

2007-9



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU**

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**K5 TİPİ ÖLDÜRÜCÜ MAYA TOKSİK PROTEİNİNİN
YÜKSEK MİKTARLARDA ÜRETİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI, İNSAN VE BİTKİ PATOJENİK
MANTARLARI ÜZERİNDEKİ İNHİBASYON
ETKİSİNİN TAYİNİ VE ENDÜSTRİYEL AMAÇLI
KULLANIM İÇİN FORMÜLASYONUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

PROJE NO : 104T495

Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

9/ 2007_73325

**K5 TİPİ ÖLDÜRÜCÜ MAYA TOKSİK PROTEİNİNİN
YÜKSEK MİKTARLARDA ÜRETİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI, İNSAN VE BİTKİ PATOJENİK
MANTARLARI ÜZERİNDEKİ İNHİBASYON
ETKİSİNİN TAYİNİ VE ENDÜSTRİYEL AMAÇLI
KULLANIM İÇİN FORMÜLASYONUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

PROJE NO : 104T495

PROF. DR. FATİH İZGÜ

**ŞUBAT 2007
ANKARA**

Önsöz

Bu proje K5 tipi öldürücü maya toksik proteini, panomycocin'in, yüksek miktarlarda üretimini ve izolasyonunu, insan patojenik maya ve mantar türleri üzerinde *in vitro* inhibasyon etkisinin tayinini ve ayrıca turunçgil meyvelerinde hasat sonrası çürümeye neden olan patojenik mantarlar üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* inhibasyon çalışmalarını kapsamıştır. Yüksek miktarlarda elde edilen panomycocin'in denenen tüm insan patojen maya ve mantar türleri üzerinde ve turunçgillerde ise çürümeye neden olan *Botrytis cinerea* ve *Penicillium* türleri üzerinde yüksek öldürücü etkisi olduğu bulunmuştur.

Yukarıda genel olarak açıklanan bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje no: 104T495).

İÇİNDEKİLER

Abstract	1
Özet.....	2
Giriş.....	3
Genel Bilgiler.....	4
1. Gereç ve Yöntemler.....	7
1.1. K5 tipi öldürücü maya proteininin; panomycocin'in, üretim ve saflaştırma çalışmaları.....	7
1.2 Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki <i>in vitro</i> etki spektrumu	8
1.2.1. Panomycocin'in patojenik mayalar üzerindeki hücre öldürme kinetiği...10	
1.3. Panomycocin'in insan patojenik dermatofit türleri üzerindeki etki spektrumu tayini.....	10
1.4. Panomycocin'in hasat sonrası turuncgillerde hastalıklara neden olan patojenik mantarlar üzerindeki etki spektrumu tayini.....	12
1.4.1. <i>In vitro</i> Antifungal Duyarlılık Testleri.....	13
1.4.1.1. Agar Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Spektrum Tayini.....	13
1.4.1.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testleri.....	14
1.4.2. <i>In vivo</i> Antifungal Duyarlılık Testleri.....	16
2. Bulgular.....	17
2.1. Panomycocin'in, saflaştırılması.....	17

2.2. Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki <i>in vitro</i> etki spektrumu tayini.....	19
2.2.1. Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki öldürme kinetiği.....	21
2.3. Panomycocin'in insan patojenik dermatofit türleri üzerindeki etki spektrumu	23
2.4. Panomycocin'in turunçgillerde hasat sonrası hastalık yapan mantar türleri üzerindeki antifungal etkileri.....	24
2.4.1. <i>In vitro</i> testler.....	24
2.4.1.1. Agar-difüzyon yöntemi.....	24
2.4.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi.....	25
2.4.2. <i>In vivo</i> testler.....	37
3. Tartışma/Sonuç.....	40
4. Referanslar.....	44
5. Proje özet Bilgi Formu.....	50

Ekler

1. Mali Rapor
2. Projeden kaynaklanan ilk yayın

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Panomycocin'in patojenik maya türleri üzerindeki NCCLS M27-A metoduna göre tayin edilen MİK-2 ,MİK-0 ve MFK değerleri.....	20
Tablo 2. Panomycocin'in test edilen 41 dermatofit izolatı üzerindeki MİK-0 ve MİK-2 değerleri.....	24
Tablo 3. Hasat Sonrası Turunçgillerde Hastalık Yapan Mantar Suşlarının Panomycocin'e Duyarlılıkları	28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Panomycocin'in anyon değiştirme kolonundaki elüsyon profili.....	18
Şekil 2. Panomycocin'in jel filtrasyon kolonundaki elüsyon profili.....	19
Şekil 3. Panomycocin'in <i>C.glabrata</i> (ATCC 90030) suşu üzerinde farklı konsantrasyonlarındaki öldürme kinetiği.....	22
Şekil 4. Panomycocin'in <i>C.albicans</i> (ATCC 26555) suşu üzerinde farklı konsantrasyonlarındaki öldürme kinetiği.	23
Şekil 5. Panomycocin'in <i>Botrytis cinerea</i> spor suspansiyonunu içeren SDA petripleri üzerindeki antifungal etkisinin tayini.....	25
Şekil 6. Mikroplakada Sıvı Dilusyon Yöntemiyle <i>Penicillium sp</i> Suşlarının panomycocin'e Duyarlılıkları.....	26
Şekil 7. Panomycocin'in <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> üzerindeki <i>In vitro</i> inhibe Edici Aktivitesi.....	27
Şekil 8. Panomycocin tarafından <i>Botrytis cinerea'</i> nın Germ Tüp Uzamasının Azaltılması.....	30
Şekil 9. Panomycocin ile inkübe edilen <i>Penicillium italicum'</i> un sporlarında gözlenen farklılıklar.....	31
Şekil 10. Panomycocin'in <i>P.digitatum</i> 'un germ tüp uzaması üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 11. Panomycocin'in <i>Botrytis cinerea</i> 'nın hif yapısı üzerindeki etkileri.....	33

Şekil 12. Panomycocin'in <i>B. Cinerea'nın</i> miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 13. Panomycocinin <i>P.italicum'un</i> miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.....	35
Şekil 14. Panomycocin'in <i>P.digitatum'un</i> miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 15. Limon üzerinde panomycocin'in <i>Botrytis cinerea</i> 'ya karşı <i>in vivo</i> antifungal aktivitesi.....	37
Şekil 16. Limon üzerinde panomycocin'in <i>P.italicum</i> 'a karşı <i>in vivo</i> antifungal aktivitesi.....	38
Şekil 17. Limon üzerinde panomycocin'in <i>P.digitatum</i> 'a karşı <i>in vivo</i> antifungal aktivitesi.....	39

Abstract

Killer proteins which are produced and secreted into the environment by certain yeast strains are considered as promising antifungal agents. In this study, inhibitory activity of *Pichia anomala* NCYC 434 (K5) killer protein, panomycocin, which is a 49 kDa glycoprotein with an *exo-β*-1,3-glucanase activity was tested against 41 isolates of dermatophytes, 26 isolates of pathogenic yeasts and 6 different fungal strains causing post harvest spoilage in citrus fruits. MICs (Minimal Inhibitory Concentration) were determined by a broth microdilution method based on the reference documents of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). For dermatophytes and post harvest pathogenic fungi, document M38-A and for the human pathogenic yeast strains, document M27-A were used. For panomycocin MIC determinations two end point criteria MIC-2 (prominent growth inhibition) and MIC-0 (complete growth inhibition) were recorded. All the tested human pathogenic fungi isolates were found susceptible to panomycocin. For pathogenic yeast strains MIC-2 values were ranged from 0.25-4 µg/ml and MIC-0 values were ranged from 0.5-8 µg/ml. For dermatophytes the values were 0.25-2 µg/ml and 1-8 µg/ml, respectively. Among the tested post harvest pathogenic fungi, panomycocin showed inhibitory activity against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. For *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* MIC-2 values were 2.1, 3.3 and 2.6 µg/ml, respectively. MIC-0 value was 16 µg/ml for each strain. These results showed that panomycocin is active against fungal strains that cause infections in humans and citrus fruits and highlighted its probable use as an antifungal agent in medicine and food protection.

Key words: K5-type yeast killer toxin, panomycocin, MIC value, dermatophytes, pathogenic yeasts, post-harvest pathogenic fungi,

Özet

Bazı maya suşları tarafından üretilen ve ortama salınan öldürücü proteinler potansiyel antifungal ajanlar olarak öngörülmektedirler. Bu çalışmada *exo-beta* 1,3 glukanaaz aktivitesine sahip, 49 kDa'luk bir glikoprotein olan *Pichia anomala* NCYC 434 (K5) öldürücü toksini, panomycocin'in öldürücü aktivitesi, 41 dermatofitik izolat, 26 patojenik maya izolatı ve hasat sonrası turunçgillerde çürümeye neden olan 6 farklı mantar suşuna karşı denenmiştir. Minimum inhibasyon konsantrasyonu (MİK) sıvı mikrodilasyon yöntemiyle CLSI'nın (Clinical and Laboratory Standard Institute) referans dökümanları baz alınarak belirlenmiştir. Dermatofitik izolatlar ve hasat sonrası patojen mantarlar için M38-A, patojenik maya mantarları için M27-A dökümanları kullanılmıştır. Panomycocin MİK tayinleri için iki kriter belirlenmiştir; MİK-2 (belirgin büyüme inhibasyonu) ve MİK-0 (tam büyüme inhibasyonu). Test edilen bütün insan patojenik maya ve mantar izolatlarının panomycocin'e duyarlı olduğu bulunmuştur. Patojenik maya mantarları için MİK-2 değerleri 0.25-4 µg/ml ve MİK-0 değerleri 0.5-8 µg/ml aralıklarındaydı. Bu değerler dermatofitler için sırasıyla 0.25-2 µg/ml ve 1-8 µg/ml olarak bulunmuştur. Panomycocin, test edilen hasat sonrası patojenik mantarları arasında, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* ve *Penicillium italicum* suşlarına karşı inhibasyon etkisi göstermiştir. *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* ve *Penicillium italicum* için MİK-2 değerleri sırasıyla 2.1, 3.3 and 2.6 µg/ml olarak, MİK-0 değeri ise her suş için 16 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar panomycocin'in insanlarda ve turunçgillerde enfeksiyonlara neden olan mantar suşlarına karşı aktif olduğunu göstermiş, tıp alanında ve gıda korumasında muhtemel antifungal ajan olarak kullanım olasılığını güçlendirmiştir.

Anahtar kelimeler: K5-tipi öldürücü maya toksini, panomycocin, MİK değeri, dermatofit, patojenik maya, hasat sonrası patojen mantarları,

Giriş

Bazı maya suşları belirli şartlar altında ortama duyarlı hücreleri inhibe edici polipeptid toksinler salarlar. Bu tip mantarlara öldürücü mantarlar ve saldıkları toksinlere öldürücü proteinler veya öldürücü toksinler adı verilmiştir. Öldürücü mayalar etki spektrumu ve immünite reaksiyonlarına göre 11 değişik tip altında sınıflandırılmışlardır (K1-K11). Bu toksinlerin hassas hücreler üzerindeki etki mekanizması farklılıklar gösterir. Bazıları membran geçirgenliğini değiştirir ya da DNA sentezini veya hücre bölünmesini G1 fazında durdurur diğerleri ise hücre duvarındaki β -1,3-glucan yapısını hidrolize eder veya sentezini engeller. Memeli hücreleri hücre duvarına sahip olmadığı için yeni ve seçiciliği yüksek antifungalların araştırma ve geliştirilmesi mantarların hücre duvarı bileşenlerini hedef teşkil eden ajanlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. *Pichia anomala* NCYC 434 hücrelerinin insan ve bitki patojenik mantarları ile etkileşimleri incelenerek yapılan çalışmalarda bu suşun test edilen patojenlere karşı çok kuvvetli inhibe edici etkisi olduğu bulunmuş ve bundan dolayı *P.anomala* NCYC 434 hücreleri tarafından üretilen toksik proteinin medikal alanda ve bitki korumasında doğal antifungal ajan olarak kullanılması öngörülmüştür. Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda, *P.anomala* suşunun öldürücü etkisinden sorumlu olan K5 tipi öldürücü toksinin biyokimyasal karakterizasyonu sonucunda, bu toksik proteinin tıp ve gıda alanında kullanım için uygun sıcaklık ve pH şartlarında aktivitesini koruyan bir exo- β -1,3-glukanaz olduğu bulunmuştur. K5 tipi öldürücü proteinin duyarlı hücrelerin, hücre duvarlarındaki β -1,3 glukan yapısını hidrolize etme özelliği, bu proteinin seçici bir antimikotik ajan olarak kullanımını önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu çalışma K5 tipi toksik proteinin endüstriyel alanlarda kullanılabilmesi amacıyla yüksek miktarlarda üretilip saflaştırılmasını, sistemik ve lokal mantar enfeksiyonlarına sebep olan *Candida* ve dermatofit türleri ve

turunçgillerde hasat sonrası bozulmaya sebep olan bitki patojen mantarları üzerindeki etki spektrum analizleri, MİK tayinleri, hücre öldürme kinetik çalışmalarını içermektedir.

Genel Bilgiler

Bazı maya suşları ortama protein yapıda toksinler salarlar; bu toksinler değişik mantar cins ve türlerinin yanı sıra Gram (+) bakterilerin büyümelerini inhibe eder. Bu toksinlere öldürücü maya proteinleri, bu suşlarda öldürücü mayalar denilir (Palfree ve Bussey ,1979; Radler and Schmitt,1987; Bussey et al. ,1990; İzgü et al. ,1997).

Bu öldürücü fenotipler ilk defa Bevan ve Makover tarafından 1963 yılında *Saccharomyces cerevisiae'* da bulunmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalar *Hansenula, Kluyveromyces, Pichia* ve diğer cinslere ait türlerde de öldürücü fenotipin varlığını göstermiştir (Phillskrik ve Young,1975; Starmer et al.,1987; Kazantseva ve Zimina 1989).

