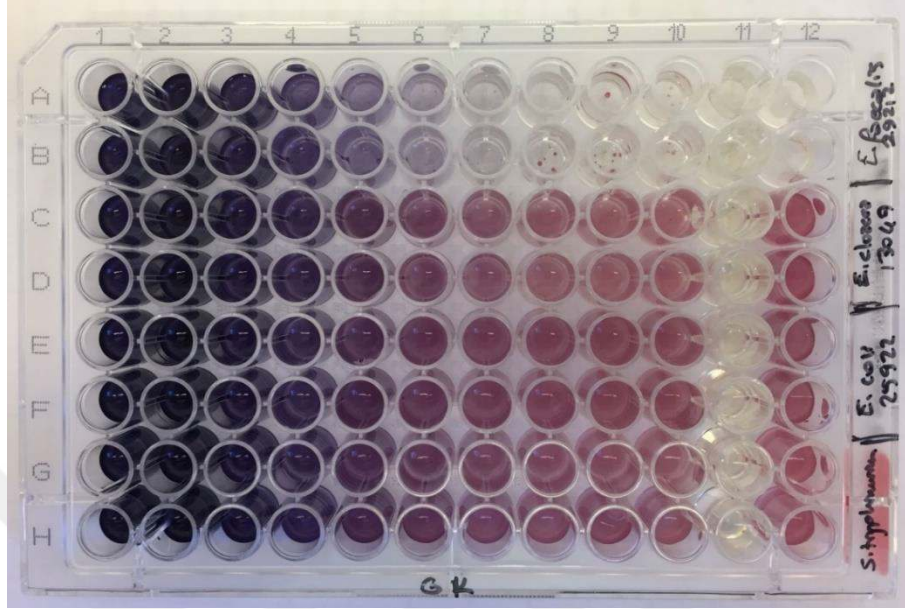


Şekil 20. *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 için MİK sonuçları. Sadece *Enterococcus faecalis* ATCC 29212’de etkilidir.

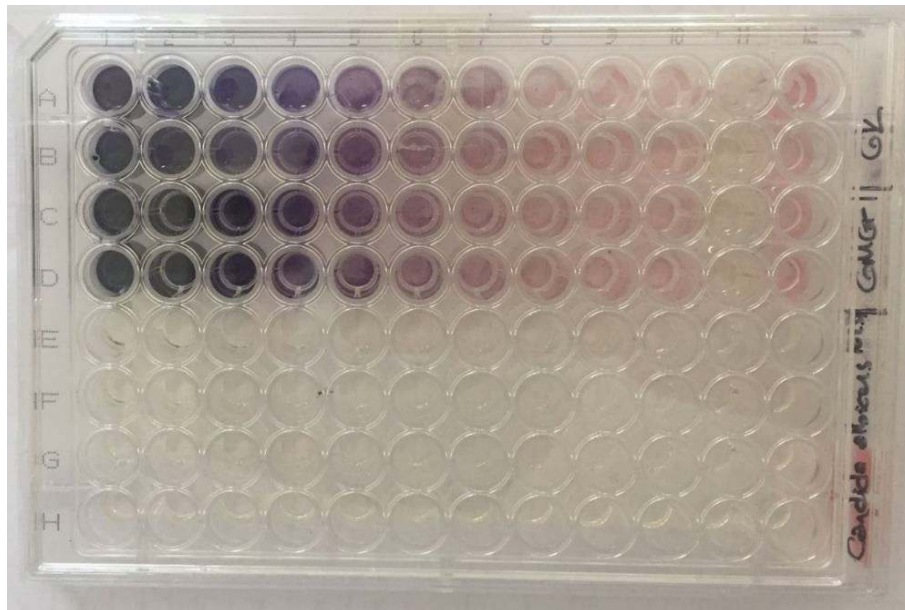


Şekil 21. *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstraktına ait konsantrasyonların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia pseudotuberculosis* için MİK sonuçları. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* subsp.

spizizenii ATCC 6633'te ve *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911'te etkilidir.



Şekil 22. *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstraktına ait farklı konsantrasyonların *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter cloacea* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 için MİK sonuçları. Sadece *Enterococcus faecalis* ATCC 29212' de etkilidir.



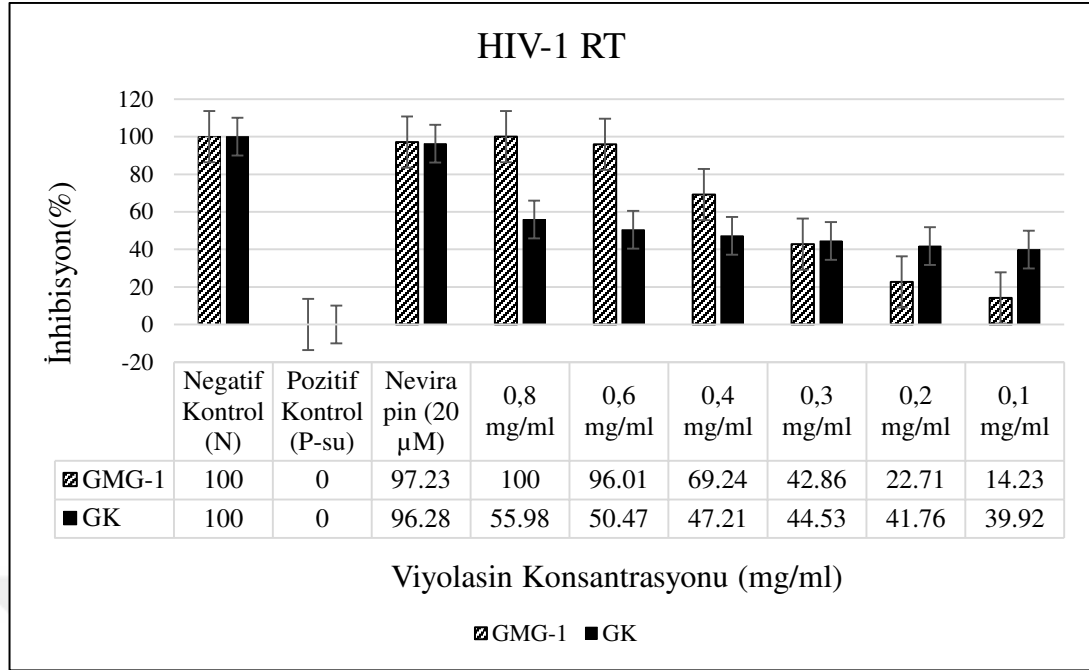
Şekil 23. *Jantynobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstraktlarına ait farklı konsantrasyonların *Candida albicans* ATCC 10231 suşu için MİK sonuçları. Etkinlik yoktur.

3.3. Antiviral Testler

3.3.1. HIV-1 Reverse Transkriptaz İnhibisyonu

Viyolosinin HIV-1 RT üzerindeki inhibisyonun belirlenmesinde GMG-1 ve GK suşlarından elde edilen kaba Viyolasin ekstresi ile *Jantibacterium* sp. GK saf Viyolasin'i ve Deoksiviyolasin'i kullanıldı.

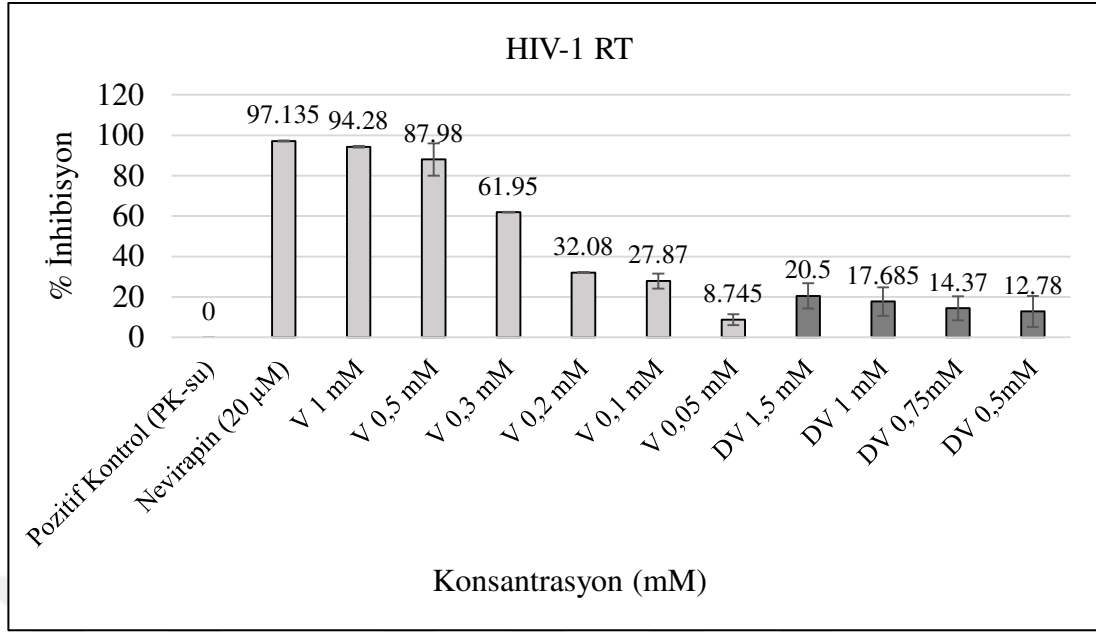
Kaba Viyolasin ekstrastlarına ait elde edilen sonuçlar Şekil 24'da gösterilmektedir. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresine ait kullanılan 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarına ait inhibisyon oranlarının sırasıyla % 100,00 $\pm$ 0,00, % 96,01 $\pm$ 2,93, % 69,24 $\pm$ 8,61, % 42,86 $\pm$ 12,02, % 22,71 $\pm$ 11,38 ve % 14,23 $\pm$ 5,16 olduğu belirlendi (Şekil 24). GK suşuna ait kaba Viyolasin ekstresine ait 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında görülen inhibisyon oranlarının ise sırasıyla % 55,98 $\pm$ 0,00, % 50,47 $\pm$ 15,83, % 47,21 $\pm$ 0,64, % 44,53 $\pm$ 1,43, % 41,76 $\pm$ 20,83 ve % 39,92 $\pm$ 0,00 olduğu belirlendi (Şekil 24). GMG-1 kaba Viyolasin'i ile GK kaba Viyolasin'ine ait belirlenen inhibisyon değerlerinin doza bağlı olarak arttığı belirlendi Bununla birlikte 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml ve 0,4 mg/ml GMG-1 Viyolasin'in konsantrasyonlarına ait HIV-1 RT üzerindeki inhibisyon oranının aynı konsantrasyondaki GK Viyolasin'ine ait inhibisyona göre neredeyse 2 kat fazla olduğu belirlendi. Bu durumun aksine 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml GMG-1 Viyolasin'in konsantrasyonlarından elde edilen inhibisyon oranlarının ise GK Viyolasin'ine ait inhibisyon oranına göre sırasıyla yaklaşık 2 ve 3 kat azaldığı belirlendi. 0,3 mg/ml konsantrasyonda ise her iki suşa ait kaba Viyolasin'in inhibisyon etkinliğinin istatistiki açıdan anlamsız olduğu görüldü.



Şekil 24. Farklı konsantrasyonlardaki *Jantibacterium* sp. GMG-1 ve *Jantibacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstrelerinin HIV-1 RT inhibisyon etkinliklerinin karşılaştırılması. *Jantibacterium* sp. GMG-1 inhibisyon etkinliği 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml ve 0,4 mg/ml konsantrasyonlarına kadar GK ekstre konsantrasyonlarından fazladır. Ancak 0,3 mg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda *Jantibacterium* sp. GMG-1 ekstresinin inhibisyon etkinliği GK ekstresinden düşüktür.

Saf Viyolasin ve Viyolasin türevi olan Deoksiviyolasin'e ait HIV-1 RT inhibisyon oranları Şekil 25'de gösterilmektedir. Saf Viyolasin'e ait 1, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1 ve 0,05 mM konsantrasyonlarında görülen inhibisyon oranlarının sırasıyla % 94,28 ± 0,39, % 87,98 ± 8,00, % 61,95 ± 0,12, % 32,08 ± 0,05, % 27,87 ± 3,72 ve % 8,75 ± 2,72 olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 1,5, 1, 0,75 ve 0,5 mM Deoksiviyolasin konsantrasyonlarında ise sırasıyla % 20,50 ± 6,21, % 17,69 ± 7,05, % 14,37 ± 5,93 ve % 12,78 ± 7,72 olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'e ait inhibisyon oranlarının konsantrasyona bağlı olarak arttığı tespit edildi. Bununla birlikte Deoksiviyolasin'in tüm konsantrasyonlarında görülen inhibisyon oranlarının Viyolasin'e ait en düşük iki konsantrasyona (0,1 ve 0,05 mM) ait inhibisyon oranları arasında olduğu belirlendi.

Saflaştırılmış Viyolasin ve Deoksiviyolasin' in HIV-1 RT için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,326 mM ve 5,169 mM olarak tespit edildi.



