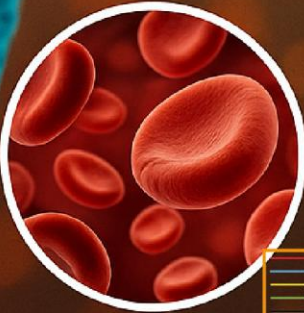


ÇEŞİTLİ HASTALIKLAR VE MOLEKÜLER KÖKENLERİ

Editörler

MUSTAFA TEKPINAR

AYTEN DİZKIRICI TEKPINAR



BİDGE Yayınları

ÇEŞİTLİ HASTALIKLAR VE MOLEKÜLER KÖKENLERİ

Editörler

DOÇ. DR. MUSTAFA TEKPINAR

PROF. DR. AYTEN DİZKIRICI TEKPINAR

ISBN: 978-625-372-675-1

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 18.06.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İçindekiler

EPİLEPSİ: GENETİK VE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR	6
ARİF SARI	6
AYSEL MİLANLIOĞLU	6
<i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> PATOGENEZİ	31
BURCU EMİNE TEFON	
ÖZTÜRK	31
FUNGAL HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE KULLANILAN BAZI MOLEKÜLER YÖNTEMLER VE DNA BARKODLAMA	61
AYTEN DİZKIRICI TEKPINAR.....	61
COVID19 HASTALIĞINA NEDEN OLAN SARS-COV-2 PROTEİNLERİNİN MUTASYONLARININ DERİN MUTASYON TARAMA DENEYLERİ VE ESCOTT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ	100
MUSTAFA TEKPINAR.....	100
BİYOFİLM İLİŞKİLİ ENFEKSİYONLARDA BİYOFİLM OLUŞUMU, DİRENCİ VE KONTROLÜ	120
TUĞBA ÖZAKTAŞ.....	120

ÖNSÖZ

“Çeşitli Hastalıklar ve Moleküler Kökenleri” adlı bu kitap, çeşitli hastalıkların moleküler temellerini anlamak ve bu alandaki güncel araştırmaları bir araya getirmek amacıyla alanında ülkemizin saygın üniversitelerinde ve yurtdışında doktora yapmış uzman akademisyenler tarafından hazırlanmıştır.

Kitabımız, beş ayrı bölümden oluşmakta ve her biri farklı bir hastalık ya da hastalık grubunun moleküler mekanizmalarını detaylı bir şekilde ele almaktadır. İlk bölümde, epilepsinin genetik ve moleküler temelleri incelenmekte, bu karmaşık nörolojik bozukluğun altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına odaklanılmaktadır. İkinci bölümde, *Bordetella pertussis* bakterisinin mikrobiyolojik özellikleri ve patogenezi üzerine derinlemesine bir inceleme sunulmaktadır. Üçüncü bölüm, fungal hastalıkların teşhisinde kullanılan güncel moleküler yöntemleri ele almakta ve bu yöntemlerin klinik uygulamalarını tartışmaktadır. Dördüncü bölümde, COVID-19 hastalığına neden olan SARS-CoV-2 proteinlerinin mutasyonlarının derin mutasyon tarama deneyleri ve ESCOTT yöntemi ile analizine yer verilmektedir. Son olarak, beşinci bölümde, biyofilm ilişkili enfeksiyonların oluşumu, direnci ve kontrol yöntemleri üzerine odaklanılmakta, bu alandaki son bilimsel gelişmeler ışığında çeşitli stratejiler ele alınmaktadır.

Bu kitabın, moleküler tıp alanında çalışan araştırmacılara ve öğrencilere, hastalıkların moleküler kökenlerini anlamada ve bu bilgileri klinik uygulamalara entegre etmede değerli bir kaynak

olmasını umuyoruz. Ayrıca, bu alanda yapılan çalışmaların daha da ilerlemesine ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

Editörler

Doç. Dr. Mustafa TEKPINAR

Prof. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

EPİLEPSİ: GENETİK VE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR

ARİF SARI¹
AYSEL MİLANLIOĞLU²

1. Giriş

1.1 Epilepsi'nin tanımı ve epidemiyolojisi

Epilepsi, beyindeki anormal elektriksel aktivitelerin tekrarlayan nöbetlere yol açtığı, nörolojik bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (Qin ve ark., 2022).

Yüksek gelirli ülkelerde epilepsi insidansı, yılda 100.000'de yaklaşık 50 vaka ile farklı coğrafi bölgelerde tutarlılık göstermektedir. Epilepsi insidansı, bimodal bir dağılım sergileyerek iki belirgin zirve oluşturur: ilki 1 yaşın altındaki bebeklerde, diğeri ise 50 yaş ve üzerindeki bireylerde gözlemlenmektedir. Özellikle 50 yaş üzerindeki bireylerde, insidans yaşla paralel olarak artmakta ve en yüksek oran 70 yaş ve üzerindeki bireylerde kaydedilmektedir (Thijs, Surges, O'Brien, & Sander, 2019). Düşük ve orta gelirli

¹ Uzm. Dr., Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Dursun Odabaş Tıp Fakültesi, Nöroloji Bölümü, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0002-9870-8730, drarifsari@gmail.com

² Prof. Dr., Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Dursun Odabaş Tıp Fakültesi, Nöroloji Bölümü, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0003-2298-9596, ayselmilanlioglu@yahoo.com

lkelerde bu oran yaklaşık iki katına kadar çıkabilmektedir. Bu artışı, sıtma ve nrosistiserkoz gibi endemik enfeksiyon hastalıklarına maruziyetin artması, karayolu trafik kazaları ve perinatal döneme ilişkin travmaların daha sık görülmesi, yetersiz sağlık altyapısı ile sınırlı önleyici sağlık hizmetleri ve bakım olanaklarına erişim eksikliği gibi etkenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (Singh & Trevick, 2016).

1.2 Moleküler düzeyde çalışmanın nemi

Epilepsi ve epileptogenezin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, epilepsinin daha etkin tedavi edilmesi açısından önemli bir adımdır. Bu mekanizmaların anlaşılması, yeni ilaçların, hücre terapilerinin ve gen terapisi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Zaitsev & Khazipov, 2023).

2. Epilepsinin Genetik Temelleri

2.1 Monogenik epilepsiler

Monogenik epilepsiler, epileptogenezen sorumlu tek bir gendeki patojenik varyantlar sonucu ortaya çıkar. Sıklıkla erken başlangıçlı, ilaca dirençli nöbetlerle karakterize nörogelişimsel bozukluklardır. Monogenik epilepsiler, fenotipik olarak heterojen olmakla birlikte, çoğunlukla gelişimsel gerilik, epileptik ensefalopati ve nöropsikiyatrik komorbiditelerle birlikte seyreder (Myers, Johnstone, & Dymant, 2019). Birleşik Krallık'ta yürütülen prospektif bir ulusal epidemiyolojik kohort çalışması, çocukluk ağı monogenik epilepsilerinin yıllık insidansını yaklaşık 2.000 canlı doğumda 1 olarak bildirmiş; vakaların büyük çoğunluğunun yalnızca sekiz gen ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Symonds ve ark., 2019).