Öldürücü maya proteinleri etki spektrumu ve immunité özelliklerine göre değişik tipler altında sınıflandırılmışlardır (K1 - K11) (Rogers ve Bevan, 1978; Young ve Yagiu, 1978; Wickner, 1979; Tipper ve Bostian,1984). Öldürücü proteinlerin çift zincirli RNA' lar (Wickner,1996), lineer çift zincirli DNA plazmidleri (Gunge et al.,1981) veya kromozomal genler (Goto et al.,1990) tarafından kodlandığı bilinmektedir. Bunun yanısıra birçok genetik ve çevresel faktör toksin üretimini kontrol etmektedir.

Bazı öldürücü proteinlerin duyarlı hücreler üzerindeki toksik etkilerini membran geçirgenliğini değiştirerek gösterdikleri bilinmektedir (Kagan,1983). Bunun yanısıra DNA replikasyonunu önleyerek (Schmitt,1989) ya da hücre bölünmesini G1 fazında durdurarak etki gösterirler (White et al.,1989). Bazılar ise hücre duvarındaki β -1,3-

glucan yapısını bozarak (İzgu ve Altınbay, 2004; İzgu et. al. 2006) veya sentezini engelleyerek (Takasuka et al.,1995) öldürücü etki gösterirler.

Öldürücü proteinleri kodlayan plazmidlerin rekombinant DNA teknolojisinde potansiyel klonlama ve ekspresyon vektörleri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Radler et al.,1990; Dignard et al.,1991). Öldürücü mayalar *Candida albicans* ve *Cryptococcus* gibi patojenik mantarların biyotiplerinde geniş uygulama alanları bulmuşlardır (Morace et al., 1989). Ayrıca bu toksik proteinlerin gıda maddelerinin korunmasında ve endüstriyel fermantasyon işlemlerinde kontaminasyonların biyolojik yolla engellenmesinde kullanılması düşünülmektedir (Palpacelli et al.,1991; İzgu et al., 1997 ; İzgu et al., 2004).

Özellikle *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* öldürücü toksinleri insan ve bitki mantar enfeksiyonlarına karşı potansiyel antimikotik ajanlar olarak önerilmektedir. (Polonelli et al., 1986; Walker et al.,1995; Conti et al.,1998; Mathews et al.,1998; Polonelli et al.,1991; Magliani et al., 2002).

Yeni ve seçiciliği yüksek antifungal/antimikotiklerin araştırma ve geliştirilmesi maya ve mantarların hücre duvarı birleşenlerini hedef teşkil eden ajanlar üzerinde yoğunlaştırılmıştır, zira memeli hücreleri bu bileşenlere sahip değildirler. Maya ve mantar hücre duvarları üst tabakasında baskın olarak mannoproteinler ve düz ve/veya dallanmış yapıda β -1,3 ve/veya β -1,6 glukan içeren glukan iskeleti ve bir miktar kitin bulunmaktadır (Cabib et al., 1997). Bu bileşenlerin mayalar tarafından üretilen öldürücü toksik proteinler için birincil bağlanma bölgesi ve hücre duvarı reseptörü olarak işlev gördükleri belirlenmiştir (Hutchins ve Bussey, 1983; Schmitt ve Radler,1987; Jablonowski et al., 2001). Böylece günümüzde antifungal ajanlar üzerine araştırmalar maya toksik proteinlerinin bu amaçla kullanımı üzerine yoğunlaştırılmıştır (Selitrennikoff, 2001).

glucan yapısını bozarak (İzğü ve Altınbay, 2004; İzğü et al. 2006) veya sentezini engelleyerek (Takasuka et al.,1995) öldürücü etki gösterirler.

Öldürücü proteinleri kodlayan plazmidlerin rekombinant DNA teknolojisinde potansiyel klonlama ve ekspresyon vektörleri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Radler et al.,1990; Dignard et al.,1991). Öldürücü mayalar *Candida albicans* ve *Cryptococcus* gibi patojenik mantarların biyotiplemelerinde geniş uygulama alanları bulmuşlardır (Morace et al., 1989). Ayrıca bu toksik proteinlerin gıda maddelerinin korunmasında ve endüstriyel fermantasyon işlemlerinde kontaminasyonların biyolojik yolla engellenmesinde kullanılması düşünülmektedir (Palpacelli et al.,1991; İzğü et al., 1997 ; İzğü et al., 2004).

Özellikle *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* öldürücü toksinleri insan ve bitki mantar enfeksiyonlarına karşı potansiyel antimikotik ajanlar olarak önerilmektedir. (Polonelli et al., 1986; Walker et al.,1995; Conti et al.,1998; Mathews et al.,1998; Polonelli et al.,1991; Magliani et al., 2002).

Yeni ve seçiciliği yüksek antifungal/antimikotiklerin araştırma ve geliştirilmesi maya ve mantarların hücre duvarı birleşenlerini hedef teşkil eden ajanlar üzerinde yoğunlaştırılmıştır, zira memeli hücreleri bu bileşenlere sahip değildirler. Maya ve mantar hücre duvarları üst tabakasında baskın olarak mannoproteinler ve düz ve/veya dallanmış yapıda β -1,3 ve/veya β -1,6 glukan içeren glukan iskeleti ve bir miktar kitin bulunmaktadır (Cabib et al., 1997). Bu bileşenlerin mayalar tarafından üretilen öldürücü toksik proteinler için birincil bağlanma bölgesi ve hücre duvarı reseptörü olarak işlev gördükleri belirlenmiştir (Hutchins ve Bussey, 1983; Schmitt ve Radler,1987; Jablonowski et al., 2001). Böylece günümüzde antifungal ajanlar üzerine araştırmalar maya toksik proteinlerinin bu amaçla kullanımı üzerine yoğunlaştırılmıştır (Selitrennikoff, 2001).

Bitki patojenlerine karşı biyokontrol ajanı olarak öngörülen maya türleri arasında *Pichia anomala* geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahiptir. *P.anomala*, *Pichia guilliermondi* (= *Debaryomyces hansenii*) ve *Saccharomyces cerevisiae* 'nın, hava sızdırmayan depolarda buğdayların bozulmasına neden olan *Penicillium roqueforti* üzerindeki antogonistik aktiviteleri karşılaştırılmış; *P. roqueforti* 'nin üremesini tamamıyla inhibe eden *P. anomala* 'nın en güçlü antogonistik aktiviteye sahip olduğu, *D.hansenii* 'nin zayıf, *S.cerevisiae* 'nın ise fazla miktarda inoküle edildiğinde dahi en az antogonistik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Pettersson ve Schnürer, 1995). Yine aynı çalışmada *P. anomala* 'nın 17 küf türünün üremesi ve sporulasyonu üzerindeki inhibasyon etkisi araştırılmış; inokülasyon dozuna bağlı olarak *P. anomala* 'nın test edilen bütün küf türlerinin üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir. İnokülasyon dozunun artırılmasıyla diğerlerine göre daha dirençli olan, turuncgillerde hasat sonrası bozulmalara neden olan *Penicillium digitatum* ve *Penicillium italicum*'un üremesini önemli ölçüde azalttığı açıklanmıştır. 1980-1987 arasında İsveç'te, hava geçirmeyen depolarda saklanan tahıllar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada *P. anomala*'nın tahılların güvenli depo süresini en az 2 ay bazen de gelecek hasat zamanına kadar uzattığı görülmüştür (Ekström, 1992). *P. anomala*'nın *Aspergillus candidus* ve *Penicillium roqueforti* suşlarını inhibe ettiğini gösteren *invivo* sonuçları bu suşların hem hif uzunluğunda hem de CFU değerlerinde azalma olduğunu ortaya koymuştur (Bjönberg ve Schnürer, 1993). Başka bir çalışma da *P.anomala* 'nın yarı hava geçirmez test tüplerinde *P.roqueforti* suşunun buğdayda üremesini önlediğini göstermiştir (Peterson ve Schnürer, 1995). Ayrıca *P. anomala*'nın hasat öncesi ve sonrasında birçok meyvede görülen bitki patojeni *Botrytis cinerea*'nın büyümesini önlediği gösterilmiştir (Jijakli et.al, 1993; Masih ve Paul, 2002). Elma yüzeyinden izole edilen *P.anomala* suşunun *B. cinerea* ve

Penicillium spp. 'e karşı inhibisyon etkisinin olduğu da bulunmuştur (Jijakli et.al,1993).

Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalar sonucunda *Pichia anomala*'nın öldürücü etkisinden sorumlu olan K5 tipi öldürücü protein, panomycocin, saf halde ilk defa izole edilmiştir (Izgü ve Altınbay, 2004). Biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları panomycocin'in glikozilasyona uğramış bir protein olduğunu göstermiş ve tıp ve gıda alanında kullanımı için uygun sıcaklık ve pH aralıklarında aktivitesini muhafaza eden bir $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glukanaz olduğu bulunmuştur (Izgü et.al, 2005).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

1.1. K5 tipi öldürücü maya proteininin; panomycocin'in, üretim ve saflaştırma çalışmaları

Panomycocin, *Pichia anomala* NCYC 434 suşu tarafından üretilmektedir. Bu suş National Collection of Yeast Cultures, UK (NCYC)'den temin edilmiştir. Hücreler biyoreaktörde (BioBundle, Applikon, The Netherlands) YEPD (%1 maya ekstresi, %1 pepton, %2 glukoz, % 5 gliserol, pH 4.5) besi yeri kullanılarak üç litre çalışma haciminde, 450 devir/dakika karıştırıcı hızı ile 20 °C' de kültüre tabi tutulmuştur (~ 50 saat). Kültür ortamının pH'sı $4.5\pm 0,1$ 'de ADI 1030 biocontrol ünitesi ile otomatik olarak eklenen 2M KOH çözeltisi ile sabit tutulmuştur. Hazne, mass-flow kontrol ünitesi ile 2litre/dakika hava ile beslenmiştir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu Applikon-oksijen probu ile ölçülmüş ve % 30 hava doygunluğunun üstünde tutulmuştur.

Hücre kültür işlemi durdurulduktan sonra kültür ortamı hücrelerden santrifüj işlemi (8500 rpm, 15 dakika, 4 °C) ile ayrılmıştır. Bu işlemi takiben sterilizasyon amacıyla besi yeri sırasıyla 0.45 μm ve 0.22 μm membran filtrelerden süzölmüştür.

Kültür ortamının proteince zenginleştirilmesi için 30 kDa ultrafiltreler kullanılarak 100 kat konsantre edilmiştir. Elde edilen ham protein saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur.

Panomycocin saflaştırılma işlemleri için tam otomatik FPLC sistemi kullanılmış (Bio CAD 700 E, Applied Biosystems, USA) ve sırasıyla iyon-değişirme ve jel-filtrasyon kromatografik yöntemleri uygulanmıştır. Anyon-değişirme kromatografisinin uygulanması için, elde edilen ham protein öncelikle 30 kDa ultrafiltreler kullanılarak N-metil piperazin ile tampon değişirme işlemine tabi tutulmuştur. Anyon değişirme kromatografisi POROS HQ/M 4.6 mmD/100mmL kolonu (Applied Biosystems, USA) ile yapılmıştır. Protein elüsyonu için aynı tamponun NaCl' lü (500 mM) çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen protein toplanmış ve 5 kDa ultrafiltreler kullanılarak konsantre edilmiştir.

Bir önceki işlemde elde edilen protein 5 kDa ultrafiltreler kullanılarak 0.1 M Na_2HPO_4 sitrik asit, pH 4.5 ile tampon değişirme işlemine tabi tutulmuştur. Jel filtrasyon kromatografisi için TSK G2000 SW (Toso Haas, Japan) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0.1 M Na_2HPO_4 sitrik asit + 0.1 M Na_2SO_4 pH 4.5 tamponu kullanılmış ve elde edilen protein 5 kDa filtreler kullanılarak konsantre edilmiştir. Protein konsantrasyonu Bradford metodu ile bovine serum albumin standart alınarak belirlenmiştir. Proteinin saflığı SDS-PAGE metodu ve gümüş boyama ile test edilmiştir.

1.2. Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki in vitro etki spektrumu tayini

Panomycocin'in etki spektrumu çalışmaları 26 patojenik maya suşu üzerinde yapılmıştır. Kullanılan maya suşları Tablo 1' de gösterilmiştir. Patojenik mayaların

klirik izolatlari Alman Hastanesi (Istanbul) ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden (Ankara), standart suşları ise ATCC (American Type Culture Collection, ABD)' den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm klinik izolatlari tanımlanması API ID32C Aux (Biomerieux, Fransa) sistemi kullanılarak yapılmıştır.

Saf halde izole edilen panomyocin 25 *Candida* türü ve 1 *Saccharomyces cerevisiae* izolati üzerindeki antimikotik etki spektrumu, MİK (minimum inhibasyon konsantrasyonu) ve MFK (minimum fungisidal konsantrasyon) alışmaları için CLSI'ın (Clinical and Laboratory Standarts Institute) M27-A metodu (mayaların sıvı dilusyon yöntemiyle antifungal duyarlılık testi referans metodu) kullanılmıştır. Bu alışmalar RPMI 1640 besi yeri kullanılarak mikroplakalarda gerçekleştirilmiştir. RPMI 1640 besi yeri 2 kat konsantrasyonda hazırlanmış ve patojenik maya suşları besi yerine inoküle edilmiştir (5×10^3 hücre/ml). 0.1M Na_2HPO_4 pH 4.5 tamponunda konsantrasyonu 0.5-128 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde [Protein konsantrasyon lmleri Bradford metodu ile BSA (bovine serum albumin) standart kullanılarak yapılmıştır] hazırlanan protein zelteleri (100 μl), maya suşları ile inoküle edilmiş RPMI 1640 besi yeri ile (100 μl) karıştırılarak mikroplaka kuyucuklarına konmuştur. 25 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda, gözle görülür büyümenin bulunmadığı kuyucuklardaki panomyocin konsantrasyonu MİK-0, kontrol kuyucuğundakine göre büyümede % 50 inhibasyon olan kuyucuklardaki panomyocin konsantrasyonu da MİK-2 değeri olarak saptanmıştır. Gözle görülür büyüme olmayan kuyucuklardaki karışımdan alınan 30 μl rnek, PDA (%12,5 patates ekstresi, % 25 glukoz, % 20 agar pH, 5.5) petrilere inoküle edilmiş ve büyümenin olmadığı konsantrasyon MFK (minimum fungisidal konsantrasyon) olarak saptanmıştır.