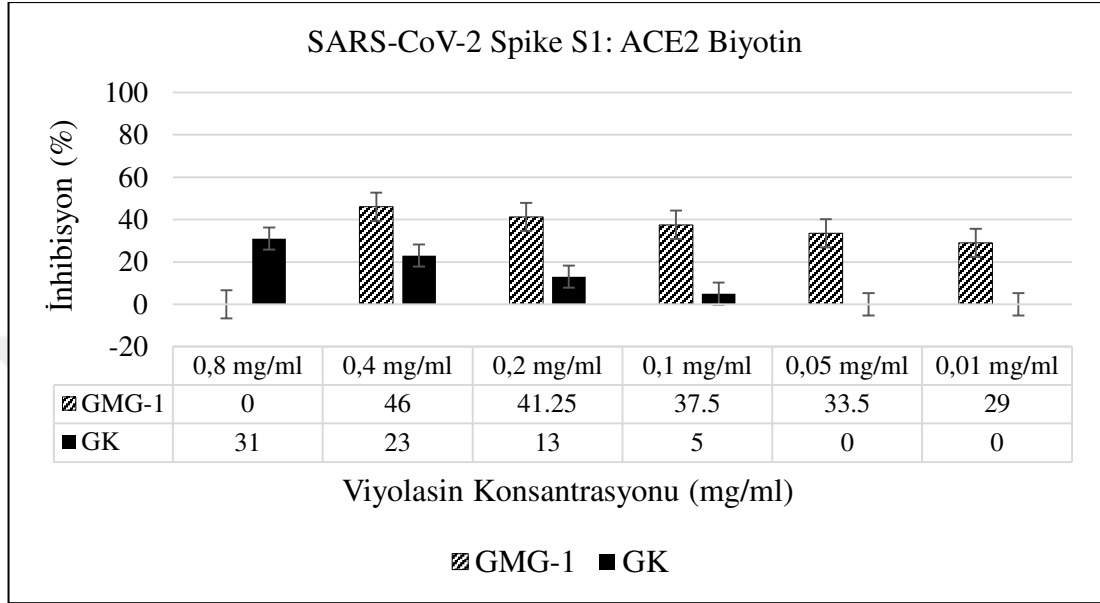
Şekil 25. *Jantınobacterium* sp. GK Saf Viyolasin (V, açık renk) ve Deoksiviyolasin (DV, koyu renk) konsantrasyonlarının HIV-1 RT inhibisyonunu gösteren grafik. Her iki madde için en yüksek konsantrasyonlar en fazla inhibisyon aktivitesi vermiştir. Ancak inhibisyon oranları Viyolasin'in daha etkili olduğunu göstermektedir.

3.3.2. Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 İnhibisyon Testi

Viyolosinin Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 etkileşiminin inhibisyonun belirlenmesinde *Jantınobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantınobacterium* sp. GK suşlarından elde edilen kaba Viyolasin ekstresi ile *Jantınobacterium* sp. GK saf Viyolasin'i ve Deoksiviyolasin'i kullanıldı.

Kaba Viyolasin ekstrastlarına ait elde edilen sonuçlar Şekil 26'da gösterilmektedir. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresine ait 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml ve 0,01 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % $46 \pm 0,00$, % $41,25 \pm 7,80$, % $37,50 \pm 6,36$, % $33,50 \pm 9,19$ ve % $29 \pm 5,66$ olduğu tespit edildi. GK suşu kaba Viyolasin ekstresine ait 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında ise Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 inhibisyonun sırasıyla % $31 \pm 16,00$, % $23 \pm 4,00$, % $13 \pm 0,00$ ve % $5 \pm 0,00$ olduğu tespit edildi. Ancak GMG-1 kaba Viyolasin'ine ait 0,8 mg/ml konsantrasyon ile GK kaba Viyolasin'ine ait 0,05 mg/ml ve 0,01 mg/ml konsantrasyonlarda elde edilen değerlerin negatif olmasından dolayı inhibisyon değeri belirlenemedi. GMG-1 kaba Viyolasin'i ile GK kaba Viyolasin'ine ait belirlenen inhibisyon değerlerinin doza bağlı olarak arttığı belirlendi. Bununla birlikte 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml GMG-1 kaba

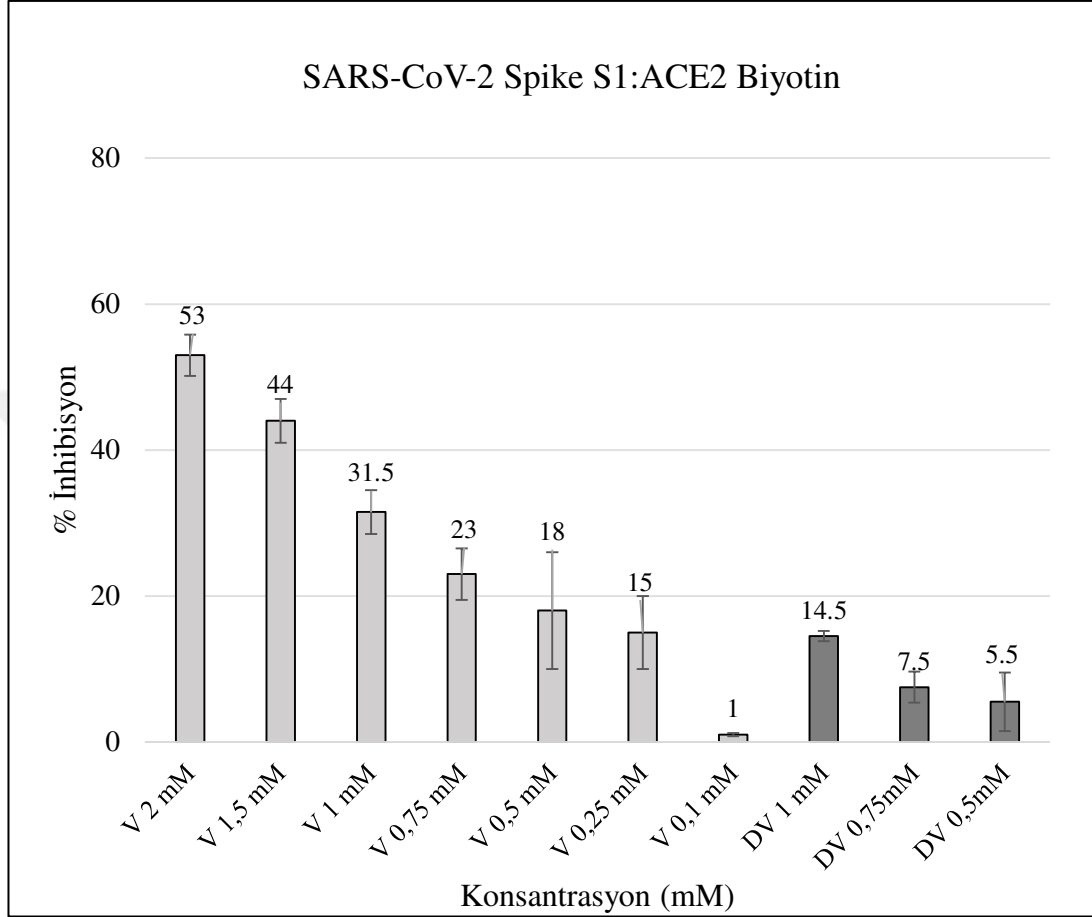
Viyolasin'in konsantrasyonlarına ait Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 inhibisyonun aynı konsantrasyondaki GK Viyolasin'ine ait inhibisyona göre sırasıyla yaklaşık 2, 3 ve 7 kat fazla olduğu belirlendi.



Şekil 26. *Jantibacterium* sp. GMG-1 and *Jantibacterium* sp. GK kaba Viyolasin'lerinin farklı konsantrasyonlarının SARS-CoV-2 inhibisyon etkinliklerinin karşılaştırılması. Her iki ekstrenin inhibisyon etkinlikleri konsantrasyona paralel şekilde artmış veya azalmıştır. GMG-1 ekstresinin 0,8 mg/ml konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda inhibisyon etkinliği, GK ekstresinden fazladır.

Jantibacterium sp. GK Saf Viyolasin'i ve Deoksiviyolasin'ine ait Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 etkileşimi inhibisyon oranları Şekil 27'de gösterilmektedir. Saf Viyolasin'e ait 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 ve 0,1 mM konsantrasyonlarında görülen inhibisyon oranlarının sırasıyla % $53 \pm 2,83$, % $44 \pm 3,00$, % $31,5 \pm 3,00$, % $23 \pm 3,54$, % $18 \pm 8,00$, % $15 \pm 5,00$ ve % $1 \pm 0,20$ olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 1,5, 1, 0,75 ve 0,5 mM Deoksiviyolasin konsantrasyonlarında ise sırasıyla % $14,5 \pm 0,71$, % $7,5 \pm 2,12$ ve % $5,5 \pm 4,00$ olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'e ait inhibisyon oranlarında doza bağlı artış olduğu tespit edildi. Ayrıca Deoksiviyolasin'in tüm dozlarında görülen Spike S1(SARS-CoV-2): ACE2 inhibisyon oranların Viyoloasinin inhibisyon oranları ile kıyaslandığında, Viyolasin'e ait en düşük iki konsantrasyonun (0,25 ve 0,1 mM) inhibisyon oranları arasında olduğu belirlendi.

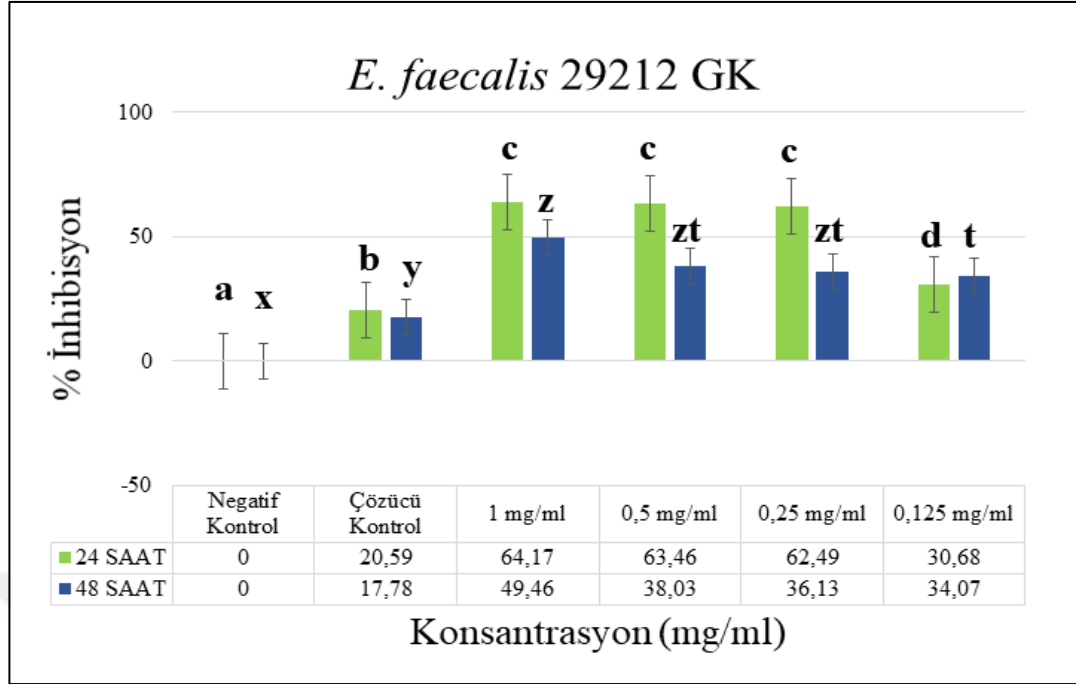
SARS-CoV-2 Spike S1 için Saflaştırılmış Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,81 mM ve 2,537 mM olarak tespit edildi.



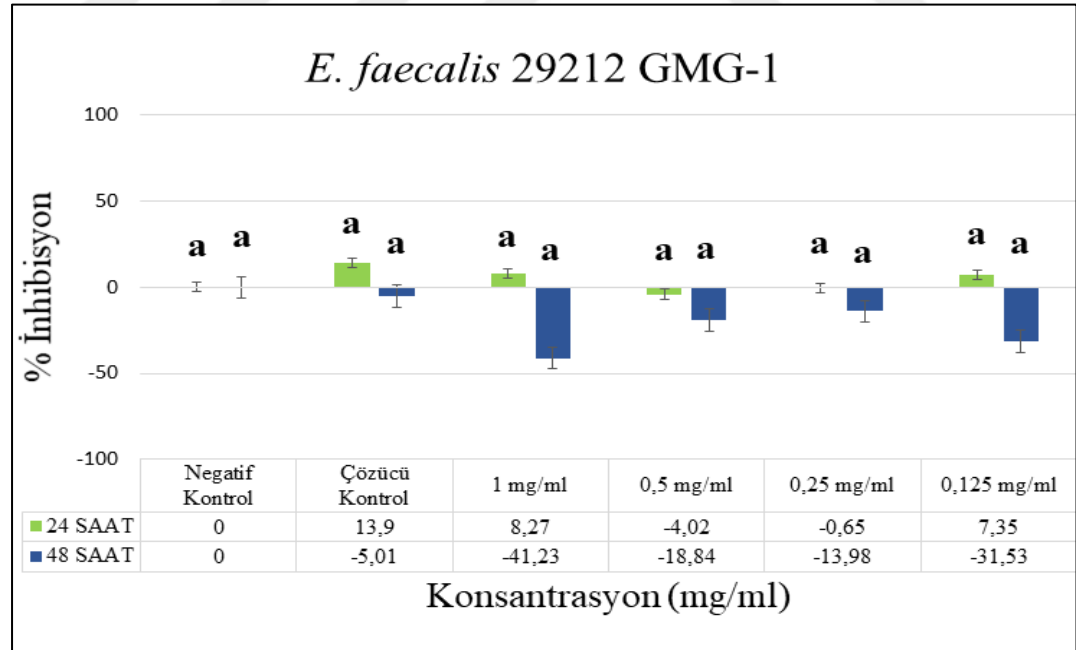
Şekil 27. Saf Viyolasin (V, açık renk) ve Deoksiviyolasin'in (DV, koyu renk) farklı konsantrasyonlarının SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 inhibisyon oranları. Her iki maddenin inhibisyon etkinlikleri konsantrasyonlarına paralel olarak artmış veya azalmıştır. Eş konsantrasyonlar için karşılaştırıldıklarında Viyolasin'in İnhibisyon etkinliği Deoksiviyolasin'den yüksektir.