En iyi tanımlanmış örnekler arasında; voltaj kapılı sodyum kanal alt birimini kodlayan SCN1A genindeki mutasyonlarla ilişkili Dravet sendromu (Chilcott, Dıaz, Bertram, Berti ve Karda 2022), potasyum kanal genleri KCNQ2 ve KCNQ3 ile ilişkili benign familial neonatal epilepsi (Gribkoff & Winqvist, 2023) ve sinaptik

transmisyonu etkileyen STXBP1, SLC2A1 gibi genlerdeki mutasyonlara bağılı epileptik ensefalopatiler yer almaktadır (Fukata & Fukata, 2017, Gerber ve ark., 2008).

2.2 Poligenik ve multifaktöriyel epilepsiler

Poligenik epilepsiler, hastalığın ortaya çıkmasında birçok genetik varyantın küçük etkilerinin birikerek rol oynadığı, karmaşık kalıtım desenlerine sahip epilepsi türlerini tanımlar. Bu varyantların her biri tek başına hastalığı oluşturacak kadar etkili olmasa da kümülatif etkileri, çevresel faktörlerle birlikte epilepsiye yatkınlığı belirgin şekilde artırabilir (Krey ve ark., 2022).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, özellikle jeneralize epilepsilerde birçok risk lokusu tanımlamış; örneğin SCN1A, GABRA2, CACNA1H, PCDH7 ve GRIK1 gibi genlerin çeşitli varyantlarının epilepsi predispozisyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2018, Wang ve ark., 2017). Genetik yatkınlık, birçok epilepsi olgusunda hastalığın ortaya çıkması için tek başına yeterli değildir; epilepsinin gelişimi genellikle genetik duyarlılıkla çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkar (Poduri & Lowenstein, 2011).

Poligenik epilepsilerin kalıtsal yapısı, çoğunlukla düşük penetranslı ve yüksek sıklıkta görülen varyantların kümülatif etkisiyle şekillenmektedir. Bu durum, bu epilepsi türlerinde aile öyküsünün bulunmasının riski artırabilmesine rağmen, Mendeliyen kalıtım paternlerinin gözlenmemesine neden olur (Helbig, Heinzen, Mefford, & ILAE Genetics Commission, 2016). Bu bağlamda, poligenik risk skorları, epilepsiye genetik yatkınlığı kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla araştırmalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır (Leu ve ark., 2019).

Klinik pratikte, poligenik epilepsilerin tanısal süreci genetik testlerden ziyade nörolojik muayene, elektroensefalografi ve nörogörüntüleme temellidir. Ancak, özellikle aile bazlı çalışmalarda poligenik modelin aydınlatılması, gelecekte bireyselleştirilmiş

önleme stratejileri ve hedefe yönelik tedaviler geliştirme açısından umut vaat etmektedir (Krey ve ark., 2022).

2.3 De novo mutasyonlar ve genetik mozaiklik

De novo mutasyonlar, germ hücrelerinde veya erken embriyogenez sırasında spontan olarak ortaya çıkan ve ebeveynlerin somatik hücrelerinde bulunmayan patojenik varyantlardır. Bu mutasyonlar özellikle erken başlangıçlı, şiddetli seyirli epileptik ensefalopatilerin önemli bir genetik nedeni olarak tanımlanmıştır (Epi4K Consortium ve ark., 2013).

Gelişmiş sekanslama teknolojileri sayesinde yapılan trio (hasta-anne-baba) analizleri, özellikle SCN1A, STXBP1, CDKL5, KCNQ2, SLC2A1, GNAO1, FOXG1 gibi genlerde görülen de novo mutasyonların epilepsi patogeneğinde yüksek katkı sağladığını ortaya koymuştur (Epi4K Consortium ve ark., 2013, Lindy ve ark., 2018).

Bu varyantlar, sıklıkla fonksiyon kaybı ya da kazanç mekanizmalarıyla nöronal hiperaktiviteyi tetikleyen yapısal veya fonksiyonel değişikliklere neden olur. De novo mutasyonlar, özellikle sporadik olguların genetik tanısında önemlidir; çünkü aile öyküsü bulunmayan ağır epilepsi olgularında tanısal çıkışı anlamlı ölçüde artırır (Lindy ve ark., 2018).

Öte yandan, genetik mozaiklik, bireyin hücrelerinin yalnızca bir kısmında mutasyonun bulunması durumudur ve hem germline (üreme hücrelerine sınırlı) hem de somatik (vücut hücrelerinde sınırlı) mozaiklik şeklinde sınıflandırılabilir (Myers & Mefford, 2015). Somatik mozaiklik, özellikle ebeveynde hastalık bulgusu olmamasına rağmen birden fazla çocuğun etkilenmesi gibi klinik durumları açıklayabilir ve genetik danışmanlık açısından büyük önem taşır (Campbell ve ark., 2014). Mozaik varyantların tespiti, klasik Sanger dizileme ile mümkün olmayabilir; bu nedenle yüksek derinlikli yeni nesil sekanslama teknikleri gereklidir (Jamuar, D’Gama, & Walsh, 2016).

Sonuç olarak, de novo mutasyonlar ve mozaiklik, epilepsinin genetik mimarisini anlamada temel öneme sahiptir. Bu varyantların tanınması; hastalığın prognozu, tedavi stratejileri ve tekrarlama riskinin belirlenmesi açısından klinik genetik değerlendirme sürecine entegre edilmelidir (Helbig ve ark., 2016b).

3. Epigenetik Mekanizmalar: DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları

Epigenetik, genetik dizide bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunun kalıcı veya geçici olarak düzenlenmesini sağlayan mekanizmaları ifade eder. Epilepside, özellikle gelişimsel ve epileptik ensefalopatiler başta olmak üzere pek çok formda epigenetik düzenlemelerin nörogelişimsel süreçleri ve sinaptik plastisiteyi etkileyerek epileptogenezde rol oynadığı gösterilmiştir (Kobow & Blümcke, 2014).

DNA metilasyonu, epigenetik düzenlemenin en iyi karakterize edilen biçimlerinden biridir ve genellikle CpG adacıklarında sitozin bazlarına metil grubu eklenmesiyle transkripsiyonel baskılanmaya neden olur. MECP2 gibi metilasyon bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, Rett sendromu gibi epilepsi ile ilişkili nörogelişimsel bozukluklara neden olur (Amir ve ark., 1999). Ayrıca, epileptik dokularda yapılan çalışmalar, epileptojenik odaklarda DNA metilasyon paternlerinin anlamlı düzeyde değiştiğini göstermiştir; bu da gen ekspresyon profillerinde kalıcı değişiklikler oluşturabilmektedir (Miller-Delaney ve ark., 2012).

Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi kovalent değişiklikleriyle kromatin yapısının gevşetilmesi veya sıkılaştırılması yoluyla gen ekspresyonunu düzenler. Özellikle histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin aşırı aktivitesi, epilepsi modellerinde nöronal hiperaktivite ve nöronal ölüm ile ilişkilendirilmiştir (Henshall & Kobow, 2015). HDAC inhibitörleri, prelinik modellerde antiepileptik etki göstermiş olup, bu ajanlar potansiyel epigenetik

temelli tedavi stratejileri arasında yer almaktadır (Jessberger ve ark., 2007).