1.2.1 Panomycocin'in patojenik mayalar üzerindeki hücre öldürme kinetiği

Öldürme-kinetik çalışmaları *C.albicans* ATCC 26555 ve *C. glabrata* ATCC 90030 suşları olmak üzere iki örnek suş üzerinde yapılmıştır. İki izolat içinde hücre yoğunluğu mililitrede 2×10^5 olan inokulum iki kat konsantre RPMI içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyondan alınan 5 ml, farklı konsantrasyonlarda panomycocin içeren $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-Na}_2\text{SO}_4$ citric acid pH 4.5 tampon çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu işlem de maya süspansiyonunu 1:2 oranında dilue ederek yaklaşık olarak mililitrede 10^5 başlangıç inokulasyonuna ulaşılmasını sağlamıştır. Test solüsyonlarındaki panomycocin konsantrasyonları test edilen izolatların 1, 2, 4 ve 8 katı MIC değerlerine eşit olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu solüsyonlar 30 C°'de çalkalanarak inkübe edilmişlerdir. Belirlenen zaman aralıklarında (0, 2, 4 ,8, 12, 24, 36, ve 48 saat), test edilen izolatın sisteme karıştırıldığı andan itibaren, 100 µl'lik solüsyon her bir test solüsyonundan alınmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra koloni sayımı için, 100 µl'lik örnek SDA (Sabourad Dextrose agar) petrilere (pH 7.0) yayılmış ve 35 C°'de 48 saat inkübe edilmiştir. 5 koloni alt limit olarak belirlenmiştir. Her bir suş için deney iki kere tekrar edilmiştir.

1.3. Panomycocin'in insan patojenik dermatofit türleri üzerindeki etki spektrumu tayini

Panomycocin'in dermatofit suşları üzerindeki antifungal etki spektrumu çalışmaları için 32 tane klinik izolat ve 9 tane standart suş kullanılmıştır. Standard suşlar: *Microsporum audouinii* DSMZ 10649, *Microsporum canis* DSMZ 10708, *Microsporum gypseum* DSMZ 3824, *Trichophyton rubrum* DSMZ 4167, *Trichophyton mentagrophytes* DSMZ 4870, *Trichophyton verrucosum* DSMZ 7380, *Trichophyton*

interdigitale DSMZ 12283, *Trichophyton equinum* DSMZ 12284, *Trichophyton tonsurans* DSMZ 12285.

Klinik izolatlardan: 7 tanesi *tinea capitis*'li hastalardan (5 *M.canis* ve 2 *T. tonsurans* izolatlardan), 2 tanesi *tinea faciei*'li hastalardan (*M.canis* izolatlardan), 3 tanesi *tinea corporis*'li hastalardan (1 *M. canis* ve 2 *M.gypseum* izolatlardan), 13 tanesi *tinea pedis*'li hastalardan (7 *T. rubrum*, 3 *T.mentagrophytes* ve 3 *T. interdigitale* izolatlardan) ve 7 tane *tinea unguium*'lu hastalardan (6 *T. rubrum* ve 1 *T. interdigitale* izolatlardan)

Klinik izolatlar İbni Sina Hastanesi (Ankara) ve Gülhane Askeri Tıp Akademisinden (Ankara), standart suşlar ise DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Saf halde izole edilen Panomycocin'in 41 dermatofit suşu üzerindeki antimikotik etki spektrumu ve MİK (Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu) çalışmaları CLSI'nin (Clinical and Laboratory Standards Institute), M38-A metodu (filamentöz mantarların sıvı dilusyon yöntemiyle antifungal duyarlılık testi referans metodu) baz alınarak yapılmıştır. Bu metod için besiyeri olarak RPMI-1640 kullanılmış ve çalışmalar mikropalakalarda gerçekleştirilmiştir.

Dermatofit suşlarının inokulum süspansiyonları PDA petrileri üzerinde 7-14 gün büyümüş kültürlerden hazırlanmıştır. Petriler yaklaşık 10 ml steril salin (%85) çözeltisiyle kaplanmış ve inokulum süspansiyonları petri yüzeyleri hafif kazınarak elde edilmiştir. Conidia ve hif parçalarını içeren bu süspansiyon daha sonra steril tüplere alınmış ve hiflerin çökmesi için 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üstte kalan süspansiyonun yoğunluğu geçirgenliği 530 nm de % 65-70 olacak şekilde spektrofotometrik olarak ayarlanmıştır. Bu süspansiyon 2 kat konsantre halde hazırlanmış RPMI-1640 besiyeri içerisinde, 50 kat dilue edilerek $1,2 \times 10^4$ - 6×10^4 CFU/ml olacak şekilde inokulum yoğunluğu hazırlanmıştır. İnokulum yoğunluğunun

doğruluğu 10 µl 100 kat dilue edilmiş inokulumun PDA petrilerine yayılmasıyla kontrol edilmiştir. Yüz mikrolitre inokulum, Na₂HPO₄ Na₂SO₄-citric acid, pH 4.5 tampon çözeltisi içinde yoğunluğu, 64-0,250 µg/ml olacak şekilde 2 katlı seri olarak dilüe edilmiş 100 µl panomycocin karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda mikropilaka kuyucukları istenilen konsantrasyonlarda besiyeri (1XRPMI -1640), panomycocin (32-0,125 µg/ml) ve inokulum yoğunluğu (0,6X10⁴ - 3X10⁴ CFU/ml) içermiştir. Herbir mikropilaka için panomycocin içermeyen büyüme kontrol kuyucuğu ve inokulum içermeyen sterilite kontrol kuyucuğu hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon plakaları 28°C de 7 gün inkübe edilmiştir. MİK değerleri büyüteç yardımıyla her bir kuyucuktaki büyüme inhibasyonunun, büyüme kontrol kuyucuğuyla karşılaştırılması sonucunda saptanmıştır. MİK değerleri şu şekilde tanımlanmıştır: MİK-0, %100 büyüme inhibasyonunun olduğu, MİK-2 ise büyümede %50 inhibasyonun olduğu kuyucuklara karşılık gelmektedir.

1.4. Panomycocin'in hasat sonrası turunçgillerde hastalıklara neden olan patojenik mantarlar üzerindeki etki spektrumu tayini:

Panomycocin'in antifungal aktivitesi turunçgil meyvelerinde hasat sonrası çürümeye neden olan 6 patojenik mantar üzerinde *in vitro* ve *in vivo* antifungal duyarlılık testleriyle test edilmiştir. Kullanılan standart suşlar DSMZ'den (German National Resource Center for Biological Material) temin edilmiştir. Standart suş olarak, *Alternaria citri* (DSMZ 62013), *Botrytis cinerea* (DSMZ 5145), *Colletotrichum gloeosporides* (DSMZ 62146), *Penicillium digitatum* (DSMZ 2776), *Penicillium italicum* (DSMZ 2756), *Phytophthora citrophthora* (DSMZ 62669) kullanılmıştır.

Antifungal duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere her bir mantar için spor suspansiyonundan oluşan inokulum hazırlanmıştır. Taze mantar kültürleri PDA

petrilerinde 1-2 hafta süreyle 25 C° de inkübe edilerek sporlanmaları sağlanmıştır. Inkübasyon süresi, geç sporlanan *Alternaria citri* ve *Phytophthora citrophthora* için uzatılmıştır. Spor süspansiyonunu elde etmek için mantar kültürleri % 0.05 Tween 80 içeren steril distile suyla kaplanmış, petri yüzeyi steril plastik özeyle hafifçe kazınarak sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Conidia ve hif parçalarını içeren bu süspansiyon daha sonra steril tüplere alınmış ve hiflerin çökmesi için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üstte kalan süspansiyon steril bir tübe alınıp kalan hiflerden arındırılmak için 11 µm'lik por çapına sahip naylon filtreden geçirilerek (Sartorius, Germany) süzölmüştür. Elde edilen bu spor süspansiyonunun konsantrasyonu 15 saniye vortekslendikten sonra hemositometre (Neubauer Improved Chamber, Brand, Germany) ile sayılarak bulunmuştur. Uygun dilusyonlar yapılarak testlerde istenen spor konsantrasyonları hazırlanmıştır. İnokulum yoğunluğunun doğruluğu 10 µl 100 kat dilue edilmiş inokulumun PDA petrilerine yayılmasıyla kontrol edilmiştir.

1.4.1. *In vitro* Antifungal Duyarlılık Testleri

Panomyocin'in hasat sonrası çürümelere neden olan mantarlar üzerindeki antifungal etki spektrumu agar difüzyon metodu ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

1.4.1.1. Agar Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Spektrum Tayini

Her bir mantar suşu için daha önce anlatıldığı gibi spor süspansiyonu hazırlanmış ve konsantrasyonu 2×10^4 spor /ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu spor süspansiyonlarından her mantar için 1 ml alınarak 20 ml erimiş SDA (pH 4.5 100mM Na₂HPO₄-sitrik asit tamponu içinde çözünmüş 1% Bacto-peptone, 2%

dextrose, 2% Bacto-agar) içine inokule edilmiş ve petrilere dökülmüştür. Her mantar suşu için ikişer adet SDA petrisi hazırlanmıştır. Bunlardan birine 50 µl (16µg/ml) panomycocin, diğerine (büyüme kontrol petrisi) ise 50 µl pH 4.5 100mM Na₂HPO₄-Na₂SO₄ sitrik asit tamponu damlatılmıştır. Panomycocin'in antifungal aktivitesi 25 C°de 5 gün inkübasyondan sonra, panomycocin damlatılan petrilere büyüme kontrol petrilere karşılaştırılması sonucu panomycocin damlatılan petrilere inhibasyon zonunun gözlenmesiyle tesbit edilmiştir.

1.4.1.2. Sıvı Mikrodilasyon Testleri

Panomycocin'in bitki patojeni 6 mantar suşu için MİK (Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu) değerlerinin tesbiti CLSI'nin (Clinical and Laboratory Standards Institute, önceki adıyla NCCLS) M38-A metodunun (filamentöz mantarların sıvı dilasyon yöntemiyle antifungal duyarlılık testi referans metodu) modifiye edilmesiyle mikropalakalarda (Nunclon 167008; Nunc, Denmark) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Panomycocin'in bu mantarlar üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkisi nicel olarak spektrofotometrik ölçüm yoluyla değerlendirilmiştir.

İnokulumlar daha önce açıklandığı gibi hazırlanmış, bitki patojeni mantarların spor renklerinin spektrofotometrik okumayı etkilemesinden dolayı CLSI' nin M38-A referans metodunda önerilen 530 nm'de spektrofotometrik ayarlama metodu yerine hemositometrede sporların sayılması yoluyla inokulum konsantrasyonları 4×10^5 - $\sim 50 \times 10^5$ olarak ayarlanmıştır. Bu spor suspansiyonları, 2 kat konsantre halde hazırlanan RPMI 1640 besiyeri içerisinde 50 kat dilue edilerek 0.8×10^5 CFU/ml inokulum yoğunluğuna ulaşılmıştır. İnokulum yoğunluğunun doğruluğu 10 µl, 100 kat dilue edilmiş inokulumun PDA petrilere yayılmasıyla kontrol edilmiştir. 100 µl

inokulum, Na₂HPO₄-citric acid pH 4.5 tampon çözeltisi içinde yoğunluğu 32-0,250 µg/ml olacak şekilde 2 katlı seri olarak dilüe edilmiş, 100 µl Panomycocin ile karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda mikropilaka kuyucukları istenilen konsantrasyonlarda besiyeri (1 X RPMI -1640), panomycocin (16-0,125 µgr / ml) ve inokulum yoğunluğu (5 X 10⁴ CFU /ml) içermiştir. Herbir mikropilaka için panomycocin içermeyen büyüme kontrol kuyucuğu ve inokulum içermeyen sterilite kontrol kuyucuğu hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon plakaları 25°C de 48 saat inkübe edilmiştir. MİK değerleri büyüteç yardımıyla her bir kuyucuktaki büyüme inhibisyonunun, büyüme kontrol kuyucuğuyla karşılaştırılması sonucunda saptanmıştır. Ayrıca her kuyucuktaki büyüme 48 saat boyunca 12 saat aralıklarla 492 nm de absorbans ölçümü yapılarak nicel olarak tesbit edilmiştir. Böylece Panomycocin'i içeren kuyucuklardaki büyüme spektrofotometrik yöntemle nicel olarak da büyüme kontrol kuyucuklarıyla karşılaştırılmıştır. Bunun için deney başlangıcında 492 nm'deki absorbans değerleri tesbit edilmiş ve background (arka plan) değeri olarak alınmıştır. Net büyüme her 12 saatlik zaman aralığındaki absorbans değerlerinden bu değerlerin çıkarılması yoluyla bulunmuştur. 48 saatin sonunda elde edilen absorbans değerleri farklı konsantrasyonlardaki Panomycocin'in patojen mantarlar üzerindeki % büyüme inhibisyon değerlerinin bulunmasında kullanılmıştır. % büyüme inhibisyon değerleri şu şekilde hesaplanmıştır: (Panomycocin içeren kuyucuğun absorbans değeri - background absorbans değeri) \ (Büyüme kontrol kuyucuğunun absorbans değeri - background absorbans değeri) X 100. Bu denklemden elde edilen her değer 100'den çıkarılarak Panomycocin'in her bir konsantrasyonu için % büyüme inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

MİK-0 değeri, optik olarak gözle görünür herhangi bir büyüme ya da bulanıklık olmayan ya da spektrofotometrik ölçümler sonucu % 100 büyüme inhibisyonunun tesbit edildiği kuyucuktaki Panomycocin konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. MİK-2 değeri ise % 50 büyüme inhibisyonunun olduğu kuyucuktaki protein konsantrasyonuna karşılık gelmektedir.

MİK-0 ve MİK-2 değerlerinin bulunması için % büyüme inhibisyon değerlerini 'x' değeri, Panomycocin'in konsantrasyonları 'y' değeri olarak kullanılarak doğrusal regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Panomycocin'in büyümeyi inhibe edici etkisi mikroskopik olarak da analiz edilmiştir. Farklı zaman aralıklarında Panomycocin'in farklı konsantrasyonunu içeren her kuyucuk inverted mikroskopla (Nicon, Melville, NY) incelenmiş ve büyüme kontrol kuyucuklarıyla karşılaştırılmıştır. Farklı görüntüler mikroskoba monte edilmiş fotoğraf makinesiyle (Kodak) çekilmiştir.