3.4. Viyolasin'in Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Jantibacterium sp. GK ve *Jantibacterium* sp. GMG-1 suşlarından elde edilen kaba Viyolasin ekstratlarının *Enterococcus faecalis* 29212, *E. faecalis* OG1RF ve *E. faecalis* 74 suşlarının oluşturduğu biyofilm üzerine etkisi sırasıyla Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31, Şekil 32 ve Şekil 33'te gösterilmektedir.



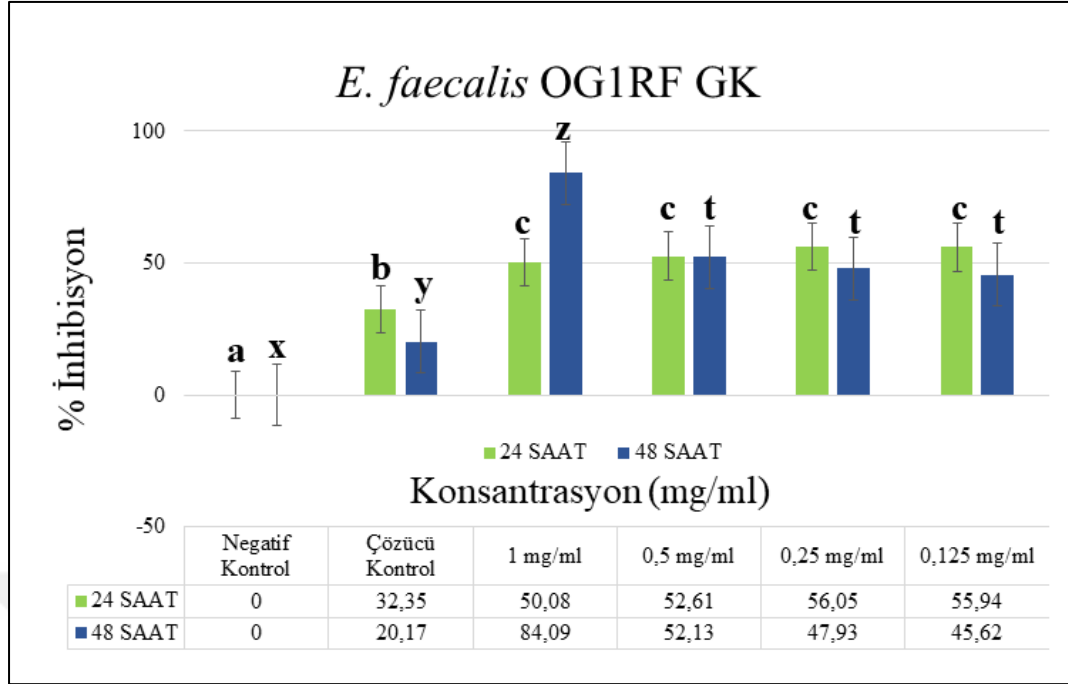
Şekil 28. *Jantınobacterium* sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* 29212'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri.



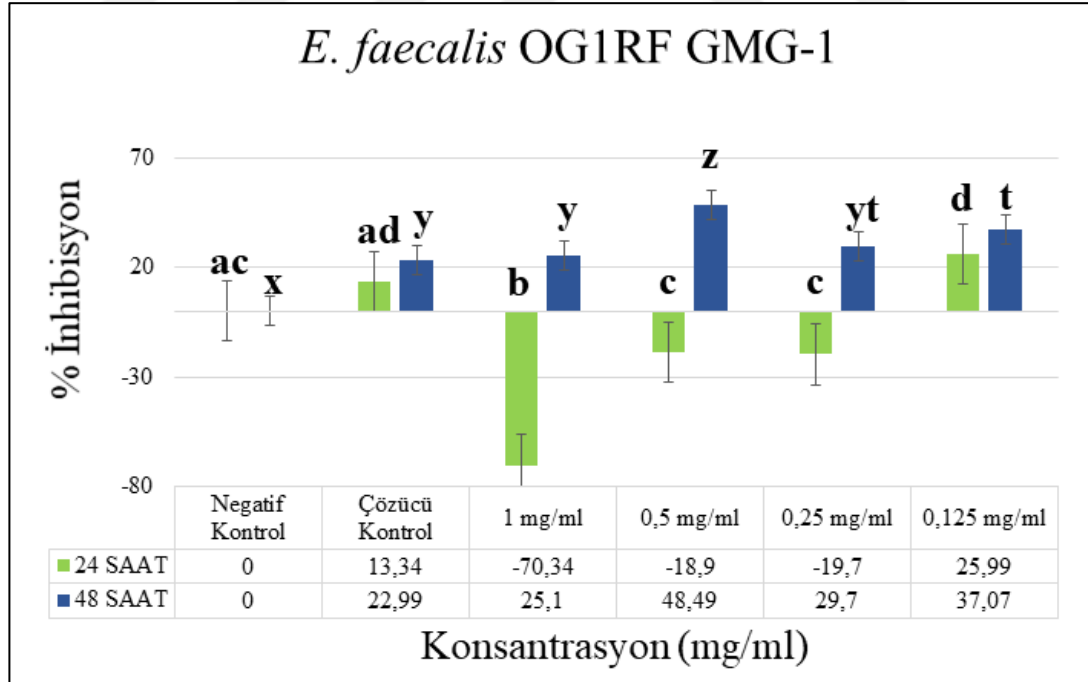
Şekil 29. *Jantınobacterium* sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* 29212'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri.

* Her çubuk yüzdelik ortalama $\pm$ standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar harflerle belirtilmiştir. (24 saat için: a-d, 48 saat için: t-z, $p < 0,05$).

Jantynobacterium sp. GK kaba Viyolasin'in 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında *E. faecalis* 29212 tarafından oluşturulan biyofilm oluşum inhibisyonunun 24 saatte sırasıyla % 64,17 $\pm$ 4,11, % 63,46 $\pm$ 1,92, % 62,49 $\pm$ 2,52 ve % 30,68 $\pm$ 2,16 (F = 92,329; df = 5,42; P = 0,000) olduğu, 48 saatte sırasıyla ise % 49,46 $\pm$ 7,54, % 38,03 $\pm$ 6,18, % 36,13 $\pm$ 3,62 ve % 34,07 $\pm$ 5,70 (F = 10,506; df = 5,42; P = 0,000) olduğu tespit edildi (Şekil 28). *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin'in 0,125 mg/ml hariç tüm konsantrasyonlarında 24 saatte daha fazla inhibisyon olduğu belirlendi (F = 103,701; df = 5; P = 0,000). Ayrıca çözücünün oluşturduğu inhibisyon oranına kıyasla tüm saatlerde ve *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin'ine ait deney gruplarında inhibisyon oranlarında artış olduğu görülmektedir. Bununla birlikte *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin ekstresine ait 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarının aynı bakteri suşunda 24 saatte sırasıyla % 8,27 $\pm$ 8,59, - % 4,02 $\pm$ 12,50, - % 0,65 $\pm$ 5,71 ve % 7,35 $\pm$ 1,75 olduğu tespit edildi (F = 0,983; df = 5,42; P = 0,440). Aynı maddenin 48 saat sonra elde edilen inhibisyon değerleri ise *E. faecalis* 29212 bakterisi için 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla negatif değerde % 41,23 $\pm$ 30,43, % 18,84 $\pm$ 15,70, % 13,98 $\pm$ 11,93 ve % 31,53 $\pm$ 10,15 olarak tespit edildi (F = 0,723; df = 5,42; P = 0,610) (Şekil 29). Çözücünün oluşturduğu inhibisyon oranına kıyasla tüm saatlerde ve *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin'e ait deney gruplarında azalma olduğu görülmektedir. *Jantynobacterium* sp. GMG-1 kaba Viyolasin'in tüm konsantrasyonlarında ise 24 saatte daha fazla inhibisyon olduğu belirlendi (F = 0,854; df = 5; P = 0,520).



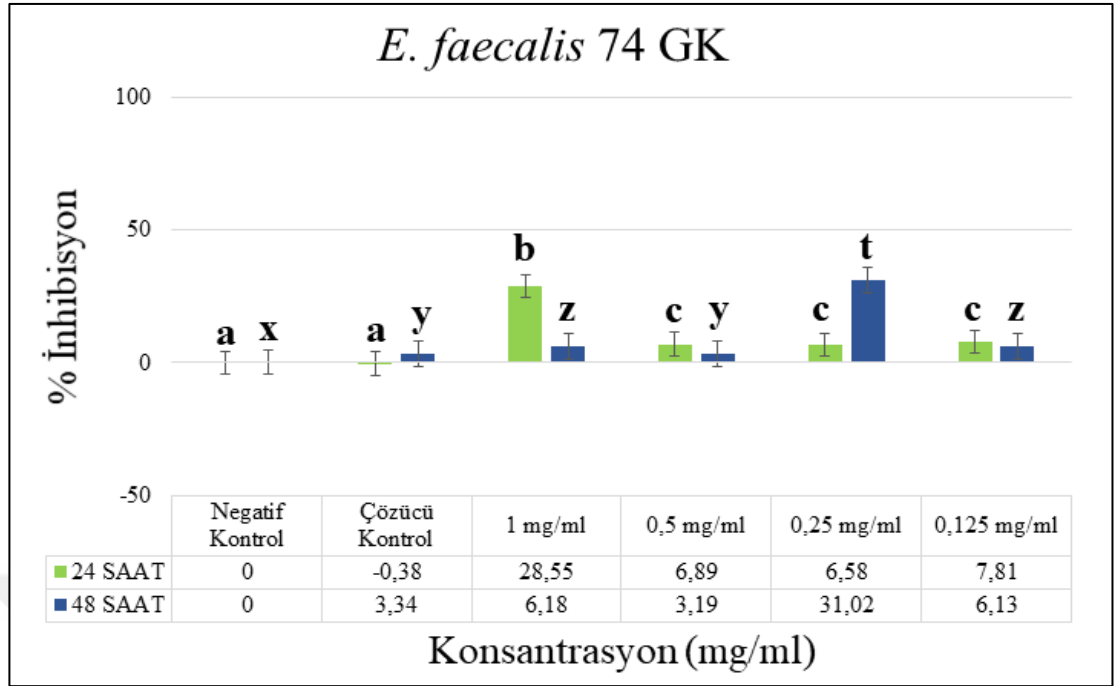
Şekil 30. *Jantınobacterium* sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* OG1RF'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri



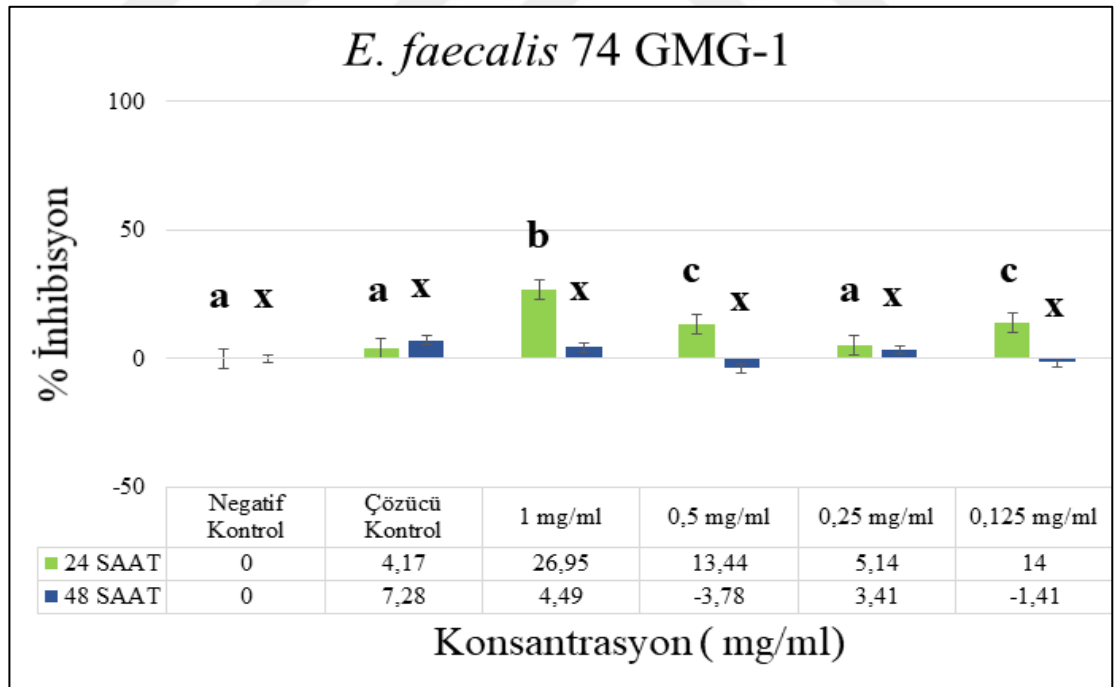
Şekil 31. *Jantınobacterium* sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* OG1RF'nin 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri

* Her çubuk yüzdelik ortalama $\pm$ standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar harflerle belirtilmiştir. (24 saat için: a-d, 48 saat için: t-z, $p < 0,05$).