Ayrıca, epigenetik modifikasyonların çevresel faktörlerle etkileşimi, doğum öncesi stres, hipoksi, enfeksiyon ve ilaç maruziyeti gibi durumların epilepsi riskini nasıl artırabileceğini açıklamada önemli bir temel sunmaktadır (Banik ve ark., 2017). Nitekim, hayvan modellerinde maternal stresin yavrularda değişmiş DNA metilasyon örüntüleri ve artmış nöbet eşiği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kundakovic & Champagne, 2011).

Sonuç olarak, epigenetik mekanizmalar epilepside sadece etiyolojik bir faktör olarak değil, aynı zamanda çevresel etkilerin genetik alt yapıyla olan etkileşimini açıklayan önemli bir biyolojik köprü işlevi görmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar hem tanı hem de epigenetik modülasyon hedefli yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından umut vericidir.

4. İyon Kanalopatileri ve Klinik Yansımaları

İyon kanalopatileri, voltaj ya da ligand bağımlı iyon kanallarındaki genetik bozuklukların nöronal elektriksel aktiviteyi etkilemesiyle ortaya çıkan hastalık grubunu oluşturur. Epilepsi, bu kanalopatilere bağlı en sık görülen klinik tablolardan biridir. Nöronal membran potansiyelinin düzenlenmesinde görevli sodyum, potasyum, kalsiyum ve klor kanallarındaki mutasyonlar, hücre içi elektriksel dengeyi bozarak nöronal hiperaktivite ve epileptiform deşarjlara zemin hazırlar (Wang ve ark., 2017, Helbig ve ark., 2016a).

En iyi tanımlanmış örneklerden biri, SCN1A genindeki patojenik varyantlarla ilişkili Dravet sendromudur. Bu gen voltaj kapılı sodyum kanalının $\alpha 1$ alt birimini kodlar ve fonksiyon kaybı mutasyonları ile karakterizedir (Claes ve ark., 2001). Benzer şekilde, SCN2A, SCN8A, KCNQ2 ve KCNQ3 gen mutasyonları da neonatal başlangıçlı epilepsiler ve epileptik ensefalopatilerle ilişkilidir (Barcia ve ark., 2012, Singh ve ark., 1998).

Kalsiyum kanal genleri (CACNA1A, CACNA1H) hem fokal hem de jeneralize epilepsi formlarında rol alabilir. Bu kanalların disfonksiyonu sinaptik transmisyonda dengesizlik ve nöronal senkronizasyonun bozulması ile sonuçlanır (Reinson ve ark., 2016). Ayrıca, GABRA1 ve GABRG2 gibi GABA reseptör alt birimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar inhibitör sinyalleme bozulmasına yol açarak epileptik aktiviteye katkı sağlar (Macdonald & Kang, 2009).

Kanalopatilerin fenotipik yansımaları büyük ölçüde genotipe bağlıdır. Aynı gen üzerindeki farklı mutasyonlar, benign familial epilepsilerden ağır epileptik ensefalopatilere kadar uzanan geniş bir klinik spektrum oluşturabilir. Bu nedenle genetik tanının yanında elektroensefalografi ve klinik korelasyon, kesin tanı ve sınıflandırma açısından hayati önem taşır (Myers ve ark., 2019).

Son yıllarda, kanal disfonksiyonlarını hedef alan spesifik tedavi yaklaşımları (örneğin sodyum kanal blokörleri, potasyum kanal aktivatörleri) ön plana çıkmaktadır. Bu yaklaşım, epilepside genetik temelli kişiselleştirilmiş tedavi anlayışının gelişmesine önemli katkılar sunmaktadır (Symonds, Zuberi, & Johnson, 2017).

Tablo 1: Gen – klinik fenotip – tedavi eşleşmeleri

Gen	GABRA1	KCNQ2	SCN8A	SCN2A	SCN1A
Kodladığı Kanal / Protein	GABAA reseptörü $\alpha 1$ alt birimi	Potasyum kanalı (Kv7.2)	Voltaj kapılı Na^+ kanalı (Nav1.6)	Voltaj kapılı Na^+ kanalı (Nav1.2)	Voltaj kapılı Na^+ kanalı (Nav1.1)
Klinik Sendrom	Jeneralize epilepsi	Benign neonatal konvülsiyon	Epileptik ensefalopati	Benign infantil epilepsi / epileptik	Dravet sendromu
Etkilenim	Fonksiyon Kaybı	Fonksiyon Kaybı	Fonksiyon Kazancı	Fonksiyon kaybı ya da kazancı	Fonksiyon Kaybı
Tedavi Yaklaşımı	Benzodiazepinler, valproat	Retigabin (araştırma), levetirasetam	Fenitoin, karbamazepin	Fenitoin (GOF), sodyum kanal blokörleri	Valproat, stiripentol, fenfluramin
Referans	Macdonald & Kang, 2009	Singh ve ark. 1998	Barcia ve ark. 2012	Myers ve ark.,2019	Claes ve ark. 2001

5. İlaça Dirençli Epilepsilerde Moleküler Patogenez

İlaça dirençli epilepsi, en az iki uygun antiepileptik ilaca rağmen nöbetlerin devam etmesi durumu olarak tanımlanır ve tüm epilepsi vakalarının yaklaşık %30'unu oluşturur (Kwan ve ark., 2010).

5.1 İlaç hedefi düzeyinde değişiklikler

İlaça dirençli epilepsilerin moleküler patogenezinde yer alan önemli mekanizmalardan biri, antiepileptik ilaçların hedeflediği reseptör veya iyon kanallarında meydana gelen yapısal ya da işlevsel değişikliklerdir. Bu değişiklikler, ilaçların hedef proteinlere bağlanma etkinliğini azaltarak farmakodinamik direnç gelişmesine yol açar (Bazhanova, Kozlov, & Litovchenko, 2021). Epileptik dokularda GABA-A reseptörlerinin alt birim yapısında ve ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişiklikler, bu reseptörleri hedefleyen antiepileptik ilaçlara karşı azalmış terapötik yanıtla ilişkilidir. Özellikle benzodiazepinler bu değişikliklerden etkilenebilir (Macdonald & Kang, 2009). Sodyum kanallarında, özellikle SCN1A geninde görülen mutasyonlar, nöronal eksitabilitiyi artırarak sodyum kanal blokerlerine karşı direnç gelişimine yol açar. Bu mutasyonlar nöbetleri tetikleyebilir ya da tedaviye yanıtsızlığa neden olabilir (Claes ve ark., 2001). T-tipi kalsiyum kanallarında (CACNA1H) ortaya çıkan fonksiyonel değişiklikler, postsinaptik uyarılabilirliği artırarak eksitator sinyali güçlendirir. Bu da nöbet eşiğini düşürerek bazı antiepileptik ilaçların etkinliğini azaltabilir (Cain & Snutch, 2013).

5.2 İlaç taşıyıcı proteinlerin artışı (Farmakokinetik Hipotez)

Multidrug resistance 1 (MDR1, ABCB1) geninin kodladığı P-glikoprotein (P-gp), kan-beyin bariyerinde ilaçları dışa atan bir efflux pompasıdır. İDE hastalarında bu taşıyıcıların ekspresyonunun artması, AEİ'lerin santral sinir sistemine etkin geçişini engelleyebilir (Löscher & Potschka, 2005). P-gp'nin temporal lob epilepsisi cerrahisi sonrası epileptojenik dokuda yüksek düzeyde bulunduğu gösterilmiştir (French, 2013).