1.4.2. *In vivo* Antifungal Duyarlılık Testleri

Panomycocin'in *in vivo* antifungal aktivitesi, *in vitro* antifungal duyarlılık testlerinde Panomycocin'e duyarlı olduğu bulunan mantar suşları (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*) üzerinde test edilmiştir.

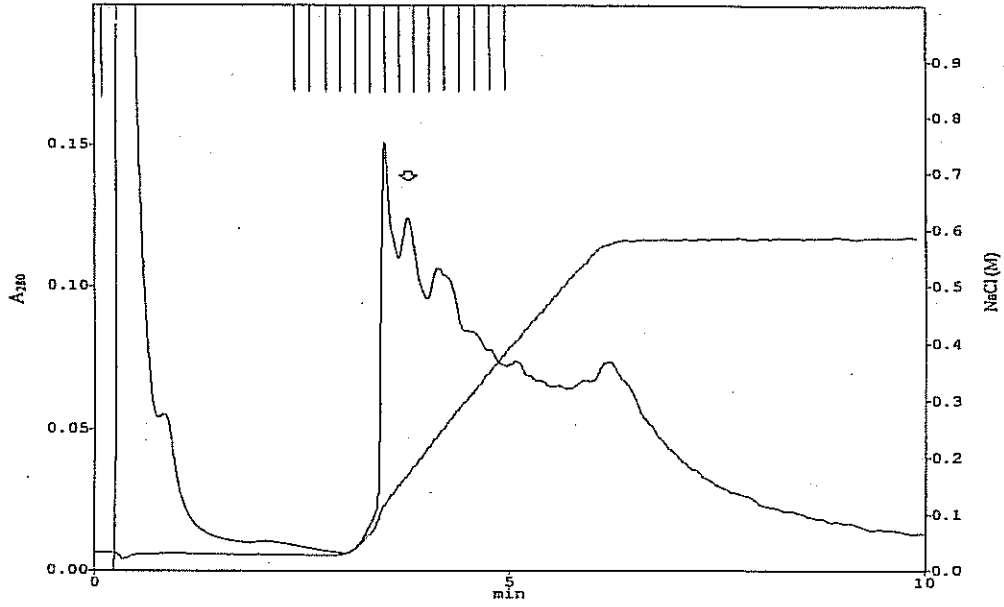
Deneyler taze, herhangi bir antifungal muamele edilmemiş organik limonlarda gerçekleştirilmiştir. Öncelikle limonlar 5 dakika boyunca % 10 'luk hypochloride içeren solüsyonda bekletilerek yüzeylerinin sterilizasyonu sağlanmıştır. Üç defa bol miktarda distile suyla yıkanmışlar ve kuruduktan sonra % 70 ethanolle muamele edilmişlerdir. Tekrar kurumaları ve ethanolun uçması için 5 dakika beklenmiştir. Steril pipet ucuyla limon yüzeylerinde üçer delik açılmıştır.

Mantar suşlarının spor suspansiyonları daha önce açıklandığı gibi hazırlanmış, spor konsantrasyonları denenen *Penicillium sp.* ve *Botrytis cinerea* suşları için 10^5 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril ependorf tüplerinde eşit hacimdeki spor suspansiyonu ile Panomycocin (MİK değerinin 2 katına karşılık gelen konsantrasyonda, 32 µg/ml) karıştırılmıştır. Büyüme kontrol grubundaki limonlar için ise steril ependorf tüplerinde eşit hacimdeki spor suspansiyonu ile pH 4.5, 100 mM Na₂HPO₄-sitrik asit tamponu karıştırılmıştır. Bu ependorflardan 10 µl 'lik örnek limon yüzeylerinde açılan deliklerin içine inokule edilmiştir. Her işlem 3 ayrı limon üzerinde tekrarlanmıştır. Limonlar 20 ° C 'de yüksek nemde inkübe edilmiştir. Deneyler 3 kere tekrarlanmıştır.

BULGULAR

2.1. Panomycocin'in, saflaştırılması

Panomycocin'ce zenginleştirilmiş ve tampon çözelti değişimi yapılmış olan ham protein anyon değiştirme kromatografisine tabi tutulmuştur. Panomycocin 120 mM NaCl konsantrasyonunda elue edilmiştir (Şekil 1). Elde edilen panomycocin toplanmış ve 5 kDa ultrafiltreler kullanılarak konsantre edilmiştir.



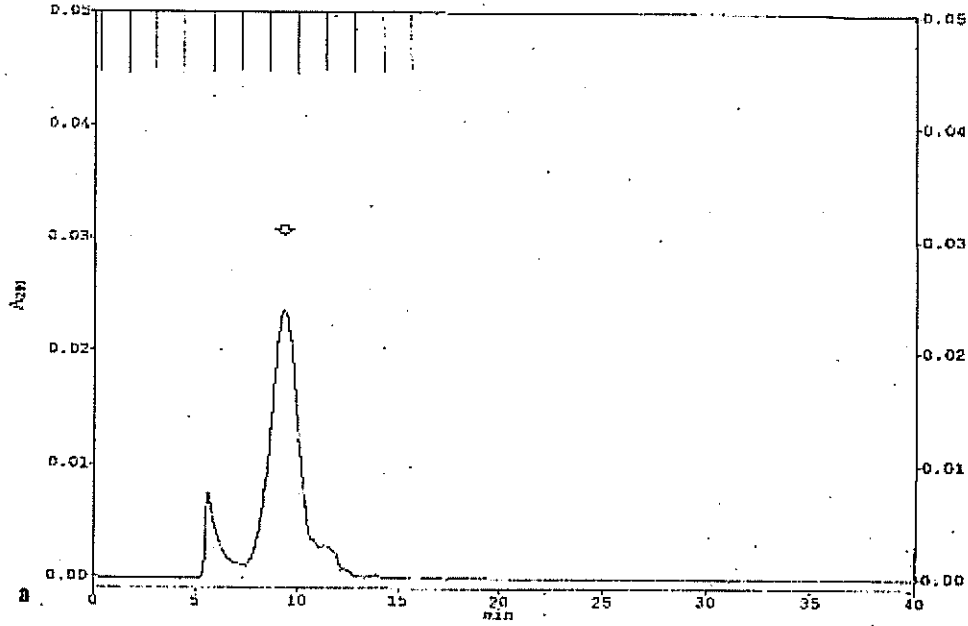
Şekil 1. Panomycocin'in anyon değiştirme kolonundaki elüsyon profili.

Kolon apı: 4,6 mmD/100mL; örnek hacmi: 750 µl; Başlangıç tamponu: 30 mM N-methyl piperazine- HCl pH:4,8; Gradient: 0-500 mM NaCl

Akış hızı: 10 ml/dak.;

Ok, Panomycocin'i içeren piki göstermektedir.

Anyon değiştirme kromatografisinden alınan panomycocin ileriki saflaştırma için jel filtrasyon kromatografisine tabi tutulmuştur. Panomycocin 8.5 ml 'de elue edilmiştir (Şekil 2). Elde edilen panomycocin 5 kDa filtreler kullanılarak konsantre edilmiştir.



Şekil 2, Panomycocin'in jel filtrasyon kolonundaki elüsyon profili

Kolon çapı:7.5 mmD / 300 mL; Örnek hacmi: 40 µl;

Elüsyon tamponu: 0.1M Na₂HPO₄ pH 4.5 + 0.1 M Na₂SO₄; akış hızı: 1 ml/dak;

Ok, Panomycocin'i içeren piki göstermektedir

2.2. Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki *in vitro* etki spektrumu tayini

Test edilen patojenik maya türlerinin hücre duvarları β-1,3-glukan yapısı içerdiğinden, Panomycocin'in test edilen bütün suşlar üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Tablo 1). Test edilen suşların hücre duvarındaki farklı β-1,3-glukan oranları panomycocin'e olan duyarlılıklarını belirlemiştir.

Tablo 1. Panomycocin'in patojenik maya türleri üzerindeki NCCLS M27-A metoduna göre tayin edilen MİK-2 ,MİK-0 ve MFK değerleri.

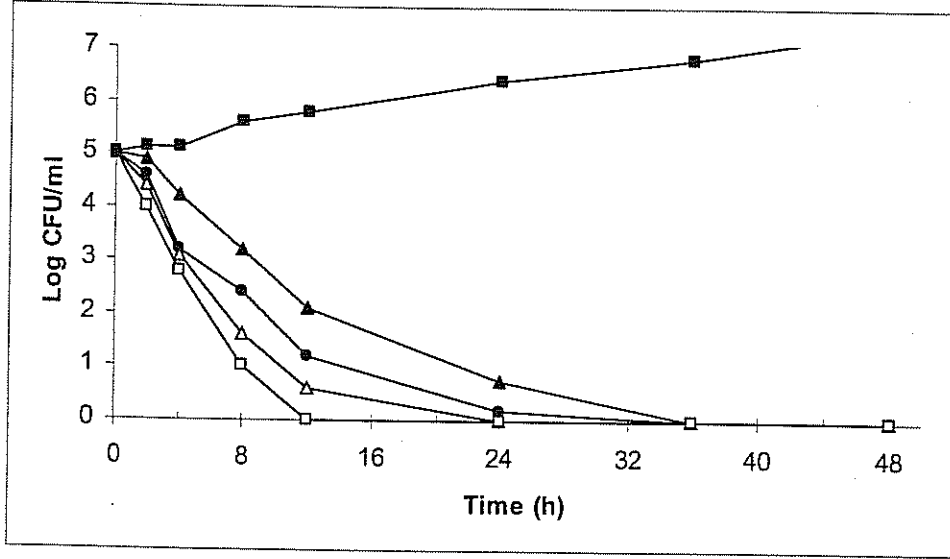
SUŞ	SUŞ NO KAYNAK	İZOLASYON	MİK-2 µg/ml	MİK-0 µg/ml	MFK µg/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 2730	Candidademia	2	4	8
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Bronchomycosis	0.5	2	2
<i>C. albicans</i>	ATCC 26555	Mucocutoneus candidiasis	1	4	4
<i>C. albicans</i>	ATCC 36802	İnsan	2	4	8
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	İnsan kanı	2	4	8
<i>C. albicans</i>	DSMZ 3454	Vajinal candidiasis	1	2	2
<i>C. albicans</i>	A1	Flukanazole dirençli bronchomycosis	0.5	2	4
<i>C. albicans</i>	A2	Azol dirençlibronchomycosis	2	4	4
<i>C. albicans</i>	A3	İnsan kanı	0.5	2	8
<i>C. albicans</i>	A4	Vajinal candidiasis	1	4	4
<i>C. albicans</i>	A5	Vajinal candidiasis	0.5	2	2
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	İnsan kanı	1	2	8
<i>C. parapsilosis</i>	A6	İnsan kanı	0.5	1	4
<i>C. krusei</i>	ATCC 14053	İnsan kanı	4	8	32
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	Bronchomycosis	4	8	32
<i>C. krusei</i>	A7	İnsan kanı	2	4	32

<i>C. krusei</i>	A8	Bronchomycosis	4	8	32
<i>C. guilliermondii</i>	A9	İnsan kanı	1	2	4
<i>C. guilliermondii</i>	A10	Bacak	2	4	4
<i>C. guilliermondii</i>	A11	Bronchomycosis	1	4	8
<i>C. guilliermondii</i>	A12	İnsan kanı	0.5	1	2
<i>C. guilliermondii</i>	A13	Bronchomycosis	1	2	4
<i>C. pseudotropicalis</i>	A14	Cutoneus candidiasis	0.25	1	1
<i>C. tropicalis</i>	A15	Abse	0.5	1	2
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	İnsan kanı	0.25	0.5	1
<i>S. cerevisiae</i>	A16	İnsan	0.25	0.5	1

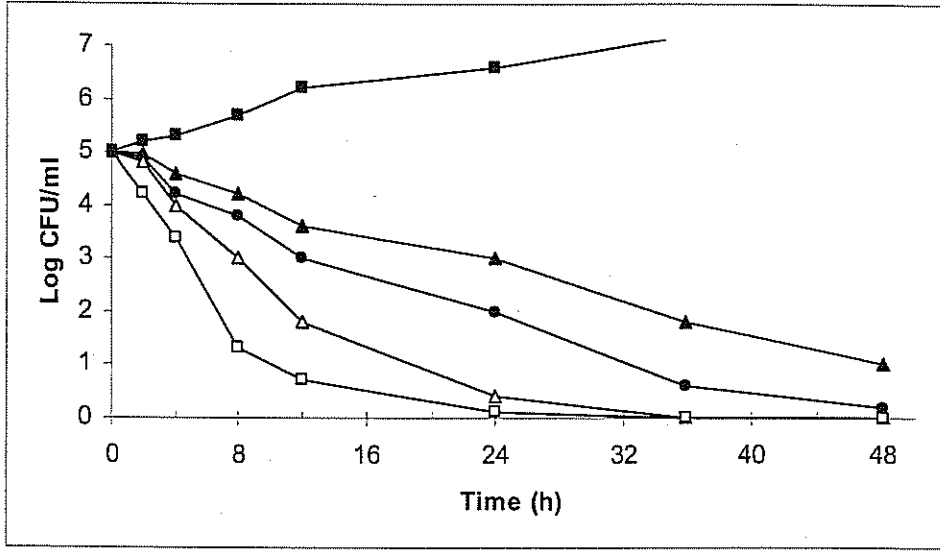
2.2.1. Panomycocin'in insan patojenik maya türleri üzerindeki öldürme kinetiği

Panomycocin'in hücre öldürme kinetik çalışmaları iki farklı örnek suş, *C.glabrata* (ATCC 90030) ve *C.albicans* (ATCC 26555) üzerinde yapılmıştır. Her iki suş içinde 4XMIC değerinde 12 saat içerisinde koloni sayısındaki azalma 3 log ünitesinden fazla idi (99%). Panomycocin'in öldürme kinetiği suşa bağımlı olarak farklılıklar gösterdi. *C.glabrata* suşu en yüksek MİK değerinde 12 saat içerisinde, *C.albicans* suşu ise en

yüksek MİK değerinde 24 saat içerisinde tam olarak inhibe olmuştur Panomycocin'in *C. glabrata* suşu üzerindeki öldürme etkisi diğer suşa göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Yapılan deney sonuçları panomycocin'in konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak öldürme kinetiğinin arttığını göstermiştir.