GK kaba Viyolasin'in 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında *E. faecalis* OG1RF tarafından oluşturulan biyofilm oluşum inhibisyonunun 24 saatte sırasıyla % 50,08 $\pm$ 3,19, % 52,61 $\pm$ 7,65, % 56,05 $\pm$ 7,29 ve % 55,94 $\pm$ 3,14 (F = 16,307; df = 5,42; P = 0,000) olduğu, 48 saatte sırasıyla ise % 84,09 $\pm$ 8,01, % 52,13 $\pm$ 4,28, % 47,93 $\pm$ 8,16 ve % 45,62 $\pm$ 3,45 (F = 25,908; df = 5,42; P = 0,000) olduğu tespit edildi (Şekil 29). Aynı zamanda 24 ve 48 saat sonra çözücü tarafından oluşan inhibisyon değerlerinin deney gruplarına kıyasla daha az olduğu belirlendi. GK kaba Viyolasin'in 1 mg/ml hariç tüm konsantrasyonlarında 24 saatte daha fazla inhibisyon oluşturduğu belirlendi (F = 15,059; df = 5; P = 0,000). Bununla birlikte GMG-1 kaba Viyolasin ekstresine ait 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarının aynı bakteri suşunda 24 saatte sırasıyla - % 70,34 $\pm$ 11,03, - % 18,9 $\pm$ 13,35, - % 19,7 $\pm$ 8,36 ve % 25,99 $\pm$ 2,44 olduğu tespit edildi (F = 15,559; df = 5,42; P = 0,000). Aynı maddenin 48 saat sonra elde edilen inhibisyon değerleri ise *E. faecalis* OG1RF bakterisi için 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % 25,1 $\pm$ 4,85, % 48,49 $\pm$ 4,07, % 29,7 $\pm$ 4,09 ve % 37,07 $\pm$ 5,51 olarak tespit edildi (F = 15,427; df = 5,42; P = 0,000). GMG-1 kaba Viyolasin ekstresine ait veriler çözücü tarafından oluşturulan inhibisyon oranlarına kıyasla 24 saatte 0,125 mg/ml hariç diğer konsantrasyonlarda daha düşük olmasına rağmen, 48 saatte tüm dozlarda yüksektir. Ayrıca GMG-1 kaba Viyolasin'in tüm konsantrasyonlarında 48 saatte daha fazla inhibisyon olduğu belirlendi (F = 16,27; df = 5; P = 0,000).



Şekil 32. *Jantınobacterium* sp. GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* 74'ün 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri.



Şekil 33. *Jantınobacterium* sp. GMG-1 suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresinin *Enterococcus faecalis* 74'ün 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkileri.

* Her çubuk yüzdelik ortalama $\pm$ standart hatayı temsil eder. Önemli farklılıklar harflerle belirtilmiştir. (24 saat için: a-d, 48 saat için: t-z, $p < 0,05$).

GK kaba Viyolasin'in 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında *E. faecalis* 74 tarafından oluşturulan biyofilm oluşum inhibisyonunun 24 saatte sırasıyla % 28,55 $\pm$ 3,14, % 6,89 $\pm$ 1,70, % 6,58 $\pm$ 1,38 ve % 7,81 $\pm$ 1,45 ($F = 35,249$; $df = 5,42$; $P = 0,000$) olduğu, 48 saatte sırasıyla ise % 6,18 $\pm$ 1,39, % 3,19 $\pm$ 0,37, % 31,02 $\pm$ 0,33 ve % 6,13 $\pm$ 0,18 ($F = 353,276$; $df = 5,42$; $P = 0,000$) olduğu tespit edildi (Şekil 32). 24 ve 48 saat sonra çözücü tarafından oluşan inhibisyon değerlerinin deney gruplarıyla kıyasla artış olduğu belirlenirken, GK kaba Viyolasin'in 1 mg/ml hariç tüm konsantrasyonlarında 24 saatte daha fazla inhibisyon olduğu belirlendi ($F = 45,565$; $df = 5$; $P = 0,000$). Bununla birlikte GMG-1 kaba Viyolasin ekstresine ait 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarının aynı bakteri suşunda 24 saatte sırasıyla % 26,95 $\pm$ 3,07, % 13,44 $\pm$ 5,36, % 5,14 $\pm$ 0,97 ve % 14 $\pm$ 2,76 olduğu tespit edildi ($F = 11,492$; $df = 5,42$; $P = 0,000$). Aynı maddenin 48 saat sonra elde edilen inhibisyon değerleri ise *E. faecalis* 74 bakterisi için 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % 4,49 $\pm$ 10,18, - % 3,78 $\pm$ 4,51, % 3,41 $\pm$ 3,21 ve - % 1,41 $\pm$ 4,06 olarak tespit edildi ($F = 0,646$; $df = 5,42$; $P = 0,666$) (Şekil 33). GMG-1 kaba Viyolasin ekstresine ait veriler çözücü tarafından oluşturulan inhibisyon oranlarına kıyasla 24 saatte tüm konsantrasyonlarda yüksek olmasına rağmen, 48 saatte tüm dozlarda daha az inhibisyon olduğu tespit edildi. GMG-1 kaba Viyolasin'in tüm konsantrasyonlarında 48 saatte daha fazla inhibisyon olduğu belirlendi ($F = 9,672$; $df = 5$; $P = 0,000$).

4. TARTIŞMA

Hayatı tehdit eden bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların artan sıklığı ve bu insan patojenlerinin mevcut tedavi stratejilerine direnç geliştirme yetenekleri nedeniyle, yeni bileşiklerin bulunmasına ve geliştirilmesine büyük ihtiyaç vardır. Söz konusu bileşiklerin düşük toksisiteye, spesifik aktiviteye ve yüksek biyoyararlanıma sahip olması temel seçim kriteridir. Bu görev için en uygun bileşikler genellikle doğal kaynaklardan (hayvan, bitki ve hatta mikrobiyal) elde edilir (Stan vd., 2021). Doğal ürünler önemli bir yeni ilaç kaynaklarıdır ve antikanser tedavilerinden antibiyotiklere kadar yeni sentetik ilaçların geliştirilmesi için kaynak görevi görür. (Stan vd., 2021). Bu ürünler bitki özleri, uçucu yağlar, hayvan kaynaklı küçük antimikrobiyal peptitler, bakteriyosinler ve antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye sahip çeşitli bitkisel bileşiklerdir (Stan vd., 2021). Önemli sayıda doğal kaynaklı ilaçlar, mikroplar tarafından veya onların konaklarıyla etkileşimleri sonucu üretilir (Newman ve Cragg, 2020). Antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal ürünlere yönelmenin ana nedenlerinden biri, sürekli artış gösteren antibiyotik direnci ve doğal veya bitki kaynaklı maddeler tarafından oluşturulmayan hastalıkların (esas olarak solunum ve nörolojik) varlığıdır. Sayısız faydaları nedeniyle, doğal bileşikler artık mikrobiyal hastalıklar, inflamatuvar süreçler ve kanser gibi bazı hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bu, temel olarak doğal ilaçların erişilebilirliği ve iyi terapötik potansiyelinden kaynaklanmaktadır (Boccolini ve Boccolini, 2020) (Stan vd., 2021). Doğal kaynaklardan elde edilen ikincil metabolitler, canlı sistemler içinde bulunabildiğinden, genellikle 'tamamen sentetik moleküllerden daha fazla ilaca benzer ve biyolojik faydalı olarak algılanırlar ve bu da onları daha fazla ilaç geliştirme için iyi adaylar haline getirir. (Chin vd., 2006; Lahlou, 2013).

Viyolasin, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Collimonas* ve *Pseudoalteromonas* dahil olmak üzere çeşitli çevrelerde yaşayan farklı cinslere ait bakteri suşları tarafından üretilen (Baricz vd., 2018) ve gösterdiği çok çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeni ile tıp, kozmetik ve tekstil gibi endüstriyel pazarlarda artan öneme sahip bir maddedir. (Duran vd., 2012). Bunlar arasında; antibakteriyel (O'sullivan vd., 1990; , Duran vd., 2012, Asencio vd., 2014), antiviral (May vd., 1991 ve Andrighetti-Frohner, 2003), antimikobakteriyal (Duran vd., 2007), antifungal, antioksidant (Konzen vd., 2006) aktiviteleri yer almaktadır (Duran vd.,

2012). Viyolasin'in mikrobiyal üretimi, mikroorganizma türünden başlayarak mikroorganizmanın ürediği çevre koşullarına kadar birçok faktöre bağlıdır (Kanelli vd., 2018). Bu nedenle çalışmamızda aynı koşullarda üremesi sağlanmış iki farklı Viyolasin üreticisi bakterinin antimikrobiyal, antiviral ve biyofilm oluşumu inhibisyon etkileri her iki Viyolasin ekstresi için ayrı ayrı incelenmiştir.

Viyolasin'in bakteri üremesi üzerine inhibisyon etkisi Gram pozitif bakterilerde (*Clostridium welchii* hariç) Gram negatif bakterilerden fazla olmakla birlikte Gram negatif bakteriler üzerine hafif inhibisyon etkisinin olduğu önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Duran vd., 2012). Sığır matistisine neden olan *S. aureus* ve *E. coli* ile yapılan çalışmada Viyolasin'in tekil ve sinerjistik olarak bakteriyel üremeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Cazato vd., 2011). Ayrıca farklı çalışmalarda Viyolasin'in antimikrobiyaller, antibakteriyeller, gümüş nanopartikülü ve fonksiyonel ipek kompozitler ile sinerjistik etkisinin antimikrobiyal etkinliği arttırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Batista vd., 2017; Dodou vd., 2017; Gao vd., 2019; Dodou 2020). Kanelli vd. (2018) *J. lividium* bakterisinin hücre içermeyen Viyolasin kültür ekstraktı ile yaptıkları çalışmada *S. aureus* ve *C. albicans*'ın biyofilm oluşumu ve parçalanmasına etkisi ile antimikrobiyal etkisi test edilmiştir. Antimikrobiyal etkinliğini iki Gram negatif (*P. aeruginosa* ve *E. coli*), dört Gram pozitif (*S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *Micrococcus luteus*, ve *B. subtilis*) ve üç fungus (*C. albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*) üzerinde araştırmış ve 2 mg/L'lik konsantrasyonda, üremeyi % 15-60 arasında inhibe ettiğini belirtmişlerdir. En az etkilenenin *P. aeruginosa* ve en fazla etkilenen *S. aureus*'tur (0,5 mg/ml'lik konsantrasyonda dahi % 30 inhibisyon). GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstreleri ile yapmış olduğumuz antimikrobiyal duyarlılık testi, Gram pozitif bakterilerde, Gram negatiflerden daha etkili bir inhibisyon olduğunu desteklemektedir. Ayrıca GK ekstresi Gram negatif bir bakteri olan *Y. pseudotuberculosis* üzerinde inhibisyon etkisi sağlamış, buna ek olarak GMG-1 ekstresi ile birlikte diğer Gram negatif bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi göstermeyerek, Gram negatifler üzerine yapılan önceki çalışmaları desteklemiştir. *E. faecalis* 29212 GMG-1 ve GK MİK değerleri (sırasıyla 156 µg/ml ve 312 µg/ml) vankomisin (4 µg/ml) ile kıyaslandığında yüksektir (CLSI, 2012 ve CLSI,2018). *B.subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633' ün GMG-1 ve GK MİK değerleri (sırasıyla 19,5 µg/ml ve 39 µg/ml) vankomisin (4 µg/ml) ve klindomisine duyarlı ve dirençli (sırasıyla 0,5 µg/ml ve 4 µg/ml) *Bacillus* sp.' ye göre daha yüksektir (CLSI, 2006). *S. aureus* ATCC 25923' ün GMG-1 ve GK MİK değerleri (39 µg/ml ve 9,75 µg/ml), *S.aureus* ATCC

29213' ün vankomisin duyarlılara göre (4 µg/ml) yüksekken, dirençlilere (≥ 16 µg/ml) göre GK MİK değeri düşüktür (CLSI, 2012 ve CLSI, 2018).