5.3 Epileptojenik ağların yeniden yapılanması

Nöronal ağlardaki yapısal ve işlevsel reorganizasyon, özellikle glial hücre aktivasyonu, sinaptik yeniden şekillenme ve inflamatuvar yanıtlar İDE gelişiminde rol oynar. Proinflamatuvar sitokinlerin (ör. IL-1 β , TNF- α) artışı, nöbet eşliğini düşürebilir ve nöronal hasarı artırabilir (Vezzani, French, Bartfai, & Baram, 2011). Ayrıca mTOR sinyal yolunda artış gösteren aktivitenin hem nörogenez hem de gliogenez üzerinden epileptik aktiviteyi sürdürebileceği bildirilmiştir (Crino, 2015).

5.4 Epigenetik düzenlemeler

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'lar gibi epigenetik mekanizmalar gen ekspresyonunu çevresel faktörlere yanıt olarak değiştirir. Epileptojenik dokuda BDNF, REELIN, MDR1 gibi genlerin metilasyon paternlerinde farklılıklar saptanmıştır (Kobow & Blümcke, 2014).

5.5 Nöronal plastisite ve sinaptik disregülasyon

Uzun dönemli potansiyasyon ve uzun dönemli depresyon mekanizmalarındaki bozulmalar, sinaptik plastisiteyi etkileyerek epileptik odaklarda nöronal hiperaktiviteyi sürdürür. Bu durum, özellikle nörogelişimsel epilepsilerde tedaviye dirençli nöbetlerin temelini oluşturabilir (Sutula, Hagen, & Pitkänen, 2003).

Tablo 2. İlaça dirençli epilepsilerde moleküler mekanizmalar

Mekanizma	Epigenetik değişiklikler	İnflamatuvar yanıtlar	Farmakodinamik tolerans	Hedef yapıda değişiklik	İlaç taşıyıcı protein ekspresyonu
Açıklama	DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ilaç yanıtını etkileyebilir.	Sitozinlerin ve inflamatuvar yolların aktivasyonu, nöronal hiperaktiviteye katkıda bulunur.	İlaçların uzun süreli kullanımı ile reseptör düzeyinde yanıtın azalması.	İyon kanalları veya reseptörlerdeki mutasyonlar, ilaçların bağlanma etkisini azaltabilir.	P-glikoprotein gibi eflüks pompası proteinlerini artırışı, antiepileptik ilaçların hücre dışına atılmasına neden olur.
İlgili Moleküller / Genler	MeCP2, DNMT1	IL-1 β , TNF- α	GABA reseptörleri	SCN1A, GABRA1	ABCB1 (MDR1)
Referans	Kobow & Blumcke 2014	Vezzani ve ark. 2011	Kwan ve ark. 2010	(Helbig & ark.,2008)	Löscher ve ark. 2005

6. Epileptogenez ve Moleküler Biyobelirteçler

Epileptogenez, normal beyin dokusunun epileptik bir odağa dönüşme sürecini ifade eder ve sıklıkla travma, enfeksiyon, iskemik hasar, genetik bozukluklar veya nörogelişimsel anormallikler sonrasında başlar. Bu süreç, latent dönemden başlayarak nöronal yeniden yapılanma, glial aktivasyon, inflamasyon, sinaptik reorganizasyon ve gen ekspresyon değişikliklerini kapsayan karmaşık bir moleküler olaylar dizisini içerir (Pitkänen & Lukasiuk, 2011).

6.1 Gen ekspresyonu ve transkriptomik belirteçler

Epileptojenik bölgelerde BDNF, CREB, c-Fos, NPY, GAD1 gibi genlerin ekspresyonunda değişiklikler bildirilmiştir. Bu genler sinaptik plastisite, nöronal uyarılabilirlik ve hücre hayatta kalımı gibi temel süreçleri düzenler (Rakhade & Jensen, 2009).

6.2 MikroRNA'lar

MikroRNA'lar post-transkripsiyonel düzeyde gen regülasyonunu sağlayan küçük RNA molekülleridir. Epilepsi modellerinde özellikle miR-146a, miR-134, miR-155 gibi miRNA'ların nöbet sonrası ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir. Bu moleküller hem biyobelirteç hem de terapötik hedef potansiyeli taşır (Jimenez-Mateos & Henshall, 2013, Korotkov ve ark., 2020).

6.3 İnflamatuar sitokinler

IL-1 β , TNF- α , HMGB1, TGF- β gibi inflamatuvar mediatörlerin artışı, epileptogenez sürecinde hem nöronal eksitabilitiyi artırır hem de glial cevabı tetikler. Kan ve BOS'ta ölçülebilen bu biyobelirteçler, inflamasyona dayalı epileptik süreçlerin izlenmesinde kullanılabilir (Vezzani ve ark., 2011).

6.4 Nöropeptitler ve nörotransmitter metabolitleri

Nöropeptid Y (NPY), galanin, substance P gibi peptid yapılı nörotransmitterler epileptojenik süreçte regüle edilir. Özellikle NPY, GABAergik nörotransmisyonu modüle ederek antikonvülsan etki gösterir (Baraban, 2004).

6.5 Epigenetik biyobelirteçler

DNA metilasyon paternleri, histon asetilasyonu ve belirli epigenetik imzalar epileptik dokularda farklılaşmıştır. Bu değişiklikler, gen ekspresyonunu kalıcı şekilde etkileyerek epileptogenez sürecine katkı sağlar. Özellikle MECP2 gibi regülatör genlerdeki değişiklikler klinik alt tip ayrımında değerlendirilebilir (Kobow & Blümcke, 2014).

6.6 Proteomik ve metabolomik göstergeler

Kandaki belirli protein seviyeleri (ör. GFAP, NSE) ve metabolit profilleri epileptik dokuda meydana gelen değişikliklerin periferik yansımaları olabilir. Bu veriler noninvaziv biyobelirteç geliştirme çalışmalarında yoğun olarak değerlendirilmektedir (Elhady ve ark., 2021).

7. Nöronal Ağ Etkileyen Moleküler Mekanizmalar

Epilepside yalnızca bireysel nöronların değil, bu nöronlar arasındaki bağlantıların ve sinaptik organizasyonun değişmesi, nöbetlerin başlangıcında ve yayılımında merkezi bir rol oynar. Nöronal ağ düzeyindeki patolojiler; nöronlar arası iletişimin, senkronizasyonun ve plastisitenin bozulmasına yol açarak hipereksitabilite ve hipersenkronizasyon ile karakterize bir epileptik durum oluşturur (Staley, Soldo, & Proctor, 1995).

7.1 İyon kanal dinamiği ve aksiyon potansiyeli oluşumu

Epileptik beyin dokusunda voltaj kapılı sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarının ekspresyonu ve fonksiyonu bozulur.

Özellikle SCN1A, SCN2A, KCNQ2, CACNA1A gibi genlerdeki mutasyonlar aksiyon potansiyelinin eşik değerini düşürerek nöronların gereksiz uyarılmasına neden olur (Claes ve ark., 2001).