Şekil 3. Panomycocin'in *C.glabrata* (ATCC 90030) suşu üzerinde farklı konsantrasyonlarındaki (▲0,5, ●1, △ 2, □ 4 µg/ml) öldürme kinetiği. ■, büyüme kontrolü



Şekil 4. Panomycocin'in *C.albicans* (ATCC 26555) suşu üzerinde farklı konsantrasyonlarındaki (▲4, ●8, △ 16, □ 24 µg/ml) öldürme kinetiği. ■, büyüme kontrolü

2.3. Panomycocin'in insan patojenik dermatofit türleri üzerindeki etki spektrumu

Panomycocin'in büyüme inhibasyon etkisi standart dermatofit suşları ve farklı klinik izolatlar olmak üzere toplam 41 suş üzerinde denenmiştir. İzolatların MİK değerleri hem 5. günde hem de 7. günde belirlenmiş ve iki farklı okuma zamanında saptanan bu değerlerin her bir suş için aynı olduğu görülmüştür. Test edilen tüm standart suşların ve klinik izolatların panomycocin'e duyarlı olduğu bulunmuştur. Tablo 2'de panomycocin'in 41 dermatofit izolatı üzerindeki MİK-0 ve MİK-2 değerleri verilmiştir. *T.verrucosum* ve *T.tonsurans* suşları panomycocin'e en duyarlı suşlar olarak bulunmuştur.

Tablo 2. Panomycocin'in test edilen 41 dermatofit izolatı üzerindeki MİK-0 ve MİK-2 değerleri

Test edilen türler	Suş sayısı	MİK-2 (µg / ml)	MİK-0 (µg / ml)
<i>Microsporum audouinii</i>	1	1	2
<i>Microsporum canis</i>	9	2	8
<i>Microsporum gypseum</i>	3	0,5	2
<i>Trichophyton equinum</i>	1	1	2
<i>Trichophyton interdigitale</i>	5	2	4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4	1	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	14	1	4
<i>Trichophyton tonsurans</i>	3	0,5	1
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	0,25	1

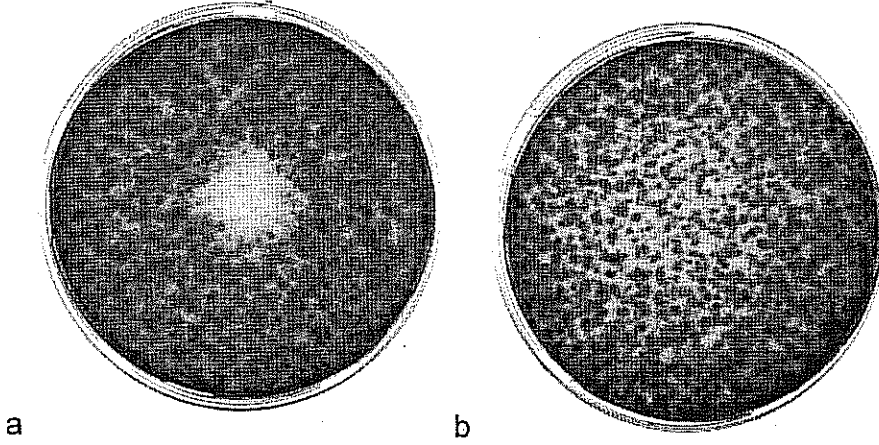
2.4. Panomycocin'in turunçgillerde hasat sonrası hastalık yapan mantar türleri üzerindeki antifungal etkileri

2.4.1. In vitro testler

2.4.1.1. Agar-difüzyon yöntemi

Botrytis cinerea, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*' un spor suspansiyonunu içeren SDA petrilerinde panomycocin'in damlatıldığı yerde belirgin inhibasyon zonları gözlenmiştir. Bu inhibasyon zonlarının çapları *Botrytis cinerea* , *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* için sırasıyla 15, 10, 12 mm olarak ölçülmüştür. Sadece Na₂HPO₄+Na₂SO₄ citric acid pH 4.5 tampon çözeltisi damlatılan kontrol petrilerinde herhangi bir inhibasyon zonu oluşmamıştır (Şekil 5). *Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Phytophthora citrophthora*' nın spor

süspansiyonlarını içeren petrilerde panomycocin'in damlatıldığı bölgede herhangi bir inhibasyon zonu gözlenmedi.



Şekil 5. Panomycocin'in *Botrytis cinerea* spor süspansiyonunu içeren SDA petrileri üzerindeki antifungal etkisinin tayini

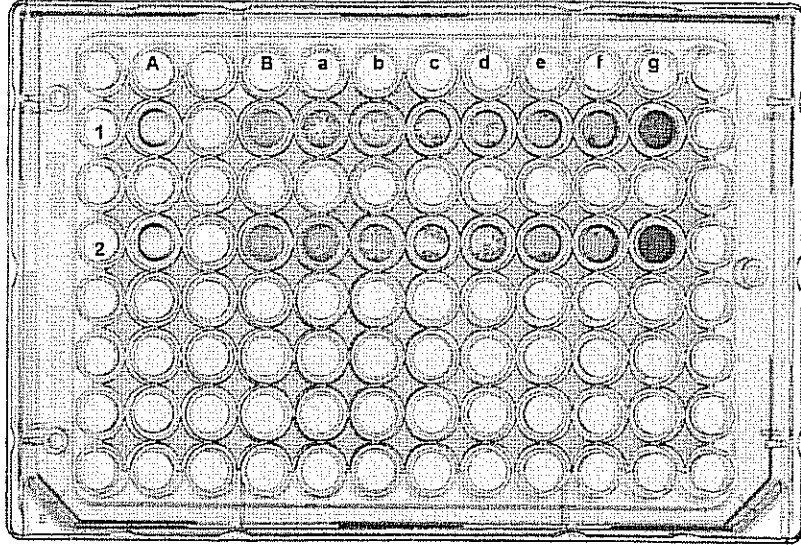
- a) Üzerine 50 µl (16 µg/ml) Panomycocin damlatılan SDA petrisi
- b) Üzerine 50 µl 100 mM Na₂HPO₄-sitrik asit tamponu damlatılan büyüme kontrol petrisi

2.4.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Test edilen suşlardan *Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Phytophthora citrophthora*'nın Panomycocin'in antifungal aktivitesine duyarlı olmadığı bulunmuştur. Bu suşlar için hazırlanan mikrolakalarda büyüme kontrol kuyucuğu ile panomycocin içeren kuyucuklarda hem spektrofotometrik hem de büyüteç yardımı ile yapılan analizler sonucunda hiçbir farklılık gözlenmedi. Sterilite kontrol kuyucukları dışında tüm kuyucuklarda büyüme gözlemlendi.

Test edilen diğer üç suşun; *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* ve *Botrytis cinerea*'nin panomycocin'e duyarlı olduğu görüldü. 25 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda, bu suşlar için hazırlanan mikrolakaların 16 µg/ml protein

içeren ilk kuyucuğunun optik olarak berrak, büyüme kontrol kuyucuklarının ise oldukça bulanık olduğu, azalan protein konsantrasyonuna bağlı olarak büyümenin belirtisi olarak bulanıklığın arttığı gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6. Mikroplakada Sıvı Dilusyon Yöntemiyle *Penicillium sp* Suşlarının panomycocin'e Duyarlılıkları

Ok MIK değerini (optik olarak berrak kuyucuklar) göstermektedir. (Kuyucuğun daha koyu gözükmesinin nedeni panomycocin'in 16µg/ml konsantrasyonundaki renginden kaynaklanmaktadır)

Protein konsantrasyonları;

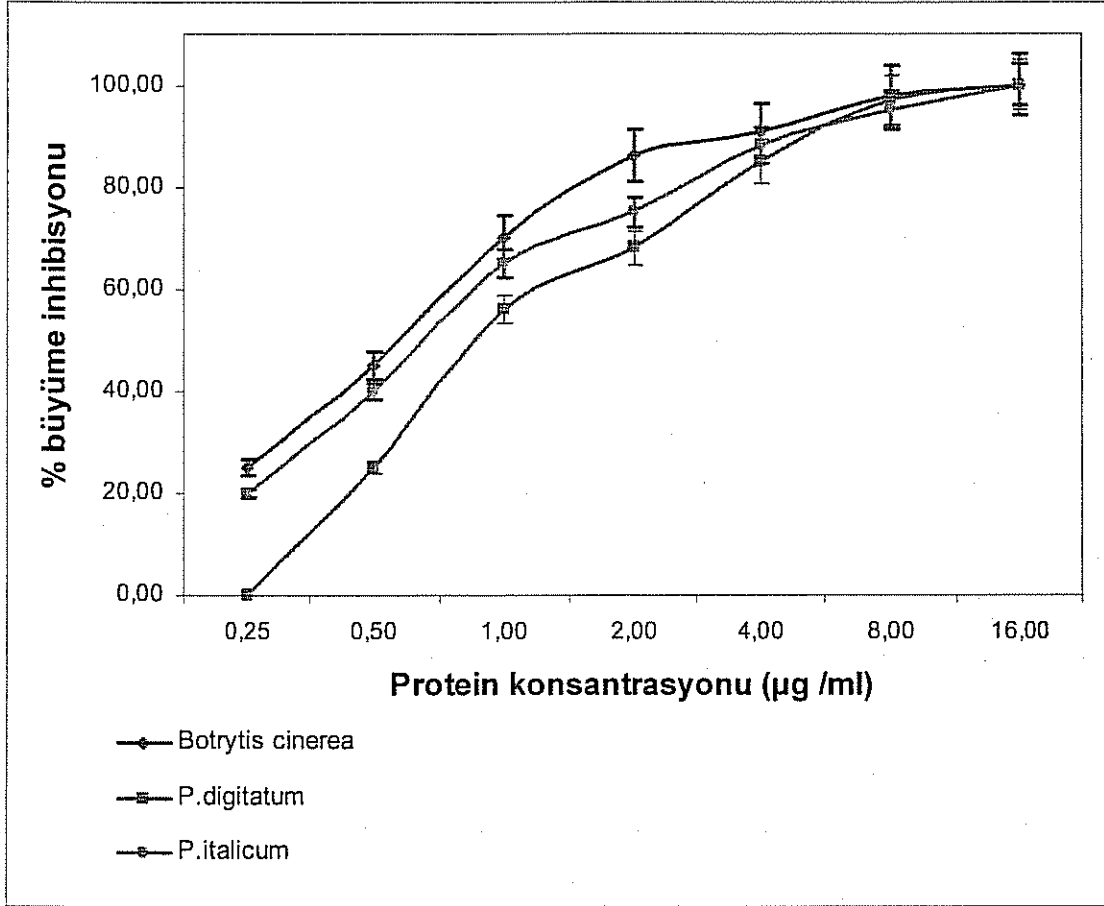
- | | | | |
|---------------|--------------|------------|-------------|
| a) 0.25 µg/ml | b) 0.5 µg/ml | c) 1 µg/ml | |
| d) 2 µg/ml | e) 4 µg/ml | f) 8 µg/ml | g) 16 µg/ml |

1) *Penicillium italicum* MIC: 16 µg/ml

2) *Penicillium digitatum* MIC: 16µg/ml

A) Sterilite kontrol kuyucuğu B) Büyüme kontrol kuyucuğu

MİK-0 ve MİK-2 değerlerinin bulunması için % büyüme inhibisyon değerlerini x değeri, K5-tipi maya öldürücü proteininin konsantrasyonları y değeri olarak kullanılarak doğrusal regresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 7).



<i>P. digitatum</i>	$y = 16,893x - 6$	R2 = 0,9421
<i>P. italicum</i>	$y = 13,321x + 15,714$	R2 = 0,9389
<i>Botrytis cinerea</i>	$y = 12,571x + 23,286$	R2 = 0,8955

Şekil 7. Panomycocin'in *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* üzerindeki *In vitro* inhibe Edici Aktivitesi

Veriler 48 saat inkübasyon süresi sonunda Panomycocin'in her konsantrasyonundaki ortalama % büyüme inhibisyonu \pm SD şeklinde gösterilmiştir.

MİK-0 ve MİK-2 değerleri üç kere tekrarlanan deneylerin ortalama sonuçları \pm SD olarak hesaplanmış ve Tablo 3 ' de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hasat Sonrası Turunçgillerde Hastalık Yapan Mantar Suşlarının Panomycocin'e Duyarlılıkları (MİK-0 ve MİK-2 Değerleri)

Suş	Suş no	MİK-2 $\mu\text{g/ml}$	MİK-0 $\mu\text{g/ml}$
<i>Botrytis cinerea</i>	DSMZ 5145	2,1	16
<i>Penicillium digitatum</i>	DSMZ 2776	3,3	16
<i>Penicillium italicum</i>	DSMZ 2756	2,6	16
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	DSMZ 62146	*	*
<i>Alternaria citri</i>	DSMZ 62013	*	*
<i>Phytophthora citrophthora</i>	DSMZ 62669	*	*

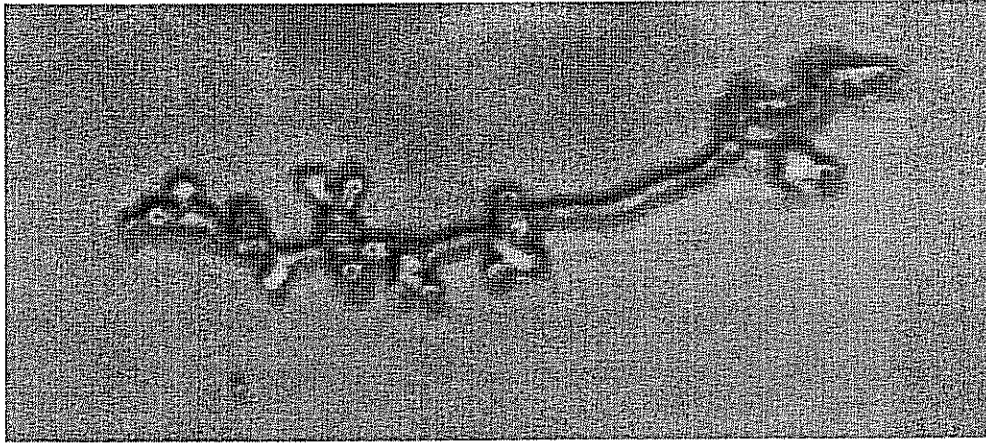
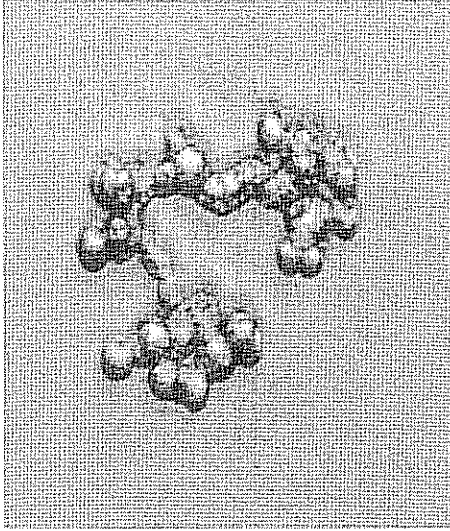
*Büyümeyi inhibe edici etki gözlenmedi.