Viyolasin'in farklı virüsler üzerinde farklı derecelerde antiviral etkinlik gösterdiği önceki çalışmalarla bildirilmiştir (May vd., 1991; Andrighetti-Frohner vd., 2003). May vd. (1991), HSV (Herpes Simpleks Virüs) ve Poliovirüs ile enfekte HeLa hücre kültürlerinde % 10, Deoksiviyolasin içeren Viyolasin'in 0,25 µg/ml'lik konsantrasyonunun HSV üzerinde % 62 ve 0,063 µg/ml'lik konsantrasyonun poliovirüs üzerinde % 56 inhibisyon etkisi olduğunu bildirmişlerdir (May vd., 1991). Andrighetti-Frohner vd. (2003), Viyolasin'in antiviral ve sitotoksik aktivitesini incelemek için üç deneysel yaklaşım kullanmış ve daha önce May vd. (1991) tarafından bildirilen sonuçlara karşıt sonuçlar bildirmişlerdir. Önceki araştırma grubu tarafından FRhK-4, Vero, MA104 ve Hep-2 hücreleri için doğrudan sitotoksikite gösteren Viyolasin'in IC₅₀ değeri 1-1,2 µg/ml (2,2 – 2,7 µM) olarak belirlenmiştir. Hücre çoğalmasını engellemeyen konsantrasyonlar kullanıldığında Viyolasin, asiklovire dirençli HSV suşu, hepatit A virüsü (HN175 ve HAF-203 suşları) ve adenovirüs tip 5'e karşı sitopatik veya antiviral aktivite göstermezken, KOS ve ATCC/VR-733 HSV suşları, poliovirüs tip 2 ve simian rotavirüs SA11 suşunun viral replikasyonunda zayıf inhibisyon göstermiştir (Andrighetti-Frohner vd., 2003). Buna karşılık, May vd. (1991) Viyolasin'in saflaştırılması için kullanılan yöntemlere ve elde edilen Viyolasin derecelerindeki farklılıkları atfederek bileşik için üstün antiviral aktivite önermiştir (Andrighetti-Frohner vd., 2003, Duran vd., 2012). Literatür taramasında Viyolasin'in HIV, HIV-RT, COVID 19 ve SARS-CoV-2 üzerine antiviral etkinliğini test eden herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışma Viyolasin'in HIV-RT inhibisyon etkisi ve SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin etkileşimine inhibisyon etkisini bildiren ilk çalışmadır. Bu çalışmada GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstraktları ile saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in antiviral etkinliği HIV-1 RT inhibitör tarama test kiti ve SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin test kiti ile *in vitro* olarak araştırılmıştır. HIV-1 RT için GMG-1 ve GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstraktlarının inhibisyon etkinlikleri sırasıyla konsantrasyona bağlı olarak artış göstermektedir. SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin etkileşimi için ise GMG-1 ve GK suşundan elde edilen kaba Viyolasin ekstresine ait inhibisyon etkinliği konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Her iki çalışmada da kaba Viyolasin ekstraktlarının inhibisyon oranlarının konsantrasyonlara bağlı olarak artmasının yanı sıra GMG-1 ekstresinin inhibisyon etkinliği GK ekstresinden fazladır. Ek olarak kaba ekstraktların inhibisyon etkinliği HIV-1 RT için

SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2'den daha fazladır. GMG-1 ve GK kaba özütlerin inhibisyon aktivitelerindeki farklılıkların temelini Viyolasin'in elde edildiği suşla ilişkili olarak içerdiği Viyolasin miktarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in HIV-1 RT inhibisyon etkisi incelendiğinde ve Viyolasin'in en yüksek konsantrasyonu (1 mM) yüksek inhibisyon (%94,28) aktivitesi göstermiştir. Saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'e ait Spike S1 (SARS-CoV-2) Spike S1: ACE2 etkileşim inhibisyon oranları saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir. HIV-1 RT için saf Viyolasin'in en yüksek konsantrasyonu (1 mM) ile GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinin en yüksek konsantrasyonu (0,8 mg/ml) karşılaştırıldığında, GMG-1 kaba ekstresinin inhibisyon yüzdesi (%100), saf Viyolasin'den (%94,28) istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Bu durum GMG-1 kaba Viyolasin ekstresi içerisindeki Viyolasin miktarı ile ilişkili olabileceği gibi, kaba ekstre içerisindeki farklı bileşiklerin de inhibisyona katkısının olabileceğini düşündürmektedir. Son olarak SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin etkileşimi üzerine inhibisyon etkisinin HIV-1 RT'a oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. HIV-1 RT'nın inhibisyon etkinliği bakımından Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in IC₅₀ değerleri karşılaştırılmış ve Viyolasin'in IC₅₀ değerinin Deoksiviyolasin'den yaklaşık 15 kat daha fazla etkin olduğu belirlenmiştir. Aynı karşılaştırma SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 için yapıldığında Viyolasin'in IC₅₀ değerinin Deoksiviyolasin'den yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Viyolasin'in IC₅₀ değerinin, HIV-1 RT' de SARS-CoV-2Spike S1: ACE2 Biyotin etkileşiminden yaklaşık 6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Etkinliklerdeki bu farklılıkların her iki test grubundaki proteinlerin yapısındaki farklılıklardan veya bu maddelerin her iki gruptaki protein yapılarında neden olduğu konformasyonel değişikliklerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu durumu anlayabilmek için *in silico* çalışmalar ile Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in HIV-1 RT ve SARS-CoV-2: ACE2 Biyotin ile etkileşiminin çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, GMG-1 kaba Viyolasinine ait 0,8 mg/ml konsantrasyon ile GK kaba Viyolasin'ine ait 0,05 mg/ml ve 0,01 mg/ml konsantrasyonlarda elde edilen spektrofotometrik değerlerin negatif olmasından dolayı, bu konsantrasyonlar için bir inhibisyon değeri belirlenememiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, Viyolasinin antiviral etkinliğinin mevcudiyeti ve yüksek inhibisyon etkinliği bilgisini desteklemektedir. Bu sonuçlar, HIV ve SARS-CoV-2 ilişkili enfeksiyonlar için Viyolasin'in etkili bir potansiyel doğal ürün olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması Viyolasin'in HIV-1 RT inhibisyon etkisi ve SARS-CoV-2 Spike S1:ACE2 Biyotin bağlanmasına

inhibisyon etkisini bildiren ilk çalışmadır. Ayrıca çalışmamız HIV-1 RT ve SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 Biyotin kompleksi için Viyolasin ve Deoksiviyolasin'in IC₅₀ değerlerinin belirlendiği ilk çalışmadır.

Chromobacterium violaceum'dan elde edilen Viyolasin'in, biyofilm oluşturma özelliği bulunan planktonik formdaki bakterileri inhibe etme ve öldürmede güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Viyolasin'in düşük konsantrasyonları biyofilm oluşumunu inhibe etmede yeterli olurken, olgun biyofilmin yok edilmesi için yüksek konsantrasyonların gerektiği belirtilmiştir (Batista vd., 2017; Dodou vd., 2017; Dodou vd., 2020). Yapılan literatür taramasında *E. faecalis* biyofilmine Viyolasin'in etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumları ve olgun biyofilmlerinin yok edilmesi üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. Batista vd. (2017) *S. aureus* için Viyolasin'in minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) 5 µg/ml ve MİK değerini 1,25 µg/ml olarak belirlemenin yanı sıra, bu konsantrasyonlardan 1,25 µg/ml'nin biyofilm oluşumunu inhibe etmede yeterli olduğunu ancak biyofilm eradikasyonu için 40 µg/ml'lik doz uygulaması gerektiğini belirtmiştir. Dodou vd. (2017) *S. epidermidis*'in biyofilm üreticisi olan ve olmayan suşlarında etkili Viyolasin konsantrasyonlarının MİK değerlerini sırasıyla 20 ve 10 µg/ml, MBK değerini ise 20 µg/ml olduğunu tespit etmiştir. Buna ek olarak MBK'a kısa süreli maruziyetin (3 ve 2,5 saatlik) *S. epidermidis*'in ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Dodou vd. (2020) *S. epidermidis* ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise *S. epidermidis* biyofilm inhibisyonu için 20 µg/ml'nin ve olgun biyofilm eradikasyonu için MBEK değerini 160 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Ayrıca farklı klinik antimikrobiyaller ile Viyolasin'in birlikteliği test edildiğinde, Viyolasin-siklodekstrin birlikteliğinin özel bir sinerjistik aktiviteye neden olduğu ve Viyolasin'in antimikrobiyallerin etkinliklerini modüle ettiği görülmüştür. Viyolasin'in MBEK ve MBEK' in iki katı konsantrasyonlarda olgun *S. epidermidis* biyofilmini sırasıyla 2 ve 3 saatte tamamen yok ettiği görülmüştür. Kanelli vd. (2018), *J. lividium* bakterisinin hücre içermeyen Viyolasin kültür ekstraktı ile yaptıkları çalışmada, *S. aureus* ve *C. albicans*'ın biyofilm oluşumu ve parçalanmasına etkisi ile antimikrobiyal etkinliğini test etmişlerdir. *J. lividium*'un kaba metanolik ekstresinin 1 ve 2 mg/L'lik konsantrasyonunun *S. aureus*'un 24 saatlik biyofilm oluşumuna ve parçalanmasına orta derecede etkili olduğu gözlenirken, *C. albicans*'ın 48 saatlik biyofilm oluşumu inhibisyonu ve 24 saatlik biyofilm parçalanması deneylerinde böyle bir etki tespit

edilmemiştir. Yapılan tüm çalışmalarda biyofilm inhibisyon oranı konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, *Jantnobacterium* sp. suşlarına ait iki kaba Viyolasin ekstresinin *E. faecalis* 29212 (kontrol suşu), *E. faecalis* OG1RF (kontrol suşu) ve *E. faecalis* 74'ün (gıda kökenli biyofilm üreticisi) 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşumlarına 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 mg/ml'lik konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Çalışma konsantrasyonlarına dair literatürde herhangi bir bilgi bulunmadığından *E. faecalis* 29212 ile yapmış olduğumuz antimikrobiyal duyarlılık testindeki MİK değeri (0,156 mg/ml = 156 µg/ml) referans olarak alınmıştır. Batista vd. (2017), *S. aureus* için yaptıkları biyofilm oluşumu inhibisyonu çalışmasında MİK değerinin biyofilm oluşumunu inhibe etmede yeterli konsantrasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında en yüksek konsantrasyon (1 mg/ml) MİK değerinden yaklaşık 6,5 kat fazladır. Literatürde biyofilm içerisindeki bakterilere uygulanan antimikrobiyallerin etkisi için MİK değerinden 10-1000 kat fazlasının uygulanması ihtiyacı olduğuna dair bilgi mevcuttur (Balcazar vd., 2015). Viyolasin'in suda çözünürlüğünün olmamasından ötürü % 10 DMSO ile çözülerek ulaşabilen en üst konsantrasyonu 20 mg/ml'dir. Daha yüksek konsantrasyonlarda her iki kaba Viyolasin ekstresinde çökelmelerin meydana geldiği görülmüştür. Tamamen DMSO ile çözülmesi halinde ise bakteri üremesi üzerine çözücünün baskısı olacağı düşüldüğünden, DMSO oranı olabildiğince düşük (kuyulardaki son konsantrasyon % 0,5) tutularak ve çözücü kontrol grubu ile birlikte çalışma gerçekleştirilmiştir.

E. faecalis 29212'nin biyofilm oluşumu üzerine GK kaba Viyolasin ekstresinin inhibisyon etkisi 24 ve 48 saatlik maruziyetlerin her ikisinde de konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir. 24 ve 48 saatlik uygulamalar karşılaştırıldığında 0,125 mg/ml (125 µg/ml) hariç tüm konsantrasyonlarda 24 saatlik uygulamanın daha etkin olduğu görülmüştür. Aynı bakterinin GMG-1 kaba Viyolasin ekstresi ile yapılan çalışmada da 24 saatlik uygulamanın etkinliği 48 saatlik maruziyete göre daha yüksek görünmekle birlikte bu ekstre ile çalışmada her iki saat uygulamasında da negatif değerlikli veriler elde edilmiştir. Literatürde Viyolasin'in en iyi absorpsiyonunun 585 nm'de (Blosser ve Gray, 2000) ölçüldüğü bilgisi yer almaktadır ve biyofilm tabakasını boyamada kullandığımız kristal viyolenin absorbansı 595 nm'de ölçülmüştür. Kristal viyole, yüzeyi negatif yüklü molekülleri (yani peptidoglikan) ve hücre dışı polisakkarit matriksini işaretleyen temel bir protein boyasıdır (Pittsa vd., 2003). Biyofilm oluşumunu değerlendirmek için en yaygın yöntemlerden biri, genellikle önceden boyanmış biyofilmden çıkarılan boya miktarının kolorimetrik olarak

saptanmasını içeren 96 kuyulu bir mikrotitre plaka tahliline dayanır (Arnold, 2008). Bu bilgiler dikkate alındığında negatif yüzde inhibisyon değerleri, biyofilm inhibisyonunun olmadığı ve/veya biyofilm oluşumunun teşvik edildiği anlamına gelebileceği gibi, GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinin oluşan biyofilm tabakası içerisine daha iyi penetre olduğu ve/veya gram pozitif bir bakteri olan *E. faecalis*'in hücre membranına Viyolasin'in ulaşabildiği manasına da gelebilir. Biyofilm oluşum miktarının ölçümü, biyofilm tabakasına ve içerisindeki bakterilerin hücre duvarına hapsolan kristal viyolenin salınımı esasına dayanır. Dolayısı ile oluşan biyofilm miktarı ne kadar fazla ise tutulan boya miktarının o kadar fazla olacağı düşünülmektedir. Negatif yüzdelik değerler gördüğümüz test gruplarında boya miktarı kontrol grubundan daha fazla demektir. Bu durumun sebebi sadece kristal viyolenin varlığından ötürü olmayabilir; GMG-1 kaba Viyolasin'i biyofilm tabakasına penetre olmuş olabilir. Kristal viyole ve Viyolasin'in absorpsiyon değerleri birbirine çok yakın olduğundan, spektrofotometrik ölçüm alırken kristal viyole ile birlikte ortama salınan Viyolasin'de ölçüme dâhil olabilir ve ortamdaki biyofilm oluşum miktarına bağlı olarak değerlerin beklenenden daha yüksek çıkmasına neden olabilir. GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinin test edildiği bir diğer bakteri olan *E. faecalis* OG1RF' nin 24 saatlik uygulamasında da en düşük konsantrasyon hariç negatif değerlikli veriler elde edilmiştir. *E. faecalis* 74 için sadece 48 saatlik uygulamanın en düşük konsantrasyonunda negatif yüzde görülmüştür. Farklı bakteri gruplarında aynı özüt için tekrarlı olarak negatif yüzde değerlerinin görülmesi nedeni ile yukarıda tartışılan olasılığı test etmek için ayrıca bir deney düzeneği tasarlanması gerektiğini düşündürmektedir.