7.2 İnhibitör ve eksitatör sinyal dengesizliği

Nöronal ağ homeostazı, GABAerjik inhibitör ve glutamaterjik eksitatör sinyallerin dengesi ile sağlanır. GABA reseptör alt birimleri (GABRA1, GABRG2) ve glutamat reseptörleri (GRIN2A, GRIA1) epileptik dokularda düzensiz ekspresyon gösterir. Bu dengesizlik, hipersenkronize nöral ateşlemelere zemin hazırlar (Macdonald & Kang, 2009, Carvill ve ark., 2013).

7.3 Sinaptik reorganizasyon ve yeni bağlantıların oluşumu

Epileptik beyinlerde gözlenen en belirgin yapılardan biri mossy fiber sprouting (hipokampusta granül hücrelerin aksonlarının yeniden yapılanması) ve aberan sinaptogenezdır. Bu yeniden yapılanma, patolojik nöronal devrelerin kurulmasına ve kalıcı nöbet paternlerinin gelişmesine neden olur (Sutula, He, Cavazos, & Scott, 1988).

7.4 Nöronal plastisite ve CREB-BDNF yolu

Nöbet sonrası artmış Cyclic AMP-Response Element Binding Protein (CREB) aktivitesi ve brain- derived neurotrophic factor (BDNF) ekspresyonu, nöronal plastisiteyi artırır. Bu durum başlangıçta adaptif görünse de zamanla hiperplastik devrelerin oluşmasına ve epileptiform aktivitenin kronikleşmesine neden olabilir (McNamara, Huang, & Leonard, 2006).

7.5 mTOR ve Wnt sinyal yolları

mTOR (mammalian target of rapamycin) ve Wnt/ β -catenin gibi hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen yollar, epileptik ağın oluşumunda önemli rol oynar. Özellikle tuberöz skleroz ve fokal kortikal displazi gibi hastalıklarda mTOR yolunun aşırı aktivitesi, hücre büyümesi ve sinaptogenez üzerinden epileptik devrelerin oluşumunu tetikler (Crino, 2016).

7.6 Mikroglia ve astrosit katkısı

Glial hücreler (özellikle mikroglia ve astrositler) nöronlar arası bağlantıların şekillenmesinde aktif rol oynar. Mikroglial inflamasyon ve astrositlerin glutamat temizleme kapasitesinin bozulması, nöronal aşırı aktivitenin sürdürülmesine katkı sağlar (Vezzani, Aronica, Mazarati, & Pittman, 2013).

8. Tedaviye Yönelik Moleküler Yaklaşımlar

Epilepside tedaviye dirençli olguların artması, geleneksel antiepileptik ilaçlardan farklı olarak, hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların hedeflenmesini gerekli kılmıştır. Bu doğrultuda geliştirilen yeni stratejiler; genetik mutasyonlara özgü tedavi, epigenetik modülasyon, nöroinflamasyonun baskılanması, hücre içi sinyal yollarının regülasyonu ve nöronal devre modifikasyonu gibi çok katmanlı yaklaşımları kapsamaktadır (Bazhanova ve ark., 2021, Sanz, Rubio, & Garcia-Gimeno, 2024).

8.1 Genetik temelli tedaviler

Özellikle monogenik epilepsilerde (SCN1A, KCNQ2, STXBP1) gibi mutasyonlara yönelik genetik düzeyde kişiselleştirilmiş tedaviler geliştirilmektedir. Bunlar arasında:

Antisens oligonükleotid (ASO) tedavileri

CRISPR-Cas9 ile gen düzeltme

mRNA temelli modülasyon gibi yöntemler sayılabilir.

Dravet sendromu için geliştirilmiş STK-001 gibi ASO bazlı tedaviler prelinik ve erken klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar vermektedir (Han ve ark., 2020).

8.2 Epigenetik düzenleyiciler

Epileptogenez sürecinde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının rolü göz önüne alındığında, HDAC inhibitörleri (valproat, vorinostat, trichostatin A) gibi ajanlar, gen ekspresyonunu düzenleyerek antikonvülsan etki gösterebilir. Bu ajanların çoğu

preklinik aşamada olsa da gelecekte epigenetik temelli hedefe yönelik tedavilerde önemli bir yer edinmeleri beklenmektedir (Henshall & Kobow, 2015).

8.3 Sinyal yolu inhibitörleri (mTOR, MAPK)

mTOR sinyal yolunun aşırı aktivitesi, özellikle tuberöz skleroz kompleksi ve fokal kortikal displazi gibi yapısal epilepsilerde görülmektedir. Bu yolağı hedefleyen everolimus, FDA tarafından epilepsi tedavisinde onaylanan ilk moleküler hedefli ajandır. Benzer şekilde, MAPK/ERK yolunu hedefleyen inhibitörler de araştırma aşamasındadır (Crino, 2015, Lai ve ark., 2022).

8.4 Nöroinflamatuvar yaklaşımlar

İnflamatuvar sitokinlerin (ör. IL-1 β , TNF- α) epileptogenezdeki rolü nedeniyle, bu sitokinleri inhibe eden anti-inflamatuvar ajanlar (anakinra, canakinumab gibi) tedavi stratejileri arasında değerlendirilmektedir. Henüz rutin kullanıma girmemiştir ancak özellikle otoimmün epilepsilerde klinik potansiyele sahiptir (Vezzani & Baram, 2007).

8.5 Moleküler nöromodülasyon

Optogenetik, kemogenetik ve nöronal devre mühendisliği teknikleri, epileptik odakları selektif olarak baskılamak için kullanılabilecek deneysel yaklaşımlardır. Işık veya kimyasal uyarıcılarla nöron aktivitesinin kontrol edilmesi, özellikle fokal epilepsilerde gelecek vadeden bir stratejidir (Christenson Wick & Krook-Magnuson, 2018).

8.6 MikroRNA hedefli tedaviler

Belirli miRNA'ların (örn: miR-146a, miR-134) aşırı veya az ekspresyonu epileptogenezde etkili olduğu için, bu moleküllerin miRNA inhibitörleri veya mimetikleri ile regülasyonu araştırılmaktadır. Bu alan henüz deneysel düzeyde olsa da özgün tedavi potansiyeli taşır (Jimenez-Mateos & Henshall, 2013).

9. Sonuç

Epilepsi, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan karmaşık bir nörolojik hastalık olup, klinik çeşitliliği ve tedaviye dirençli vakaların artması, tedavi sürecini zorlaştırmaktadır (Singh & Trevick, 2016). Epilepsi ve epileptogenezin temelindeki moleküler mekanizmaların ortaya konması, epilepsinin tedavisini daha etkili hale getirmek için kritik bir aşamadır, bu da kişiselleştirilmiş tedavi ve farmakogenetik yaklaşımlarının önemini daha da artırmaktadır (Zaitsev & Khazipov, 2023, Vezzani ve ark., 2011).

Dil Desteği: Bu bölümün yazım sürecinde ChatGPT'den dil desteği alınmıştır.