Panomycocin'in büyüme inhibe edici etkisi mikroskopik olarak da analiz edilmiştir. Farklı zaman aralıklarında panomycocin'in farklı konsantrasyonunu içeren her kuyucuk inverted mikroskopla (Nicon, Melville, NY) incelenmiş ve büyüme kontrol kuyucuklarıyla karşılaştırılmıştır. Farklı görüntüler mikroskoba monte edilmiş fotoğraf makinesiyle (Kodak) çekilmiştir.

İnkübasyondan 18 saat sonra 16 µg/ml konsantrasyonunda Panomycocin (MİK değerinde) içeren kuyucukta, protein içermeyen büyüme kontrol kuyucuğuyla karşılaştırıldığında spor germinasyonunun etkili bir şekilde inhibe edildiği gözlemlendi.

MİK değerinden daha düşük konsantrasyonda protein içeren kuyucuklarda spor germinasyonunda dikkat çekiçi azalma, spor germinasyon sürecinde ve germ tüp uzamasında anormallikler gözlemlenmiştir. Sporların panomycocin ile muamelesi daha yavaş germ tüp uzamasına, misellerin çok dallanmasına ve hif, spor ve misellerde morfolojik farklılıkların gözlenmesine neden olmuştur (Şekil 8, 9,10).

A



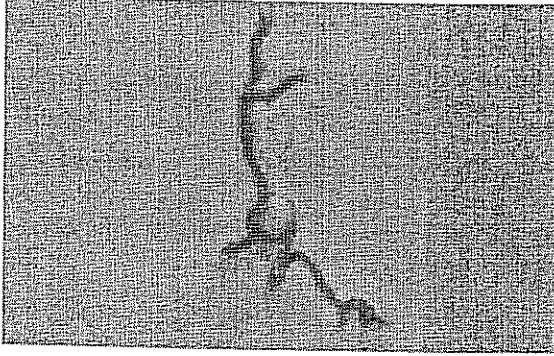
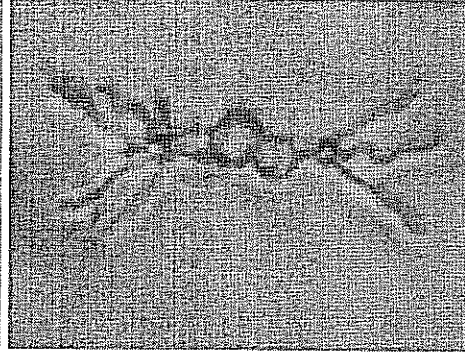
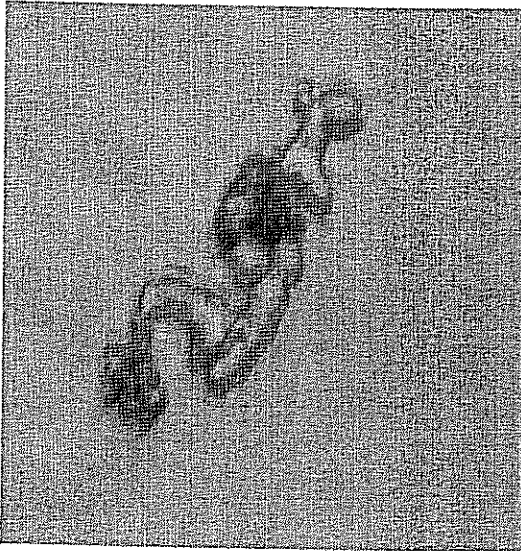
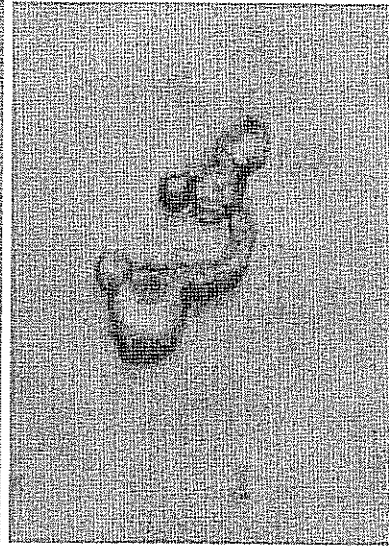
B

Şekil 8. Panomycocin tarafından *Botrytis cinerea'* nin Germ Tüp Uzamasının Azaltılması.

A) 4µg/ml konsantrasyonundaki panomycocin Germ tüp uzamasında azalmaya neden olmaktadır.

B) Panomycocin ile muamele edilmeyen sporların uzun germ tübe sahip oldukları gözlenmiştir.

Fotoğraflar inkübasyondan 24 saat sonra çekilmiştir.

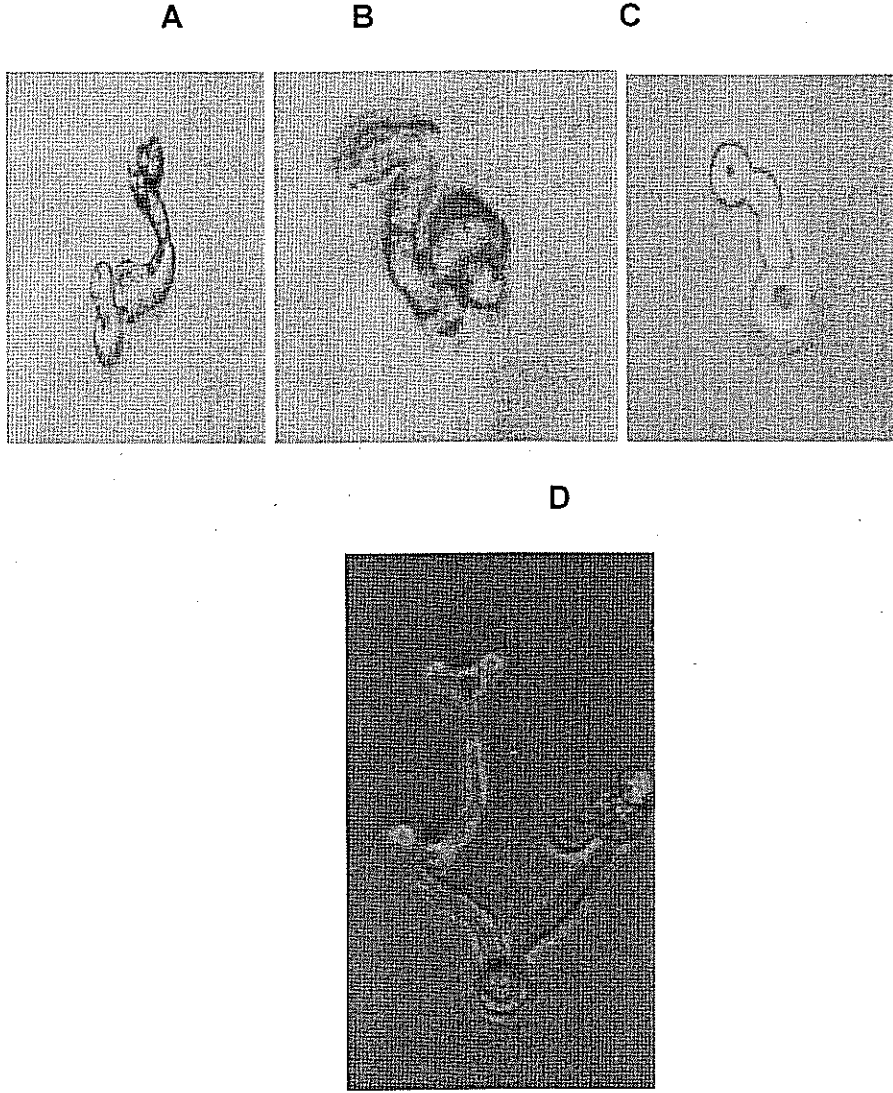
A**B****C****D**

Şekil 9. Panomycocin ile inkübe edilen *Penicillium italicum*' un sporlarında gözlenen farklılıklar

A-B) Panomycocin içermeyen kuyucuklarda (büyüme kontrol kuyucuklarında) sporların normal olarak germine oldukları ve uzun, ince germ tübe sahip oldukları gözlenmiştir.

4 µg/ml konsantrasyonundaki panomycocin C) germ tüp uzamasını inhibe etmiş ve D) anormal şişmeye neden olmuştur.

Fotoğraflar 24 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir.



Şekil 10. Panomycocin'in *P. digitatum* 'un germ tüp uzaması üzerindeki etkisi.

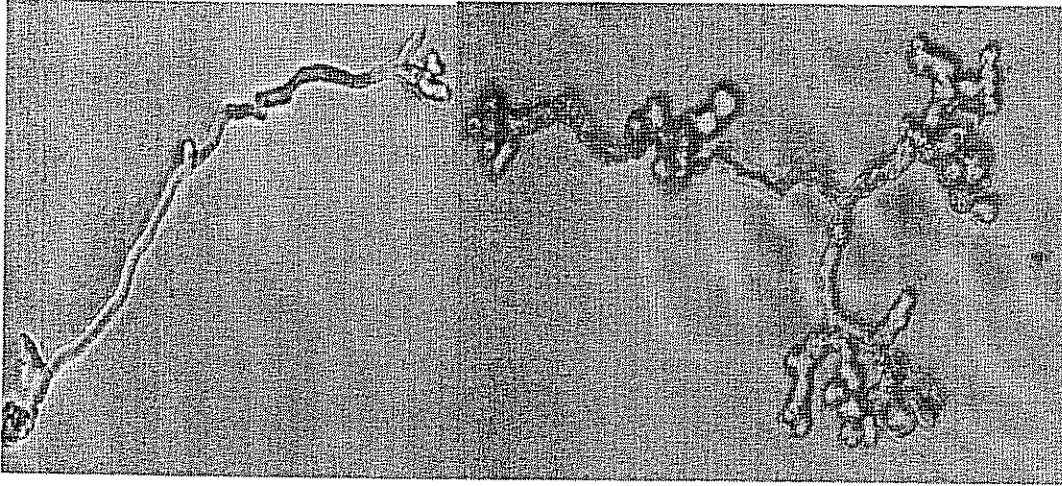
A-C) Panomycocin (4 μg /ml) içeren kuyucuklarda normalden ŐiŐkin, kısa germ tüpe sahip birkaç spor gözlendi. D) Panomycocin içermeyen kuyucuklarda uzun germ tüpe sahip bir çok spor gözlendi.

Fotoğraflar 24 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir.

MİK değerinden daha düşük konsantrasyonda panomycocin içeren kuyucuklarda büyüme kuyucuklarındakine nisbeten hif yapısının genellikle kısa olduğu gözlenmiştir. Gözlenen hifler uzun olduklarında ise büyüme kuyucuklarındakilerle karşılaştırıldıklarında apikal veya merkezi bölgelerinde dikkat çeken boğumlanmalar, hif duvarlarının pürüzlü olması gibi morfolojik farklılıklar göstermişlerdir (Şekil 11).

A

B

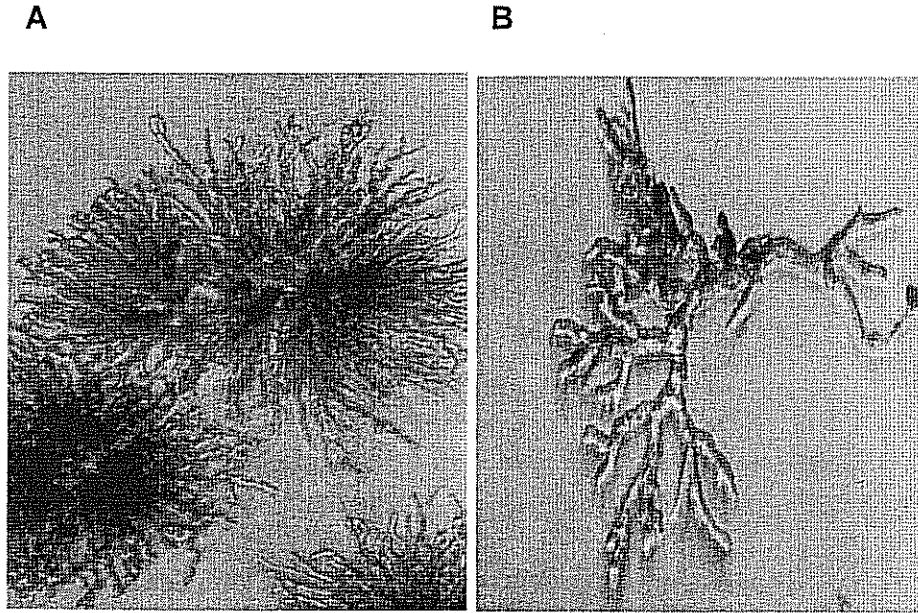


Şekil 11. Panomycocin'in *Botrytis cinerea* 'nın hif yapısı üzerindeki etkileri

A) Panomycocin içermeyen büyüme kuyucuklarında düzgün, pürüzsüz bir yüzeye sahip, uzun hifler

B) Panomycocin içeren (4 µg/ ml konsantrasyonunda) kuyucuklarda pürüzlü yüzeye sahip, boğumlanmış, büyüme kontrolü kuyucuklarındakine göre yeterince uzayamamış kısa hif yapısı gözlenmiştir. Fotoğraflar 24 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir.