E. faecalis 29212'nin biyofilm oluşum inhibisyonu için GK kaba Viyolasin ekstresinin GMG-1 kaba ekstresine göre, 24 ve 48 saatlik maruziyetler için çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* OG1RF'nin GK kaba Viyolasin ekstresinin inhibisyon etkisi 24 saatlik maruziyeti konsantrasyona bağlı azalma gösterirken, 48 saatlik uygulamasında konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Ek olarak, bu bakteri suşu için GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinin 48 saatlik biyofilm oluşum inhibisyon etkinliği, 24 saatlik etkinlikten daha fazla görünmektedir. *E. faecalis* 74' ün biyofilm oluşum inhibisyonu 24 ve 48 saatlik uygulamalar için, GK kaba Viyolasin ekstresinde GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinden tüm konsantrasyonlarda daha fazladır ancak 48 saatlik uygulamalarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bakteriyel biyofilmler olgunlaştıkça antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri direnç artmaktadır. Bu durum, 24 saatlik uygulamada Viyolasin daha fazla inhibisyon etkinliği göstermesinin nedeni olabilir. Zheng vd. (2018) *E. faecalis* 29212 ve *E.*

faecalis OG1RF ile yaptıkları çalışmada biyofilm oluşum zamanını 24 saat olarak kullanmışlardır. Tüm suşlar için GK ekstresinin etkinliği, GMG-1 ekstresiden fazladır. Bu durum iki ekstrenin içeriklerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Antiviral testlerde GMG-1 ekstresi daha etkin iken, biyofilm oluşum inhibisyonunda GK ekstresinin daha iyi inhibisyon etkinlik göstermesinin sebebi, kaba ekstre içerisindeki farklı bileşiklerin mevcudiyeti olabilir ve/veya antiviral grupta madde doğrudan proteine uygulanırken biyofilm çalışmasında canlı bir hücreye uygulanmaktadır. Canlı hücrelerin, proteinlerden farklı olarak kendisini streten korumaya yönelik çeşitli fiziksel, biyokimyasal ve/veya enzimatik yollara sahip olmasından kaynaklanabilir. Bu alışma önceki çalışmalarda belirtilen biyofilm oluşum inhibisyon etkinliğinin, Viyolasin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı bilgisini desteklemektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Viyolasin üreticisi iki yeni bakteri olan *Jantynobacterium* sp. GMG-1 ve *Jantynobacterium* sp. GK'dan elde edilmiş iki kaba ekstre ile 9 farklı mikroorganizma için antimikrobiyal duyarlılık testi (MİK), *E. faecalis* 74, *E. faecalis* 29212 ve *E. faecalis* OG1RF bakterilerinin biyofilm oluşumuna inhibisyon etkisi, HIV-1 RT enzim inhibisyonu etkisi ve SARS-CoV2 Spike S: ACE2 Biyotin bağlanmasına inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ayrıca *Jantynobacterium* sp. GK kaba Viyolasin ekstresinden Soxhlet ekstrasyonu ve VLCC ile saflaştırma yapıp saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin elde edilerek, bu maddelerin de antiviral özelliği HIV-1 RT kolorimetrik test kiti ve SARS-CoV2 Spike S1: ACE2 Biyotin inhibitör tarama test kiti kullanılarak araştırılmış ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Bu çalışma ile birlikte ulaşılan sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. GMG-1 Viyolasin ekstrelerinin *B. subtilis*, *E. faecalis* 29212 ve *S. aureus* 25923 bakterileri üzerinde, GK kaba Viyolasin ekstrelerinin ise *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *E. faecalis* 29212, *S. aureus* 25923 ve *Y. pseudotuberculosis* 911 bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermektedir.
2. GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstraktlarının *E. faecalis* 29212, *E. faecalis* OG1RF ve *E. faecalis* 74 suşlarına ait biyofilm oluşumuna farklı seviyelerde inhibisyon etkisi vardır ve 24 saatlik maruziyette daha yüksek inhibisyon sağlamıştır.
3. GMG-1 ve GK suşlarından elde edilen Viyolasin'in HIV'in kendini çoğaltmak amacıyla kullandığı RT enzimi üzerinde yüksek inhibisyon etkisi mevcuttur.
4. GMG-1 ve GK suşlarından elde edilen Viyolasin'in COVID 19 salgın hastalığı etkeni olan ve enfeksiyon sürecinde önemli bir süreç olan Spike S1 ve ACE2 bağlanmasına orta dereceli veya hafif inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *Jantynobacterium* sp. GK ve *Jantynobacterium* sp. GMG-1 suşlarından elde edilen Viyolasin'in biyolojik etkinlikleri araştırılmıştır.

Jantynobacterium sp. GK ve *Jantynobacterium* sp. GMG-1 suşlarından elde edilen kaba ve saf Viyolasin'in antimikrobiyal, antiviral ve biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

1. GMG-1 ve GK kaba Viyolasin ekstrelerinin *E. cloacea* ATCC 13047, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium* ATCC 14028 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için bu mikroorganizmalar ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlara çıkılması veya farklı antibiyotikler ile sinerjistik etkisinin araştırılması önerilir.
2. Saf Viyolasin'in HIV-1 RT inhibisyonu için IC₅₀ değerinin Deoksiviyolasin'e göre düşük olması nedeniyle HIV-1 RT inhibisyonu etkinliğinin belirlenmesinde Viyolasin'e ait başka türevlerin de çalışılması önerilir.
3. Saf Viyolasin SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 Biyotin inhibisyonun etkinliği yüksek olmasına rağmen, Deoksiviyolasin'in düşük inhibisyona sebep olması, Viyolasin'e ait diğer türevlerinin de SARS-CoV-2 inhibisyon etkinliklerinin araştırılması önerilmektedir.
4. Ayrıca GMG-1 kaba Viyolasin ekstresinin en yüksek konsantrasyonunun HIV-1 RT üzerindeki inhibisyon etkisinin, saf Viyolasin'in inhibisyon etkisinden yaklaşık % 5'lik bir farkla fazla olmasının nedeninin, kaba ekstre içerisindeki diğer bileşiklerinde inhibisyon etkisine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple bu bileşiklerin tanımlanarak inhibisyon etkilerinin ve kaba ekstre içerisindeki oranlarının belirlenmesi için araştırma yapılması önerilmektedir.
5. HIV-1 RT ve SARS-CoV-2 Spike S1: ACE2 Biyotin için farklı inhibisyon aktiviteleri sergilemesi nedeniyle Viyolasin ve Viyolasin türevlerinin bu proteinler ile olan etkileşimlerinin *in silico* olarak incelenmesi önerilmektedir.
6. HIV-RT üzerine olumsuz etkisinden ötürü AIDS hastalarında tedavilerde alternatif bir doğal ürün olarak kullanılması önerilmektedir.

7. Buna ek olarak Spike S1: ACE2 bağlanmasına sağladığı inhibisyon sebebi ile tüm koronavirüs enfeksiyonlarında doğal antiviral olarak veya koronavirüslerin yüzey proteinlerine bağlanmayı veya yüzey proteinlerinin yapısını bozmayı hedefleyen biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesinde kullanılabilir.
8. Virüsler üzerine yapılan çalışmaların sınırlı olması nedeniyle farklı virüsler üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.
9. Bu çalışmada, Viyolasin'nin kaba ekstreleri, saf Viyolasin ve Deoksiviyolasin için antioksidant etkinlik çalışması yapılmış ancak IC₅₀ değeri belirlemeye yetecek olan konsantrasyon aralığı kısıtlı zaman nedeni ile belirlenememiştir. Farklı çalışmalarla antioksidant özelliği belirtilmiş olan Viyolasin'in, kaba ekstreleri ve farklı türevleri için antioksidan etkinlik taraması yapılması ve IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi önerilmektedir.
10. Saf Viyolasin eldesindeki zorluklar ve yüksek maliyet nedeni ile biyofilm çalışmasında sadece kaba ekstrelerden çalışılabilmektedir. Saf Viyolasin ve Viyolasin türevlerinin antibiyofilm özelliklerinin incelenmesi için yüksek miktarda Viyolasin üretimi gereklidir. Viyolasin'in *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki hafif ve orta seviyeli inhibisyonu nedeniyle oluşumunun görüldüğü hastaneler, tıbbi cihazlar, sağlık ve gıda sektörü ile ilişkili alanlarda doğal koruyucu ürün olarak kullanımı önerilmektedir.
11. Viyolasin'in mevcut biyolojik aktiviteleri nedeniyle önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmalarda Viyolasin üretimini teşvik edecek yeni yöntemlerin bulunmasına, yüksek miktarda üretim yapılmasını ve saflaştırmayı kolaylaştıracak sağlayacak sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abebe, G., 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. International Journal of Microbiology, 1705814. DOI: 10.1155/2020/1705814.
- Amanat, F. ve Krammer, F., 2020. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report, Immunity, 52,4, 583–589.
- Ambrožič Avguštin, J, Žgur, Bertok, D, Kostanjšek, R ve Avguštin, G., 2013. Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov., Antonie Van Leeuwenhoek, 103, 4,763-9.
- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A. ve Al-Ahmad, A., 2016. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation, Frontiers of Microbiology, 6, 1554.
- Andrighetti-Frohner, C. R., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barandi, C. R. M. ve Simoes, C. M. O., 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 834–848.
- Armbruster, C. R., ve Parsek, M. R., 2018. New insight into the early stages of biofilm formation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115, 17, 4317–4319.
- Arnold, J. W., 2008 Colorimetric assay for biofilms in wet processing conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35,1475–1480.
- Asahchop, E. L., Wainberg, M. A., Sloan, R. D., ve Tremblay, C. L., 2012. Antiviral drug resistance and the need for development of new HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, Antimicrobial agents and chemotherapy, 56,10, 5000–5008.
- Asencio, G., Lavin, P., Alegría, K., Domínguez, M., Bello, H., González-Rocha, G. ve González-Aravena, M., 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria, Electronic Journal of Biotechnology, 17, 1, 1-5.
- August, P.R., Grossman, T.H., Minor, C., Draper, M.P., MacNeil, I.A., Pemberton, J.M., Call, K.M., Holt, D. ve Osburne, M.S., 2000. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2,513–519.
- Balcázar, J. L., Subirats, J. ve Borrego, C. M., 2015.The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance, Frontiers of. Microbiology, 6, 1216.
- Ballestriero, F., Daim, M., Penesyan, A., Nappi, J., Schleheck, D., Bazzicalupo, P., Di Schiavi, E., ve Egan, S., 2018. Correction: Antinematode Activity of Violacein and the Role of the Insulin/IGF-1 Pathway in Controlling Violacein Sensitivity in *Caenorhabditis elegans*, PloS one, 13, 12, e0210026.