Kaynakça

Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23(2), 185–188. doi:10.1038/13810

Banik, A., Kandilya, D., Ramya, S., Stümel, W., Chong, Y. S., & Dheen, S. T. (2017). Maternal factors that induce epigenetic changes contribute to neurological disorders in offspring. *Genes*, 8(6), 150. doi:10.3390/genes8060150

Baraban, S. C. (2004). Neuropeptide Y and epilepsy: Recent progress, prospects and controversies. *Neuropeptides*, 38(4), 261–265. doi:10.1016/j.npep.2004.04.006

Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., et al. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, 44(11), 1255–1259. doi:10.1038/ng.2441

Bazhanova, E. D., Kozlov, A. A., & Litovchenko, A. V. (2021). Mechanisms of drug resistance in the pathogenesis of epilepsy: Role of neuroinflammation. *Brain Sciences*, 11(5), 663. doi:10.3390/brainsci11050663

Cain, S. M., & Snutch, T. P. (2013). T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(7), 1572–1578. doi:10.1016/j.bbamem.2012.07.028

Campbell, I. M., Stewart, J. R., James, R. A., Lupski, J. R., Stankiewicz, P., Olofsson, P., et al. (2014). Parent of origin, mosaicism, and recurrence risk: Probabilistic modeling explains the broken symmetry of transmission genetics. *American Journal of Human Genetics*, 95(4), 345–359. doi:10.1016/j.ajhg.2014.08.010

Carvill, G. L., Regan, B. M., Yendle, S. C., O'Roak, B. J., Lozovaya, N., Bruneau, N., et al. (2013). GRIN2A mutations cause

epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nature Genetics*, 45(9), 1073–1076. doi:10.1038/ng.2727

Chilcott, E., Díaz, J. A., Bertram, C., Berti, M., & Karda, R. (2022). Genetic therapeutic advancements for Dravet syndrome. *Epilepsy & Behavior*, 132, 108741. doi:10.1016/j.yebeh.2022.108741

Christenson Wick, Z., & Krook-Magnuson, E. (2018). Specificity, versatility, and continual development: The power of optogenetics for epilepsy research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 151. doi:10.3389/fncel.2018.00151

Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., & De Jonghe, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1327–1332. doi:10.1086/320609

Crino, P. B. (2015). mTOR signaling in epilepsy: Insights from malformations of cortical development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4), a022442. doi:10.1101/cshperspect.a022442

Crino, P. B. (2016). The mTOR signalling cascade: Paving new roads to cure neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 12(7), 379–392. doi:10.1038/nrneurol.2016.81

Elhady, M., Youness, E. R., AbuShady, M. M., Nassar, M. S., Elaziz, A. A., Masoud, M. M., et al. (2021). Circulating glial fibrillary acidic protein and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 as markers of neuronal damage in children with epileptic seizures. *Child's Nervous System*, 37(3), 879–884. doi:10.1007/s00381-020-04920-z

Epi4K Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen, A. S., Berkovic, S. F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., et al. (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, 501(7466), 217–221. doi:10.1038/nature12439

French, J. A. (2013). P-glycoprotein expression and antiepileptic drug resistance. *The Lancet Neurology*, 12(8), 732–733. doi:10.1016/S1474-4422(13)70128-5

Fukata, Y., & Fukata, M. (2017). Epilepsy and synaptic proteins. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 1–8. doi:10.1016/j.conb.2017.02.001

Gerber, S. H., Rah, J. C., Min, S. W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., et al. (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science*, 321(5895), 1507–1510. doi:10.1126/science.1163174

Gribkoff, V. K., & Winkler, R. J. (2023). Potassium channelopathies associated with epilepsy-related syndromes and directions for therapeutic intervention. *Biochemical Pharmacology*, 208, 115413. doi:10.1016/j.bcp.2023.115413

Han, Z., Chen, C., Christiansen, A., Ji, S., Lin, Q., Anumonwo, C., et al. (2020). Antisense oligonucleotides increase Scn1a expression and reduce seizures and SUDEP incidence in a mouse model of Dravet syndrome. *Science Translational Medicine*, 12(558), eaaz6100. doi:10.1126/scitranslmed.aaz6100

Helbig, I., Scheffer, I. E., Mulley, J. C., & Berkovic, S. F. (2008). Navigating the channels and beyond: Unravelling the genetics of the epilepsies. *The Lancet Neurology*, 7(3), 231–245. doi:10.1016/S1474-4422(08)70039-5

Helbig, I., Heinzen, E. L., Mefford, H. C., & ILAE Genetics Commission. (2016a). Primer Part 1—The building blocks of epilepsy genetics. *Epilepsia*, 57(6), 861–868. doi:10.1111/epi.13381

Helbig, K. L., Farwell Hagman, K. D., Shinde, D. N., Mroske, C., Powis, Z., Li, S., et al. (2016b). Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 18(9), 898–905. doi:10.1038/gim.2015.186

Henshall, D. C., & Kobow, K. (2015). Epigenetics and epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(12), a022731. doi:10.1101/cshperspect.a022731

International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. (2018). Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies. *Nature Communications*, 9(1), 5269. doi:10.1038/s41467-018-07524-z

Jamuar, S. S., D’Gama, A. M., & Walsh, C. A. (2016). Somatic mosaicism and neurological diseases. In T. Lehner, B. L. Miller, & M. W. State (Eds.), *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry* (pp. 179–199). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-800105-9.00012-3

Jessberger, S., Nakashima, K., Clemenson, G. D., Jr, Mejia, E., Mathews, E., Ure, K., et al. (2007). Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(22), 5967–5975. doi:10.1523/JNEUROSCI.0110-07.2007

Jimenez-Mateos, E. M., & Henshall, D. C. (2013). Epilepsy and microRNA. *Neuroscience*, 238, 218–229. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.027

Kobow, K., & Blümcke, I. (2014). Epigenetic mechanisms in epilepsy. *Progress in Brain Research*, 213, 279–316. doi:10.1016/B978-0-444-63326-2.00014-4

Korotkov, A., Broekaart, D. W. M., Banchaewa, L., Pustjens, B., van Scheppingen, J., Anink, J. J., et al. (2020). microRNA-132 is overexpressed in glia in temporal lobe epilepsy and reduces the expression of pro-epileptogenic factors in human cultured astrocytes. *Glia*, 68(1), 60–75. doi:10.1002/glia.23700

Krey, I., Platzer, K., Esterhuizen, A., Berkovic, S. F., Helbig, I., Hildebrand, M. S., et al. (2022). Current practice in diagnostic genetic testing of the epilepsies. *Epileptic Disorders*, 24(5), 765–786. doi:10.1684/epd.2022.1448

Kundakovic, M., & Champagne, F. A. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(6), 1084–1093. doi:10.1016/j.bbi.2011.02.005

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., et al. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x

Lai, D., Gade, M., Yang, E., Koh, H. Y., Lu, J., Walley, N. M., et al. (2022). Somatic variants in diverse genes lead to a spectrum of focal cortical malformations. *Brain: A Journal of Neurology*, 145(8), 2704–2720. doi:10.1093/brain/awac117

Leu, C., Stevelink, R., Smith, A. W., Goleva, S. B., Kanai, M., Ferguson, L., et al. (2019). Polygenic burden in focal and generalized epilepsies. *Brain*, 142(11), 3473–3481. doi:10.1093/brain/awz292

Lindy, A. S., Stosser, M. B., Butler, E., Downtain-Pickersgill, C., Shanmugham, A., Retterer, K., et al. (2018). Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia*, 59(5), 1062–1071. doi:10.1111/epi.14074

Löscher, W., & Potschka, H. (2005). Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology*, 76(1), 22–76. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.04.006

Macdonald, R. L., & Kang, J-Q. (2009). Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. *Epilepsy Currents*, 9(1), 18–23. doi:10.1111/j.1535-7511.2008.01278.x

McNamara, J. O., Huang, Y. Z., & Leonard, A. S. (2006). Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis.

Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment, 2006(356), re12. doi:10.1126/stke.3562006re12

Miller-Delaney, S. F., Das, S., Sano, T., Jimenez-Mateos, E. M., Bryan, K., Buckley, P. G., et al. (2012). Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), 1577–1588. doi:10.1523/JNEUROSCI.5180-11.2012

Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Medicine*, 7(1), 91. doi:10.1186/s13073-015-0214-7

Myers, K. A., Johnstone, D. L., & Dymant, D. A. (2019). Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions. *Clinical Genetics*, 95(1), 95–111. doi:10.1111/cge.13414

Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, 10(2), 173–186. doi:10.1016/S1474-4422(10)70310-0

Poduri, A., & Lowenstein, D. (2011). Epilepsy genetics—past, present, and future. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(3), 325–332. doi:10.1016/j.gde.2011.01.005

Qin, S. K., Yang, Z. X., Guan, Z. W., Zhang, J. H., Ping, X., Lu, Y., et al. (2022). Exploring the association between epilepsy and depression: A systematic review and meta-analysis. *PLOS One*, 12(17), e0278907. doi:10.1371/journal.pone.0278907.

Rakhade, S. N., & Jensen, F. E. (2009). Epileptogenesis in the immature brain: Emerging mechanisms. *Nature Reviews Neurology*, 5(7), 380–391. doi:10.1038/nrneurol.2009.80

Reinson, K., Öiglanc-Shlik, E., Talvik, I., Vaher, U., Õunapuu, A., Ennok, M., et al. (2016). Biallelic CACNA1A mutations cause early onset epileptic encephalopathy with progressive cerebral, cerebellar, and optic nerve atrophy. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 170(8), 2173–2176. doi:10.1002/ajmg.a.37678

Sanz, P., Rubio, T., & Garcia-Gimeno, M. A. (2024). Neuroinflammation and epilepsy: From pathophysiology to therapies based on repurposing drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4161. doi:10.3390/ijms25084161

Singh, A., & Trevick, S. (2016). The epidemiology of global epilepsy. *Neurologic Clinics*, 34(4), 837–847. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.015

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., et al. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics*, 18(1), 25–29. doi:10.1038/ng0198-25

Staley, K. J., Soldo, B. L., & Proctor, W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), 977–981. doi:10.1126/science.7638623

Sutula, T. P., Hagen, J., & Pitkänen, A. (2003). Do epileptic seizures damage the brain? *Current Opinion in Neurology*, 16(2), 189–195. doi:10.1097/01.wco.0000063770.15877.bc

Sutula, T., He, X. X., Cavazos, J., & Scott, G. (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4844), 1147–1150. doi: 10.1126/science.2449733

Symonds, J. D., Zuberi, S. M., & Johnson, M. R. (2017). Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment. *Current Opinion in Neurology*, 30(2), 193–199. doi: 10.1097/WCO.0000000000000433

Symonds, J. D., Zuberi, S. M., Stewart, K., McLellan, A., O'Regan, M., MacLeod, S., et al. (2019). Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: A prospective population-based national cohort. *Brain: A Journal of Neurology*, 142(8), 2303–2318. doi:10.1093/brain/awz195

Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet*, 393(10172), 689–701. doi:10.1016/S0140-6736(18)32596-0

Vezzani, A., & Baram, T. Z. (2007). New roles for interleukin-1 beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Currents*, 7(2), 45–50. doi:10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x

Vezzani, A., Aronica, E., Mazarati, A., & Pittman, Q. J. (2013). Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology*, 244, 11–21. doi:10.1016/j.expneurol.2011.09.033

Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7(1), 31–40. doi:10.1038/nrneurol.2010.178

Wang, J., Lin, Z. J., Liu, L., Xu, H. Q., Shi, Y. W., Yi, Y. H., et al. (2017). Epilepsy-associated genes. *Seizure*, 44, 11–20. doi:10.1016/j.seizure.2016.11.030

Zaitsev, A. V., & Khazipov, R. (2023). Molecular and cellular mechanisms of epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12415. doi:10.3390/ijms241512415

***BORDETELLA PERTUSSIS* PATOGENEZİ**

BURCU EMİNE TEUFON ÖZTÜRK¹

1. Giriş

Gram negatif bir bakteri olan *Bordetella pertussis*, yeni doğanlarda ve bebeklerde ölümcül olabilen boğmaca adı verilen solunum yolu hastalığının primer etkenidir. Hastalık çocukluk çağı hastalığı olarak adlandırılrsa da son zamanlarda yapılan çalışmalarda patojenin ergen ve yetişkinlerde de görüldüğü bildirilmiştir. Etkili aşilar mevcut olmasına rağmen, boğmaca hem yüksek gelirli hem de düşük gelirli ülkeleri etkileyen, küresel olarak kalıcı bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Hastalık özellikle bebekler ve küçük çocuklar için tehlikeli olup, tedavi edilmediğinde veya yetersiz tedavi edildiğinde sıklıkla zatürre, nöbetler, ensefalopati ve ölüm gibi ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır (Cherry, 2012).

Tarihsel olarak boğmaca, 20. yüzyılın ortalarında yaygın aşılamanın başlamasından önce çocuk ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri olmuştur. 1940'larda tam hücreli boğmaca aşılarının (wP) uygulanması ve daha sonra bunların 1990'larda birçok ülkede aselüler boğmaca aşıları (aP) ile değiştirilmesi, hastalık insidansında belirgin bir azalmaya yol açmıştır. Ancak son yirmi yılda, aşılama oranının yüksek olduğu toplumlarda bile

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya/Türkiye, Orcid: 0000-0003-1690-9879, burcutefon@gmail.com

boğmacanın endişe verici bir şekilde yeniden ortaya çıktığı gözlenmiştir (Mooi, van Loo & King, 2001; Clark, 2014; Cherry & Doustmohammadi, 2022). Aşılama kapsamının yüksek olduğu birçok ülkede boğmacanın yeniden ortaya çıkması, epidemiyolojisinin ve patogenezinin karmaşıklığının altını çizmektedir. Bu yeniden ortaya çıkış, bağışıklığın azalması, patojen adaptasyonu, artan farkındalık ve hastalığın sağlık birimlerince raporlamasındaki eksiklikler ve kullanılan aşılarda potansiyelleri gibi faktörlere bağlanmaktadır (Cherry, 1996; Loch, 2016;). Ayrıca, son zamanlarda yapılan genomik analizler, *B. pertussis*'in aşı kaynaklı seçici baskı altında devam eden bir evrim geçirdiğini ve bunun sonucunda pertaktin gibi önemli aşı antijenlerinde eksik suşların ortaya çıktığını ortaya koymuştur (Carbonetti, 2016).