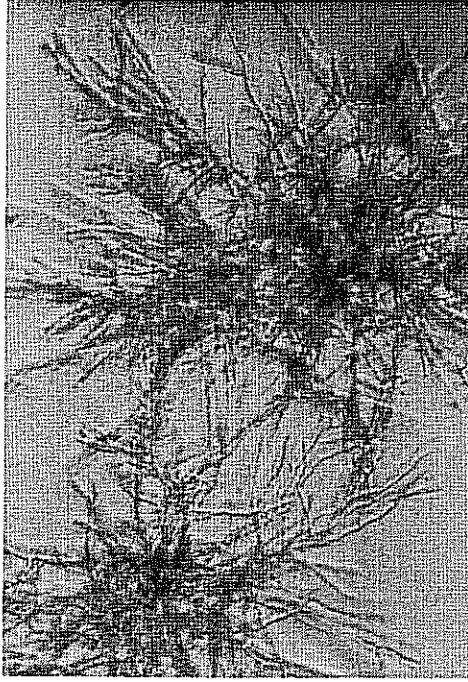
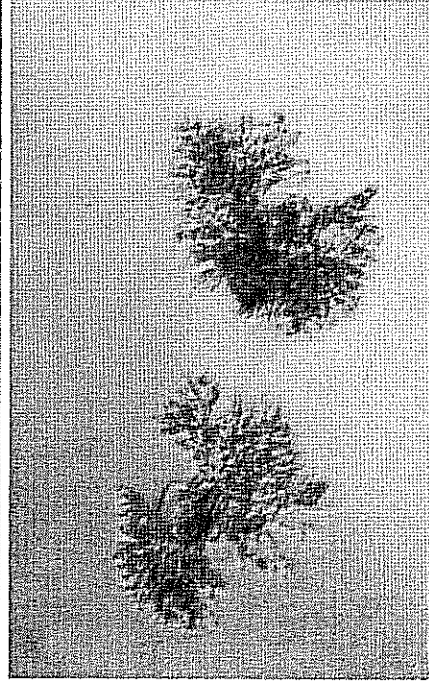
Panomycocin'in *B. cinerea*, *P. digitatum* ve *P. italicum*' un misel yapıları üzerinde de etkili olduğu gözlenmiştir. Büyüme kontrol kuyucuklarındaki uzun, ince, çok sayıda dallanma yapan misellerle karşılaştırıldığında, Panomycocin (MİK konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonlarda) içeren kuyucuklarda iyi uzayamamış, kısa, kalın hiflerden oluşan miselyel büyüme görülmüştür (Şekil 12,13,14).



Şekil 12. Panomycocin'in *B. Cinerea'nın* miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.

A) Büyüme kontrol kuyucuklarında ince, uzun, tüm kuyucuk yüzeyini saran miselyel büyüme gözlenmiştir.

B) Panomycocin'in (4 µg/ ml konsantrasyonunda) miselyel büyümeyi inhibe etmiş, kısa, kalın, uzayamamış hiflere neden olmuştur. Fotoğraflar 48 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir.

A**B**

Şekil 13. Panomycocinin *P.italicum*'un miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.

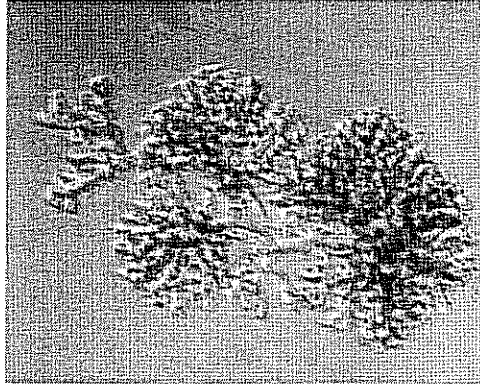
A) Büyüme kontrol kuyucuklarında (panomycocin içermeyen) ince, uzun, tüm kuyucuk yüzeyini saran miselyel büyüme gözlenmiştir.

B) Panomycocin (4 µg/ ml konsantrasyonunda) miselyel büyümeyi inhibe etmiş, kısa, kalın, uzayamamış hiflere neden olmuştur. Fotoğraflar 48 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir

A



B



Şekil 14. Panomycocin'in *P. digitatum*'un miselyel büyümesi üzerindeki etkisi.

A) Panomycocin içermeyen büyüme kontrol kuyucuklarında tüm kuyucuğu saran, uzun miseller gözlenmiştir.

B) Panomycocin (4 µg/ ml konsantrasyonunda) miselyel büyümeyi inhibe etmiş, üzüm salkımı görünümündeki çok sayıda, kısa, kalın, yoğun hif yapılarına neden olmuştur.

Fotoğraflar 48 saat inkübasyondan sonra çekilmiştir

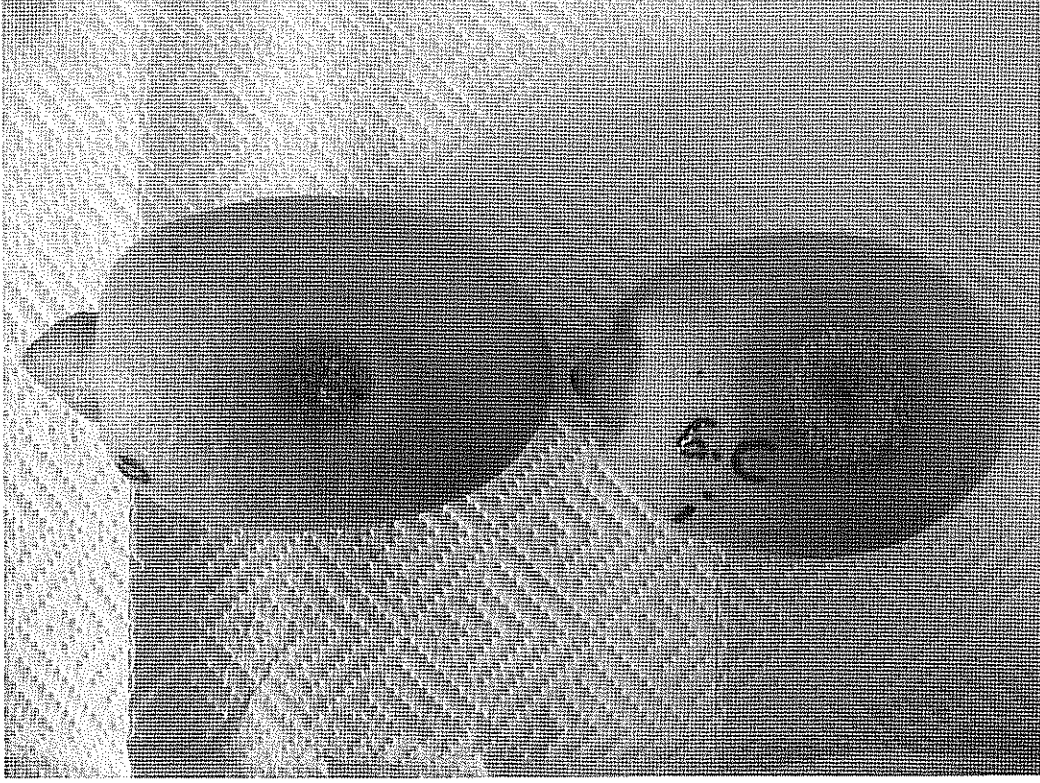
2.4.2. *in vivo* testler

İkinci günün sonunda tüm limonların delik açılan yüzeylerinde yumuşama gözlenmiştir. Dördüncü günün sonunda ise büyüme kontrol limonlarında (spor suspansiyonu ile pH 4.5 100 mM Na₂HPO₄-Na₂SO₄ sitrik asit, pH 4.5 tamponu karışımı ile inokule edilen limonlarda) tüm delik açılan bölgelerin enfekte olduğu, buna karşın spor suspansiyonu ile panomycocin karışımıyla inokule edilen limonlarda hastalık semptomlarının oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 15, 16, 17).



Şekil 15. Limon üzerinde panomycocin'in *Botrytis cinerea* 'ya karşı *in vivo* antifungal aktivitesi

Eşit hacimde spor suspansiyonu ve panomycocin karışımıyla inokule edilen sol taraftaki limon herhangi bir hastalık belirtisi göstermemiştir. Sağ taraftaki büyüme kontrol limonu (spor suspansiyonu ile 100 mM Na₂HPO₄-sitrik asit pH 4.5 tamponu karışımı ile inokule edilen limon) ise büyük, bol miktarda sporlanma gösteren lezyonlar göstermiştir.



Şekil 16. Limon üzerinde panomycocin'in *P.italicum* 'a karşı *in vivo* antifungal aktivitesi

Spor suspansiyonu ile inokule edilen panomycocin limon yüzeyinde (soldaki limon) *P.italicum* 'un büyümesini ve sporlanmasını inhibe etmiştir. Sağ taraftaki büyüme kontrol limonunda (spor suspansiyonu ile 100 mM Na₂HPO₄-sitrik asit pH 4.5 tamponu karışımı ile inokule edilen limon) ise hastalık semptomları gözlenmiştir.



Şekil 17. Limon üzerinde panomyocin'in *P. digitatum* 'a karşı *in vivo* antifungal aktivitesi

Spor suspansiyonu ile inokule edilen panomyocin limon yüzeyinde (soldaki limon) *P. digitatum* 'un büyümesini ve sporlanmasını inhibe etmiştir. Sağ taraftaki büyüme kontrol limonunun (spor suspansiyonu ile 100 mM Na₂HPO₄-sitrik asit , pH 4.5 tamponu karışımı ile inokule edilen limon) ise enfekte olduğu ve büyük lezyonlara sahip olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA / SONUÇ

Günümüzde insanlarda maya ve/veya mantara bağlı enfeksiyonların yaygınlığında çok büyük bir artış görülmektedir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda bu tip enfeksiyonlar ciddi lezyonlara hatta ölümlere yol açmaktadır (Venkatesan et.al., 2005; Wingard J.R.). Günümüzde bu tip enfeksiyonların tedavisinde kullanılan amfoterisin B, flukanazol, itrakanazol ve nistatin gibi etkin maddeler uygulandıkları hastalarda, hepatoksisite, gastrointestinal bozukluklar gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu tip etkin maddeler ökaryotik hücrelerin membran yapısını bozarak, enfekte olmuş organizmaya da zarar vermektedirler (Hector, 1993). Bunun yanında kısa süreli uygulamalarda bile patojen mikroorganizmalar söz konusu etkin maddelere karşı direnç kazanmaktadır ve dirençlilik diğer mikroorganizmalara da yayılmakta ve diğer patojenlerin tedavisinde de büyük sorunlar yaratmaktadır (Cameron et.al. 1993; Chavenet et.al. 1994). Bu nedenlerle yüksek seçici özelliğe sahip, patojen mikroorganizmalarla enfekte olmuş konukcu organizmaya zarar vermeden sadece patojen mantarlara ve mayalara karşı etkili, patojen mikroorganizmaların direnç geliştiremeyeceği, doğal olarak elde edilmiş etkili ve güvenli antifungal ajanların geliştirilmesi çok büyük önem kazanmıştır. Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda *P.anomala* suşunun öldürücü etkisinden sorumlu olan K5 tipi öldürücü toksinin, panomycocin, biyokimyasal karakterizasyonu sonucunda bu toksik proteinin tıp ve gıda alanında kullanım için uygun sıcaklık ve pH şartlarında aktivitesini koruyan bir exo β -1,3-glukanaz olduğu bulunmuştur. Panomycocin'in hücre duvarlarındaki β -1,3 glukan yapısını hidrolize etme özelliği, bu proteinin seçici bir antimikotik ajan olarak kullanım olasılığını önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu nedenle panomycocin'in insanlarda hastalık yapan maya ve mantarlara (dermatofitler) karşı öldürücü etki tayinleri yapılmıştır.

Bu çalışmada 26 patojenik maya izolatının panomycocin'e duyarlılığı test edilmiştir. İzolatlar American Type Culture Colection (ATCC)'den alınan standart suşların yanında hastalardan izole edilen suşlardır. Hastane izolatlarından iki tanesi azol gruplarına karşı dirençli olan *C.albicans* suşlardır. Yapılan çalışmada bütün suşlar için minumum büyüme önleyici konsantrasyon değerlerinin (MİK) yanında minumum öldürücü (fungisidal) konsantrasyon (MFK) değerleri de bulunmuştur. Mayalar üzerinde yapılan minumum öldürücü konsantrasyon değerleri antifungal ajanların potansiyel öldürme aktivitesinin bulunmasında çok etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Barchiesi et.al., 2005). Panomycocin'in MFK değerleri MİK değerlerinin en fazla 2 veya 4 katı olarak bulunmuştur. Bu da panomycocin'in test edilen bütün maya suşlarına karşı fungisidal özellikte olduğunu kanıtlamaktadır. Özellikle şu an dünyada en ciddi ve en çok mantar enfeksiyonuna neden olan *C.albicans* suşuna karşı güçlü öldürücü etki göstermesi panomycocin'in önemini arttırmıştır. Bunun yanında yine non-*albicans Candida* olarak tabir edilen ve son yıllarda yaygınlıklarında artış görülen *C. glabrata*, *C.tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* gibi suşlara karşı da çok etkili olması panomycocin'in önemini daha da arttırmaktadır. Özellikle *C.glabrata* suşunun azol tipi ilaçların çoğuna dirençli olması bu suşun duyarlı olduğu yeni ajanların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Dermatofitler'de keratinli dokuyu işgal eden ve yüzeysel enfeksiyonlara neden olan mantarlardır. Panomycocin'in *invitro* antifungal aktivitesi toplam 41 dermatofit izolatı üzerinde denenmiştir. İzolatlar DSMZ'den alınan standart suşları ve hastane izolatlarını içermiştir. Panomycocin, *M.canis* ve *T.rubrum*'da içeren tüm izolatlara karşı çok etkili olmuştur ki bu iki suş şu an dünyada istatikselsel olarak en çok yüzeysel mantar enfeksiyonuna neden olan suşlar olarak bilinmektedir (Weinstein et.al. 2005).