- Bangaru, S., Ozorowski, G., Turner, H. L., Antanasijevic, A., Huang, D., Wang, X., Torres, J. L., Diedrich, J. K., Tian, J. H., Portnoff, A. D., Patel, N., Massare, M. J., Yates, J. R. 3rd, Nemazee, D., Paulson, J. C., Glenn, G., Smith, G. ve Ward, A. B., 2020. Structural analysis of full-length SARSCoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate, Science, 370, 1089–1094.
- Bao, L., Deng, W., Huang, B., Gao, H., Ren, L., Wei, Q., Yu, P., Xu, Y., Liu, J., Qi, F., vd., 2020. The Pathogenicity of 2019 Novel Coronavirus in hACE2 Transgenic Mice, bioRxiv. DOI: 10.1101/2020.02.07.939389.
- Baricz, A., Teban, A., Chiriac, C. M., Szekeres, E., Farkas, A., Nica, M., Dascalu, A., Oprisan, C., Lavin, P. ve Coman, C., 2018. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. Scientific Reports, 8, 15272.
- Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P. vd., 2020. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion, Nature, 588, 327–330.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199–1200.
- Blosser, R. S. ve Gray, K. M., 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. J Microbiol Methods 40, 47–55.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J. L., Regatieri, C. V. , Palladino, M. V., Durán, N., Nader, H. B., Haun, M. ve Justo, G.Z., 2010. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor, Chemico Biological Interactions, Jun 7,186, 1:43-52.
- Brun, J. Vasiljevic S., Gangadharan B., Hensen M., Chandran A. V., Hill M. L., Kiappes J.L., Dwek R. A., Alonzi D. S., Struwe W. B. ve Zitzmann N.,2020. Analysis of SARS-CoV-2 spike glycosylation reveals shedding of a vaccine candidate, bioRxiv, 2020.11.16.384594.
- Bushman, F. D., Fujiwara, T. ve Craigie, R., 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro, Science 249,1555–1558
- Cauz, A. C. G., Carretero G. P. B., Saraiva, G.K.V., Park, P, Mortara, L, Cuccovia, I.M., Brocchi, M. ve Gueiros-Filho. F. J., 2019. Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria, ACS Infectious Diseases, 12, 5, 4, 539-549.
- Cazoto, L., Martins, D., Ribeiro, M., Durán, N.ve Nakazato, G., 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis, Journal of Antibiotics, 64, 395–397.
- Chaudhry, F., Lavandero, S., Xie, X., Sabharwal, B., Zheng, Y.Y., Correa, A., Narula, J.ve Levy, P., 2020. Manipulation of ACE2 expression in COVID-19, Open Heart. Dec;7, 2,e001424.
- Chen, M., Yu, Q., ve Sun, H., 2013. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections, International journal of molecular sciences, 14, 9, 18488–18501.

- Chen, Q., Allot, A. ve Lu, Z.; 2021. LitCovid: An open database of COVID-19 literature. Nucleic Acids Research, 49, D1534–D1540
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. ve Varmus, H. E., Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- Crouzet, M., Le Senechal, C., Brözel, V. S., Costaglioli, P., Barthe, C., Bonneu, M., Garbay, B., ve Vilain, S., 2014. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. BMC microbiology, 14, 253.
- Cueno, M. E. ve Imai, K., 2021. Structural Comparison of the SARS CoV 2 Spike Protein Relative to Other Human-Infecting Coronaviruses, Frontiers in Medicine (Lausanne), Jan 14;7, 594439.
- Cui, J., Li, F. ve Shi, Z.L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology, 17, 181–192.
- CLSI,. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. CLSI Document M45-A, 2006.
- CLSI, Performans Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement M100-S22, Vol.32, No.3, Wayne, PA: Clinical and LaboratuvaryStandarts Institute, 2012.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobicly. CLSI Standart 11th Edition Standart M07.Wayne, PA: Clinical and Laboratuvary Standarts Institute, 2018.
- D’Cruz, O. J. ve Uckun, F. M., 2006. Novel tight binding PETT, HEPT and DABO-based non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, Journal of Enzyme Inhibition and. Medicinal Chemistry, 21, 329 –350.
- Dai, L. ve Gao, G. F., 2021. Viral targets for vaccines against COVID-19, Nature Reviews Immunology, 21, 73–82.
- Das, K. ve Arnold, E., 2013. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. Currient Opinion in Virology., 3, 2, 111-8.
- De Souza, A. O., Aily ,D. C. G., Sato, D. N., Dura’n, N., 1999. In vitro violacein activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, Revista do Instituto Adolfo Lutz 58, 59–62.
- DeMoss, R. D., 1967. Violacein. In: Gottlieb D., Shaw P.D. (Eds) Biosynthesis. Antibiotics. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 77-81.
- Dodou, H. V., Batista, A. H. M., Medeiros, S. C., Sales, G. W. P., Rodrigues M. L., Pereira P. I. O., Nogueira P. C. N., Silveira E. R., Grangeiro T. B. ve Nogueira N. A. P., 2020. Violacein antimicrobial activity on ‘*Staphylococcus epidermidis*’ biofilm, Natural Product Research. 34,23, 3414-3417.
- Dodou, H. V., de Moraes Batista, A. H., Sales, G. W .P., de Medeiros, S. C., Rodrigues, M. L., Nogueira, P. C. N., Silveira, E. R. ve Nogueira, N. A. P., 2017. Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* and synergistic effect on commercially available antibiotics, Journal of Applied Microbiology,123,4, 853-860.

- Dura'n, M., Ponezi, A. N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M. F. S., Justo, G. Z. ve Dura'n, N., 2012. Potential applications of violacein: a microbial pigment, Medicinal Chemistry Research 21, 1524–1532.
- Durán, N., Justo, G.Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G. R. ve Nakazato, G., 2016. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review, Biotechnology Advances, 34, 5, 1030-1045.
- Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L. ve Martins, D., 2007. Violacein: properties and biological activities, Biotechnology and Applied Biochemistry., 48, 127–133.
- Erbelding, E. J., Post, D. J., Stemmy, E. J., Roberts, P. C., Augustine, A. D., Ferguson, S., Paules, C. I., Graham, B. S., ve Fauci, A. S., 2018. A Universal Influenza Vaccine: The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Journal of Infectious. Diseases, 218, 347–354.
- Extremiana, C. I., Costa L., Aguiar, I., Peixe, L. ve Fonseca, P., 2011. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. Journal of Microbiological Methods, 84, 2, 167–173.
- Fan, X., Cao, D., Kong, L. ve Zhang, X., 2020. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein, Nature Communications 11, 3618.
- Fang, M. Y., Zhang, C., Yang, S. vd., 2015. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway, Microbial Cell Factories, 14, 8.
- Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z, Durán, N. ve Peppelenbosch, M. P., 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death, Neoplasia, September 1
- Fischl, M. A. , Richman, D. D., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., Leedom, J. M., Groopman J. E. , Mildvan, D., Schooley, R. T. vd., 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial, The New England Journal of Medicine, 317, 185-191.
- Fouchier, R. A., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., De Jong, J. C., Simon, J. H., vd., 2004. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 6212–6.
- Francolini, I. ve Donelli, G., 2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59, 3, 227–238.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. ve Gálvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. International Journal of Food Microbiology, 2;151, 2, 125-40.
- Friedrich, I., Hollensteiner, J., Schneider, D., Poehlein, A., Hertel, R. ve Daniel, R., 2020. First Complete Genome Sequences of *Janthinobacterium lividum* EIF1 and EIF2 and Their Comparative Genome Analysis. Genome Biology and Evolution, 12, 10, 1782–1788.

- Füller, J. J., Röpke, R., Krausze, J., Rennhack, K. E., Daniel, N. P., Blankenfeldt, W., Schulz, S., Jahn, D., ve Moser, J., 2016. Biosynthesis of Violacein, Structure and Function of l-Tryptophan Oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. The Journal of biological chemistry, 291, 38, 20068–20084.
- Gaoa, A., Chena, H., Houb, A. ve Xiea, K., 2019. Efficient antimicrobial silk composites using synergistic effects of violacein and silver nanoparticles. Materials Science and Engineering: C, 103, October 2019, 109821.
- Gasteigher, E., vd., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, In: Walker J. M. (ed) The proteomics protocols handbook. Humana Press, Totow.
- Gilmore, B. (2011). Antimicrobial Ionic Liquids. 10.5772/13861.
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber C., Leontovich A. M. ve Neuman B. W., 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology, 5, 536–544.
- Guan, J., Xiao, X., Xu, S., Gao, F., Wang, J., Wang, T., Song, Y., Pan, J., Shen, X. ve Wang, Y., 2015. Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression. Journal of Microbiology, 53, 9, 633-42.
- Guo, H.; Huang, M.; Yuan, Q.; Wei, Y.; Gao, Y.; Mao, L.; Gu, L.; Tan, Y. W.; Zhong, Y.; Liu, D.; vd., 2017. The important role of lipid raft-mediated attachment in the infection of cultured cells by coronavirus infectious bronchitis virus beaudette strain. PLoS ONE, 12, e0170123.
- Gutiérrez, T. J., 2019. Enzymes in food biotechnology, production, applications, and future prospects, Chapter 19, Pages 321-342, Academic Press Antibiofilm Enzymes as an Emerging Technology for Food Quality and Safety., DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00019-0.
- Hamre, D. ve Procknow, J. J., 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 121, 190–3.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. ve Markowitz, M., 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature, 12, 373, 6510, 123-6.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S. Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C. ve Pöhlmann, S., 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell, 181, 271–280.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. ve Pöhlmann, S., 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., 31, 102, 22, 7988-93.
- Hoshino, T., 2011. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. Appl Microbiol Biotechnol., 91, 6, 1463-75.

- Hoshino, T., Kondo, T., Uchiyama, T. ve Ogasawara, N., 1987. Studies on the Biosynthesis of Violacein .1. Biosynthesis of Violacein - a Novel Rearrangement in Tryptophan-Metabolism with a 1,2-Shift of the Indole Ring. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo 51, 965–968.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... ve Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet, 395,10223, 497-506.
- Huang, R., Li, M., ve Gregory, R. L., 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence, 2, 5, 435–444.
- Hulswit, R. J., De Haan, C. A. ve Bosch, B. J., 2016. Coronavirus spike protein and tropism changes, Advances in Virus Research., 96, 29–57.
- Jaimes, J. A., André, N. M., Chappie, J. S., Millet, J. K. ve Whittaker, G. R., 2020. Phylogenetic Analysis ve Structural Modeling of SARS-CoV2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop, Journal of Molecular Biology, 432, 3309–3325.
- Janjaroen, D., Ling, F. Q., Monroy, G., Derlon, N., Morgenroth, E., Boppart, S. A., Liu, W. T., ve Nguyen, T. H., 2013. Roles of ionic strength and biofilm roughness on adhesion kinetics of *Escherichia coli* onto groundwater biofilm grown on PVC surfaces. Water Research, 47, 7, 2531–2542.
- Jin, Y. H., Cai, L., Cheng, Z. S.vd. 2020. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version).Military Medical Research, 7, 4.
- Kämpfer, P., Falsen, E. ve Busse, H. J., 2008. Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 1, 136-8.
- Kanelli, M., Mandic, M., Kalakona, M., Vasilakos, S., Kekos, D., Nikodinovic-Runic, J. ve Topakas, E., 2018. Microbial Production of Violacein and Process Optimization for Dyeing Polyamide Fabrics With Acquired Antimicrobial Properties. Frontiers in Microbiology 9, 1495.
- Kapikian, A. Z., James, H. D. Jr, Kelly, S. J , Dees, J. H., Turner, H. C., McIntosh, K., vd., 1969. Isolation from man of “avian infectious bronchitis virus-like” viruses (coronaviruses) similar to 229E virus, with some epidemiological observations. Journal of Infectious Diseases, 119, 282–90.
- Kau, A. L., Martin, S. M., Lyon, W., Hayes, E., Caparon, M. G., ve Hultgren, S. J. (2005). *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. Infection and immunity, 73, 4, 2461–2468.
- Kim, M. A., Rosa, V. ve Min, K. S., 2020. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. Scientific Reports, 10, 21867.
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I.; Sheffield

- COVID-19 Genomics Group, McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., Moon-Walker, A., Whelan, S. P., LaBranche, C. C., Saphire, E. O., Montefiori, D. C., vd., 2020. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell 182, 812–827.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., vd., 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. New England Journal of Medicine, 348, 1953–66.
- Kuete, V., Bertrandteponno, R., Mbaveng, A. T., Tapondjou, L. A., Meyer, J. J. M., Barboni, L. ve Lall, N., 2012. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 12, 228.
- Kumar, V., Dhanjal, J. K., Bhargava, P., Kaul, A., Wang, J., Zhang, H., ... Sundar, D., 2020. Withanone and Withaferin-a are predicted to interact with transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) and block entry of SARS-CoV-2 into cells. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1–13.
- Leon, L. L., Miranda, C. C., De Souza, A. O., ve Durán, N., 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 48, Issue 3, September 2001, Pages 449–450.
- Li Y., Zhang, Z., Yang, L., Lian, X., Xie, Y., Li S., Xin, S., Cao, P. ve Lu, J., 2020c. The MERS-CoV receptor DPP4 as a candidate binding target of the SARS-CoV-2 Spike. iScience, 23, 101160.
- Li, F., 2016. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annual Review of Virology, 3, 237–61.
- Li, M., Yang, F., Lu, Y. ve Huang, W., 2020a. Identification of *Enterococcus faecalis* in a patient with urinary-tract infection based on metagenomic next-generation sequencing: a case report. BMC Infectious Diseases, 20, 467.
- Li, X., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., Zhao, Q., Li, Y., ve Chaillon, A., 2020b. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019- nCoV. Journal of Medical Virology, 92, 5, 501-511.
- Li, Z., Tomlinson, A. C., Wong, A. H., Zhou, D., Desforges, M., Talbot, P. J., Benlekbir, S., Rubinstein, J. L., ve Rini, J. M., 2019. The human coronavirus HCoV-229E S-protein structure and receptor binding. Elife, 8, e51230.
- Lu G., Wang Q., ve Gao G. F., 2015. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. Trends in Microbiology, 23, 468–78.
- Lu, Y., Liu, D. X., ve Tam, J. P., 2008. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. Biochemichal and Biophysichal Research Community, 369, 344–349.
- Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., Blomberg W. R., Meigs D. D., Hasan M., Patel M., Kline P., Chang R. C., Chang L., Gendelman H. E. ve Kevadiya B. D., 2020. The Natural History, Pathobiology, and

- Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 15, 359–386.
- Mah T. F. ve O'Toole G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9,1, 34-9.
- Malar, S. E. E., Krishnaveni, N., Jayakrishnan, A. ve Ronald, 2014. Extraction and Characterization of the Pigment Violacein from *Chromobacterium violaceum* and Its Antibacterial Properties. PSGCAS Search: A Journal of Science and Technology, 2, 2, 30-5.
- Malik, Y. S.; Kumar, N.; Sircar, S.; Kaushik, R.; Bhat, S.; Dhama, K.; Gupta, P.; Goyal, K.; Singh, M. P.; Ghoshal, U.; vd., 2020. Coronavirus disease pandemic (Covid-19): Challenges and a global perspective. Pathogens, 9, 519.
- Marinho, A. R., Martins, P. D., Ditmer, EM, d'Azevedo, P. A., Frazzon, J., Van Der Sand, S. T. ve Frazzon, A. P., 2013. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. Brazilian Journal of Microbiology., 44, 2, 423-426.
- Matthee, G., Wright, A. D. ve König, G. M., 1999. HIV reverse transkriptase inhibitors of natural origin. Planta Medica , 65, 6: 493-506.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. ve Jürgens, K., 2004. Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. Applied And Environmental Microbiology, 70, 3, 1593–1599.
- May, G., Brummer, B. ve Ott, H., 1991. Ger. Pat. DE 3935066
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., ve O'Toole, G. A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. Current Protocols in Microbiology, Chapter 1, Unit–1B.1.
- Millet, J. K. ve Whittaker, G. R., 2015. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus Research, 202, 120–34.
- Mitsuya H., Weinhold K. J., Furman P. A , St Clair M. H., Lehrman S. N., Gallo R. C., Bolognesi D, Barry D. W. ve Broder S., 1985. 30 -Azido-30 - deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 7096-7100.
- Mohamed, J. A. ve Huang, D. B., 2007. Biofilm formation by enterococci. Journal of Medical Microbiology, 2007 Dec, 56, Pt 12, 1581-1588.
- Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Hurtado Del Pozo, C., Prosper, F., Romero, J. P., Wirnsberger, G., Zhang, H., Slutsky, A. S., Conder, R., Montserrat, N., Mirazimi, A. ve Penninger, J. M., 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. Cell, 181, 905–913.
- Narayan, O. ve Clements, J. E. 1989. "Biology and pathogenesis of lentiviruses". Journal of General Virology, 70, 7, 1617–39.

- Nishima, W. ve Kulik, M., 2021. Full-Length Computational Model of the SARS-CoV-2 Spike Protein and Its Implications for a Viral Membrane Fusion Mechanism, Viruses, 11;13, 6, 1126.
- O'sullivan, J., McCullough, J., Johnson, J. H., Bonner, D. P., Clark, J. C., Dean, L. ve Trejo, W. H., 1990. Janthinocins A, B and C, novel peptide lactone antibiotics produced by *Janthinobacterium lividum*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological characterization. The Journal of antibiotics, 43, 913–919.
- Oh, W. T., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kim, S. W., Kang, J. W., Han, S. J., Kwon, J., Jun, J. W., ve Park, S. C., 2019. *Janthinobacterium lividum* as An Emerging Pathogenic Bacterium Affecting Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fisheries in Korea. Pathogens (Basel, Switzerland), 8, 3, 146.
- Olajide, O. A., Iwuanyanwu, V. U., Lepiarz-Raba, I., Al-Hindawi, A. A., Aderogba, M. A., Sharp, H. L., ve Nash, R. J., 2021. Garcinia kola and garcinoic acid suppress SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1-induced hyper-inflammation in human PBMCs through inhibition of NF- κ B activation. Phytotherapy Research : PTR, 10.1002/ptr.7315.
- Ord, M., Faustova, I. ve Loog, M., 2020. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. Scientific Reports, 10, 16944 60.
- Paidi, R. K., Jana, M., Raha, S., McKay, M., Sheinin, M., Mishra, R. K. ve Pahan, K., 2021. Eugenol, a Component of Holy Basil (Tulsi) and Common Spice Clove, Inhibits the Interaction Between SARS-CoV-2 Spike S1 and ACE2 to Induce Therapeutic Responses. J Neuroimmune Pharmacology, 22, 1–13.
- Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C ve Schippa S., 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. Journal of Applied Microbiology, 102, 4, 992-9.
- Perlman, S., 2020. Another Decade, Another Coronavirus. New England Journal of Medicine, 20; 382, 8, 760-762.
- Petrachi, T., Resca, E., Piccinno, M. S., Biagi, F., Strusi, V., Dominici, M., ve Veronesi, E., 2017. An Alternative Approach to Investigate Biofilm in Medical Devices: A Feasibility Study. International Journal Of Environmental Research And Public Health, 14, 12, 1587.
- Phelan, A. L., Katz, R., ve Gostin, L. O., 2020. The novel coronavirus originating in Wuhan, China: challenges for global health governance. Jama, 323,8, 709-710.
- Pia, L., 2020. Spatial resolution of SARS-CoV-2 lung infection. Nature reviews. Immunology, 20, 10, 591.
- Pittsa, B., Hamilton, M. A., Zilverc, N. ve Stewart, P. S., 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. Journal of Microbiological Methods, 54, 269–276.
- Raghuvamsi, P. V., Tulsian, N.K., Samsudin, F., Qian, X., Purushotorman, K., Yue, G., Kozma, M. M., Hwa, W. Y., Lescar, J., Bond, P. J., MacAry, P. A. ve Anand, G.

- S., 2021. SARS-CoV-2 S protein:ACE2 interaction reveals novel allosteric targets. Elife. 8;10, e63646.
- Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D., vd., 1995. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. Nature Structural & Molecular Biology, 2, 293–302.
- Rettori, D. and Duran, N., 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 685–688.
- Sánchez, C., Braña, A. F., Méndez, C. ve Salas, J. A., 2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. Chembiochem, 7, 8, 1231-40.
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M. ve Belshaw, R., 2010. Viral mutation rates. Journal of Virology, 84:9733–9748.
- Sasidharan, A., Sasidharan, N. K., Amma, D. B. N. S. vd., 2015. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). Journal of Microbiology. 53, 694–701.
- Shahid, A., Rasool, M., Akhter, N., Aslam, B., Hassan, A., Sana, S., Rasool, M. H. ve Khurshid, M., 2019. Innovative Strategies for the Control of Biofilm Formation in Clinical Settings, *Bacterial Biofilms*, Edited by Sadik Dincer, Melis Sümengen Özdenefe ve Afet Arkut DOI: 10.5772/intechopen.89310.
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K. ve Hashemi, A. Advanced strategies for combating bacterial biofilms. Journal of Cellular Physiology , 2019 Jan 29. DOI: 10.1002/jcp.28225.
- Stan, D., Enciu, A. M., Mateescu, A. L., Ion, A. C., Brezeanu, A. C., Stan, D. ve Tanase, C., 2021. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. Frontiers of Pharmacology, 6;12, 723233.
- Stower, H., 2020. Spread of SARS-CoV-2. Nature Medicine, 26, 465.
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S. ve Shankar, N., 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 72, 10, 6032-9.
- URL-1, <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>, 28.Aralık 2021
- URL-2, <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/what-start-choosing-hiv-treatment-regimen>, 28 Aralık 2021
- URL-3, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/nucleoside-reverse-transcriptase-inhibitor-nrti>, 28 Aralık 2021
- URL-4, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/non-nucleoside-reverse-transcriptase-inhibitor-nnrti>, 28 Aralık 2021
- URL-5, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/integrase-strand-transfer-inhibitor-insti>, 28 Aralık 2021

- URL-6, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/ccr5-antagonist>, 28 Aralık 2021
- URL-7, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/post-attachment-inhibitor>, 28 Aralık 2021
- URL-8, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/fusion-inhibitor>, 28 Aralık 2021
- URL-9, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/protease-inhibitor-pi>, 28 Aralık 2021
- URL-10, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/392/624/11468120910bul.pdf>, 20 Aralık 2021
- URL-11, https://bpsbioscience.com/media/wysiwyg/coronavirus/79954_6.pdf, 20 Aralık 2021
- Ünlü, G. 2020. Bacterial Biofilms: Formation, Prevention, and Control. <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2020/october/columns/food-safety-and-quality-bacterial-biofilms-formation-prevention-and-control>, 09 Aralık 2021
- Vazquez, E., 1996. Nevirapine approval expands combo possibilities--and HIV suppression. Positively Aware. ,7, 5, 9. PMID, 11363791.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A. ve Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. Journal of Biological Chemistry, 277, 14838–14843.
- Volz, E., Hill, V., McCrone, J. T., Price, A., Jorgensen, D., O'Toole, Á., Southgate, J., Johnson, R., Jackson, B., Nascimento, F. F., Rey, S. M., Nicholls, S. M., Colquhoun, R. M., da Silva Filipe, A., Shepherd, J., Pascall, D. J., Shah, R., Jesudason, N., Li, K., Jarrett, R., Pacchiarini, N., Bull, M., Geidelberg, L., Siveroni, I.; COG-UK Consortium, Goodfellow, I., Loman, N. J., Pybus, O. G., Robertson, D. L., Thomson, E. C., Rambaut A. ve Connor, T. R., 2021. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. Cell 184, 1–12.
- Votteler, J., Schubert, U., Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology, Editor(s): Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, Encyclopedia of Virology (Third Edition), Academic Press, 2008, Pages 517-525.
- Walls A. C. Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T. ve Veasler, D., 2020. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell 181, 281–292.e6.
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S. ve Crispin, M., 2020. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. Science 369, 330–333.
- Weiss, S. R. ve Leibowitz, J. L., 2011. Coronavirus pathogenesis. Advances Virus Research, 81, 85-164.
- Wiese, O., Zemlin, A. E., ve Pillay, T. S., 2021. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). Journal of Clinical Pathology, 74, 5, 285–290.
- Wilkinson, M. D., Lai, H. E., Freemont P. S. ve Baum, J., 2020. A Biosynthetic Platform for Antimalarial Drug Discovery. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 21, 64, 5, e02129-19.

- Winkelströter L. K., Teixeira F. B., Silva E. P., Alves V. F. ve De Martinis E. C., 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. Microbial Ecology, 68, 1, 35-46.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., vd., 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. Journal of Virology, 79, 884–95.
- Wu, D., Wu, T., Liu, Q. ve Yang, Z., 2020. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. International Journal of Infectious Diseases, 94, 44-48.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., ve Song, Z. J., 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. International Journal of Oral Science, 7, 1–7.
- Wu, L., Wang, N., Chang, Y., Tian, X., Na, D., Zhang, L....Liang, G., 2007. Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. Emerging Infectious Diseases, 13, 10, 1562-1564.
- Yada, S, Wang, Y, Zou, Y, Nagasaki, K, Hosokawa, K, Osaka, I, Arakawa, R ve Enomoto, K., 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. Marine Biotechnology (NY), 10, 2, 128-32.
- Yang, D. ve Leibowitz, J. L., 2015. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. Virus Research, 3, 206, 120-33.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L. ve He, J., 2019. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. International Journal of Molecular Sciences, 20, 14, 3423.
- Yoshimoto, F. K., 2021. A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2. The Protein Journal, 40, 260–295.
- Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. ve Fouchier, R. A., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. New England Journal of Medicine, 367, 1814–20.
- Zaman, M. A., Oparil, S. ve Calhoun, D. A., 2002. Drugs targeting the reninangiotensin-aldosterone system. Nature Reviews Drug Discovery, 1, 621–636.
- Zheng, J. X., Bai, B., Lin, Z. W., Pu, Z. Y., Yao, W. M., Chen, Z., Li, D. Y., Deng, X. B., Deng, Q. W. ve Yu, Z. J. (2018). Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. Journal of Medical Microbiology, 67, 1, 60–67.
- Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H. vd., 2020. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. Nature Communications, 11, 6013.
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G.; Hu, B., Zhang, L., Zhang, W. ve Si, H., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature, 579, 270–273.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F. ve Tan, W., 2019. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel

Coronavirus from Patients with Pneumonia in China. New England Journal of Medicine, 20, 382, 8, 727-733.



ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini İzmir Bornova Cem Bakioğlu Lisesi'nde 2003 yılında tamamladı. Antalya Akdeniz Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2008 yılında onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2011 yılında Toprak İlaç ve Kimyevi Maddeler Sanayi ve Ticaret Anonim şirketinde 'Mikrobiyoloji Uzmanı' olarak işe başladı ve aynı yıl içerisinde ayrıldı. 2016 yılında Sakarya Üniversitesi Eğitim Fakültesinden Formasyon eğitimi aldı. 2017 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı, ve Yüksek lisans eğitimini 2022 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında tamamladı. 2018 yılından itibaren Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.