Hasat sonrası sebze ve meyvelerin çürümesine karşı verilen ciddi mücadeleye yıllardır süregelmesine rağmen şu ana kadar bu konuda önemli bir gelişme kaydedilmemiştir. Hasat sonrası çürümelere neden olan hastalıkların %70'ine mantarlar neden olmaktadır ve bu hastalıklar her yıl bütün dünyada büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Sentetik fungusidler kullanımı bitki patojenleri ile mücadelede en çok kullanılan yöntemdir. Fakat çürümeye neden olan mantarların sentetik zirai ilaçlara karşı direnç geliştirmesi bu yöntemin etkinliğini önemli ölçüde azaltmıştır. Bunun yanında bu sentetik ilaçlar insan sağlığına ve çevreye önemli boyutlarda zarar vermektedirler ve kullanımları resmi otoritelerce önemli ölçüde kısıtlanmıştır (Janisiewicz ve Korsten, 2002). Bu nedenlerle hasat sonrası çürümelere neden olan hastalıklarla mücadelede alternatif yöntemlerin geliştirilmesinin gerekliliği doğmuştur.

Bu çalışmada panomycocin'in antifungal etkisi turunçgillerde hastalıklara neden olan altı farklı mantar türüne karşı denenmiştir. İzolatlar DSMZ'den alınan standart suşları içermiştir. Panomycocin' in hastalıklara genellikle neden olan *B. cinerea*, *P. digitatum* ve *P. italicum*' a karşı etkili olduğu yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneylerle bulunmuştur. Özellikle *in vivo* deneyler panomycocin'in bu suşlara karşı etkinliğini ileri seviyede ispatlamıştır. Panomycocin'in *A. citri*, *C. gloeosporoides*, *P. citrophthora* türlerine karşı herhangi bir büyüme inhibasyon etkisi göstermediği bulunmuştur. Panomycocin'in hücre duvarlarındaki beta-1,3-glukan yapılarını parçalayarak, hücrelerin patlayarak ölmesine neden olduğu bilinmektedir (izgü et.al, 2005). Bu nedenle test edilen suşların panomycocin'e karşı duyarlılığı hücre duvarlarındaki beta-1,3- glukan miktarlarındaki farklılıklara göre değişmektedir. Panomycocin'in etkili olmadığı *C. gloeosporoides* suşunun sporlarının hücre duvarına ek olarak yoğun lifli yapılı bir kılıf ile kaplı olması, *P. citrophthora* spor hücre

duvarlarının yüksek miktarlarda selüloz içermesi ve *A. citri* sporlarının pürüzlü, çok kalın ve çok hücreli kompleks yapısı, bu suşlara karşı panomycocin'in neden etkili olmadığını açıklamaktadır.

Bu sonuçlar K5 tipi maya toksik proteini, Panomycocin'in insanlarda ciddi enfeksiyonlara yol açan maya ve dermatofit'lere karşı potansiyel bir doğal antifungal/antimikotik ajan olduğunu ispat etmektedir. Ayrıca bitkilerde hasat sonrası hastalıklara en fazla neden olan *B. cinerea*, *P. digitatum* ve *P. italicum* suşlarına karşı bitkilerin korunmasında önemli bir rol oynayacağı bulunmuştur. Panomycocin'in terapötik amaçlı kullanımının mümkün olabilmesi için ilk aşamada uygulama şekline göre değişik formülasyonlarının gerçekleştirilmesi ve pre-klinik çalışmaların başlatılması gerekmektedir. Bitki korumasında kullanımı için ise panomycocin'in farklı uygulamalara yönelik preperat haline getirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu proje kapsamında Panomycocin'in formülasyon çalışmasının yapılması da planlanmıştır. Fakat 2. ara raporda da belirtildiği üzere bitki patojenleri üzerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar planlanan süreden çok daha fazla zaman almıştır ve özellikle bu projenin bütününde alınan olumlu sonuçlar ışığında, formülasyon çalışmalarının çok farklı uygulamalara yönelik olması gerektiği görülmüştür. Formülasyon çalışmaları için planlanandan çok daha fazla zaman ve maddi kaynağa ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeplerden dolayı bu projede formülasyon çalışmalarına başlanamamıştır. Farklı uygulamalara yönelik geniş kapsamlı formülasyon çalışmalarını içerecek yeni bir proje teklifi hazırlanacaktır.

REFERANSLAR

- Barchiesi F., Spreghini E., Tomassetti S., Arzeni D., Giannini D., ve Scalise G.** Comparison of the Fungicidal Activities of Caspofungin and Amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 4989-4992, (2005)
- Bevan E.A., Makower M.** The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc 11th Int Cong Gene* 1, 202-203, (1963).
- Bjönberg A., Schnürer C.** Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* *Can.J. Microbiology* 39, 623-628, (1993).
- Bradford, M.A.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254 (1946).
- Bussey H., Boone C., Zhu H., Vernet T., Whiteway M. , Thomas D.Y.** Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia* 46, 193-200, (1990).
- Cabib E., Drgon T., Drgonova J., Ford R.A., Kollar R.** The yeast cell wall a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem Soc. Trans.* 25, 200-204, (1997).
- Cameron M.L., Schell W.A., Bruch S.** Correlation of in vitro flucanazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for immunodeficiency virus type-1. *Antimicrob.Agents.Chemother.* 37, 2449-2453, (1993)
- Chavanet F., Lopez J. Grappin M, Bonnin A., Duong M, Waldner A., Boiston M, Camerlynck F. Poptier H.** Crosssectional study of the susceptibility of *Candida*

isolates to antifungal drugs and in vitro in vivo correlation in HIV infected patients. *AIDS*, 8, 945-950 (1993).

Dignard D., Whiteway M., Germain D., Tessier D., Thomas DY. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol. Gene. Genet.*, 227, 127-136, (1991).

Ekström N. Airtight storage of moist feedgrain (in Swedish) *Swedish Institute of Agricultural and Environmental Engineering, Report 439* (1992).

Goto K., Iwase T., Kichise K., Kitano K., Totsuka A., Obata T., Hara S. Isolation and properties of a chromosome dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural Biol. Chem.* 54, 505-509, (1990).

Gunge N., Tamaru A., Ozawa F., Sakaguchi K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character. *J Bacteriol* 145, 382-390 (1981).

Jablonowski et al. *Saccharomyces cerevisia* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zygocin receptor. *Yeast* 18, 1285-1299, (2001).

Janisiewicz W., Korsten L. Biological Control of post harvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411-441, (2002).

Jijakli H., Lepoivre P., Tossut P. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on postharvest apples by two antagonistic yeasts *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 58, 1349-1358, (1993).

Hector R.F. Compounds active against cell walls of medically important fungi *Clin Microbiol Rev*, 6, 1285-1299.

Hutchins K., Bussey H. Cell wall receptor for yeast killer toxin *J. Bacteriol.* 99, 161-169, (1983).

- İzğü F., Altınbay D., Yucelis A.** Identification and killer activity of a yeast contaminating starter culture of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in Turkish baking industry. *Food Microbiol.* 14, 125-31, (1997).
- İzğü F., Altınbay D.** Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. *Microbios* 89, 15-22, (1997).
- İzğü F., Altınbay D. , Sağıroğlu A.** Isolation and characterization of the K6 type yeast killer protein. *Microbios* 99, 161-172, (1999).
- İzğü F., Altınbay D., Derinel Y.** Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiology* 21, 635-340, (2004).
- İzğü F., Altınbay D.** Isolation and characterization of the K5 type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-Glucanase *Biosci.Biotech and Biochem.* 68, 685-693, (2004) .
- İzgu F., Altınbay D, Sertkaya A.** Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 2200-2206, (2005).
- İzgu F., Altınbay D, Acun T.** Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; Purification, characterization and its' exo-beta-1,3-glucanase activity. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 669-676, (2006)
- Kagan, B.L.** Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayers. *Nature* 302, 709-711, (1983).
- Kazantseva I.D., Zimina M.S.** Yeast killer strains with a broad spectrum of action: search of collection strains and preliminary identification. *Mikrobiologia* 58, 291-297, (1989).

Masih E.I., Paul, B. Secretion of beta-1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology* 44, 391-395, (2002).

Mathews H.L. Effect of *Pichia anomala* killer toxin on *Candida albicans*. *Medical microbiology : official publications of the Int. Soc. for Human and Animal Mycology* .58, 199-204, (1998).

Magliani W., Conti S., Cassone A., De Bernardis F., Polonelli L. New immunotherapeutic strategies to control vaginal candidiasis. *Trends in molecular medicine*, .8, issue.3,121-126 (2002).

Morace G. Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. *Eur J Epidemiol* ...5, 303-310 (1989).

Palfree G.F., Bussey H. Yeast killer toxin: Purification and the characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 93, 487-493.5, 303-310, (1979).

Palpacelli V., Ciani V. & Rossini G. Activity of different killer yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol lett* 68, 75-78, (1991).

Peterson, S., Schnürer J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,1027-1032, (1995).

Polonelli L. , Lorenzini R., De Bernardis F. & Morace G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia* 96, 103-107, (1986).

Polonelli L., Conti S., Gerloni M., Magliani W., Castagnola M., Morace G. & Chezzi C. 'Antibodies': antibiotic like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol.* 29, 235-242, (1991).

Phillskirk G., Young T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* , . 4 , 147-151, (1975).

Radler F., Schmitt M.J. , Meyer B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol* 154, 175-178, (1990).

Schmitt M. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT 28. *J Gen. Microbiol.*, 135, 1529-1535, (1989).

Schmitt M., Radler F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisia* strain 28 *J. Gen. Microbiol.* 67, 2883-2884, (1987).

Selitrennikoff C.P. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883-2884, (2001).

Starmer W.T., Ganter P.F., Aberdeen V., Lachance M.A., Phaff H.J. The ecological role of killer Yeasts in natural communities of Yeasts. *Can. J. Microbiol. Rev.* 33, 783-796, (1987).

Takasuka T., Komiyama T., Furichi Y., Watanabe T. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 41(6), 575-581, (1995).

Tipper D.J., Bostian K.A. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeast. *Microbiol Rew* 48(2), 125-156 (1984).

White J. H. , Butler A.R. and Stark J. R. *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit yeast adenyl cyclase. *Nature*, 341 666-668, (1989).

Wickner R.B. Double stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisia*. *Microbiol. Rev.* 60, 250-265, (1996).

Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 127, 213-222, (1995).

Weinstein A, Berman B. Topical treatment of common superficial tinea infections. *American Family Physician* 65 2095-2102, (2002).

Wickner R.B. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. *Plasmid* 2, 303-322, (1979).

Wingard J.R. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin.Infect.Dis.* 20, 115-125 (1995)

Venkatesan P, Perfect JR, Myers SA. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatologic therapy* 18:44-57, (2005)

Young T.W., Yagiu M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek* 44, 59-77, (1978).

Proje Kodu: 104T495
Proje Başlığı: K5 tipi öldürücü maya toksik proteininin yüksek miktarlarda üretilmesi ve saflaştırılması, insan ve bitki patojenik mantarları üzerindeki inhibasyon etkisinin tayini ve endüstriyel amaçlı kullanım için formülasyonunun geliştirilmesi
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Proje yürütücüsü: Prof.Dr.Fatih İzgü Yardımcı Araştırmacılar: Remziye Aysun Kepekçi Akif Emre Türel
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü, İnönü Bulvarı , 06531, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Atatürk Bul., No:221, Kavaklıdere, Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/06/2005- 01/12/2006
Öz (en çok 70 kelime) <i>In vitro</i> çalışma sonuçları test edilen bütün insan patojenik maya (26 izolat) ve dermatofitik izolatların (41 izolat) panomycocin'e karşı çok duyarlı olduğunu göstermiştir. Panomycocin, yapılan <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> çalışmalarda bitki patojenleri <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> ve <i>Penicillium italicum</i> suşlarına karşı inhibasyon etkisi göstermiştir. Bu sonuçlar panomycocin'in insanlarda ve turunçgillerde enfeksiyonlara neden olan mantar suşlarına karşı tıp alanında ve gıda korumasında muhtemel antifungal ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.
Anahtar Kelimeler: K5-tipi öldürücü maya toksini, panomycocin, MIK değeri, dermatofit, patojen maya, hasat sonrası patojen mantarları
Projeden Kaynaklanan Yurt Dışı Dergilerde (SCI core index) Yayınlar: - İzgü,F., Altınbay, D., Türel E., "In vitro susceptibility testing of panomycocin; a novel exo-β-1,3 glucanase isolated from <i>Pichia anomala</i> NCYC 434, against dermatophytes" <i>Mycoses</i> , Vol.50 (1), 31-34 (2007) -İzgü,F., Altınbay, D., Türel E., <i>In vitro</i> susceptibilities of <i>Candida</i> species to Panomycocin, a novel exo-β-1,3 glucanase isolated from <i>Pichia anomala</i> NCYC 434, Yayına gönderildi . <i>Microbiology and Immunology</i> , (2007) -İzgü, F. Altınbay, D., Kepekçi A., <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antifungal activity of panomycocin, a novel exo-β-1,3-glucanase, against post harvest plant pathogens. <i>Food Microbiology</i> dergisine gönderilmek üzere yayına hazırlanıyor.
Proje Kapsamında Tamamlanmış Yüksek Lisans Tezleri - Akif Emre Türel, Antimicrobial spectrum determination of the K5-type yeast killer protein and its kinetics of cell-killing, Yüksek lisans tezi, Aralık, 2005, ODTÜ, Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Fatih İzgü

-Remziye Aysun Kepekçi, Antifungal spetrum determination of the K5-type yeast killer protein on fungi, causing spoilage in citrus fruits. Yüksek lisans tezi, Aralık, 2006, ODTÜ, Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Fatih İzgü

Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Doçentlik B. Dalı Kodu: Moleküler Biyoloji ve Genetik