Bordetella pertussis enfeksiyonu kataral, paroksizmal ve konvalesan evrelerinden oluşan uzun süreli bir seyirle karakterizedir. Çocuklarda karakteristik “boğulma” sesini takip eden paroksizmal öksürük nöbetleri ergenlerde ve yetişkinlerde daha az görülür, bu da tanıyı zorlaştırır ve eksik raporlamaya neden olur. Bu da hastalığın bulaşına devam etmesine katkıda bulunur (Kilgore & ark., 2016; Yılmaz-Çolak & Tefon-Öztürk, 2023).

Boğmacanın halk sağlığı üzerindeki etkileri morbidite ve mortalitenin ötesine uzanmaktadır. Hastalık, özellikle salgınlar sırasında önemli sağlık yükleri ve maliyetleri getirmektedir. Ayrıca, geliştirilmiş aşı formülasyonları, gelişmiş gözetim ve yeni tanı araçlarına duyulan ihtiyaç, boğmaca araştırmalarının süregelen öneminin altını çizmektedir (Kilgore & ark., 2016).

Bu bölüm, dünya üzerinde yeniden görülmeye başlayan *B. pertussis* bakterisinin mikrobiyolojik özellikleri ve patogenezi detaylandırarak okuyucular için bu alanlara kapsamlı bir genel bakış sunacaktır.

2. *Bordetella pertussis*'in Mikrobiyolojik Özellikleri

Alcaligenaceae familyasına ait olan *B. pertussis*, insanlarla sınırlı oldukça özelleşmiş bir konakçı-patojen etkileşimi sergileyen titiz bir organizmadır. Bakteri zorunlu aerobiktir, hareketli değildir

ve oksidaz pozitifdir ve genomu parazitik yaşam tarzı için özelleşmiştir (Parkhill & ark., 2003; Melvin & ark., 2014).

Bordetella cinsine ait türlerin solunum yollarında kolonize olabilmeye yetenekleri yüksektir ve bu da insanlarda ve hayvanlarda bronşiyal ve pulmoner enfeksiyonlara neden olmalarıyla sonuçlanır (Hamidou Soumana, Linz & Harvill, 2017). Cinsine ait tanımlanan 17 tür içerisinde *B. pertussis*, *B. parapertussis* ve *B. bronchiseptica* insan ve hayvanlarda solunum yolu enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen ve en çok incelenen türler olarak bilinmektedir (Mattoo & Cherry, 2005; Hamidou Soumana, Linz & Harvill, 2017; Belcher & ark., 2021). Yalnızca insanlarda enfeksiyon hastalığına neden olan *B. pertussis* ilk defa 1906 yılında bir boğmaca salgını takiben Bordet ve Gengou tarafından izole edilmiş ve isimlendirilmiştir (Cherry, 1996)

2.1 Morfoloji ve büyüme

Morfolojik olarak, *B. pertussis* mikroskop altında bir kokobasil olarak görünür. Spor oluşturmaz. Dikkat çekici morfolojik özelliklerinden biri, flagella ve pili gibi hareketlilik yapılarının olmayışdır. Bu durum, aynı cinsine ait olan fakat motil yapılar taşıyan *B. bronchiseptica* gibi türlerden ayrılmasında ayırt edici bir özelliktir (Goodnow, 1980; Loch, 2016). Elektron mikroskopisi çalışmalarında, *B. pertussis*'in hücrelerinin kapsülsüz olması nedeniyle pürüzsüz olduğu gösterilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda ince fibriller yapıların hücre yüzeyinden uzandığı bildirilmiş ve bu yapıların adhezin olarak görev aldığı söylenmektedir (Melvin & ark., 2014).

Bordetella pertussis, metabolik olarak oldukça inert bir profilde olup, sınırlı sayıda biyokimyasal reaksiyonda pozitif sonuç verir. Bu özellik, bakterinin evrimsel olarak obligat bir parazit yaşam tarzına adapte olduğunun da kanıtı olarak söylenebilir (Loch, 2016). Pozitif biyokimyasal reaksiyonlar arasında katalaz ve oksidaz aktiviteleri yer alır. Bu enzimler, aerobik solunum kapasitesini ve reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmalarını yansıtır. Ancak, çoğu klasik bakteriyolojik testte negatif sonuçlar verir: Bakteri üreaz negatif, nitrat redüktaz negatif, nitrattan

yararlanamaz, indol üretmez ve glukoz fermente edemez (Goodnow, 1980; Cherry, 1996). Bu biyokimyasal inertlik, *B. pertussis*'in laboratuvar ortamında sınırlı tanı yöntemleriyle saptanmasını zorlaştırmakta, çoğunlukla PCR gibi moleküler tekniklerin tercih edilmesine neden olmaktadır (Lee & ark., 2018).

Bordetella pertussis besinsel olarak oldukça seçicidir ve *in vitro* koşullarda büyümesi için zenginleştirilmiş özel besiyerlerine ihtiyaç duyar. Standart laboratuvarlarda kullanılan besiyerlerinde gelişemeyen bu bakteri için kan veya nişasta gibi kompleks biyolojik materyallerle desteklenmiş özel besiyerleri kullanılır. En yaygın kullanılan besiyerleri arasında Bordet–Gengou agar ve Regan–Lowe Charcoal Agar bulunmaktadır. Bu medyumlar genellikle %10 oranında defibrine koyun kanı ile zenginleştirilir ve kontaminasyonu engellemek amacıyla sefalosporin türevi antibiyotikler eklenebilir (Goodridge, Marrie & Orr, 2015; Murray, Rosenthal & Pfaller, 2021).

Bordetella pertussis'in büyüme süresi oldukça yavaştır, bu da kültüre edilirken kontaminasyon riskini artırır. Uygun ortam ve koşullar sağlansa bile, tipik koloniler 3 ila 7 gün içerisinde 35–37°C'de inkübasyon sonucunda görülebilir. Oluşan koloniler genellikle küçük, yarı saydam, parlak görünümlüdür ve karakteristik olarak “civa damlası” görünümüne sahiptir. Bu morfolojik özellik, özellikle erken dönemde tanısalla amaçla önem taşımaktadır (Cherry, 2012).

Bu bakteri çevresel stres faktörlerine, özellikle kuruma ve sıcaklık değişimlerine karşı oldukça hassastır. Bu nedenle klinik örneklerin alınmasından kültüre kadar olan süreçte dikkatli taşınma koşullarına ihtiyaç vardır. Uygun koşullar sağlanmadığında organizmanın canlılığını kaybetmesi, izolasyon oranlarının düşmesine neden olur (Mattoo & Cherry, 2005).

Hassasiyeti nedeniyle, tanı sürecinde bakterinin kültürü sıklıkla PCR gibi moleküler tekniklerle desteklenmektedir. Ancak kültür yöntemi, antibiyotik duyarlılığı çalışmaları ve epidemiyolojik analizler için hâlâ altın standart olarak kabul edilmektedir (WHO, 2015). Son yıllarda *B. pertussis*'in kültüre edilmesini kolaylaştırmak amacıyla yeni besiyeri formülasyonları ve hızlı tanı testleri

geliştirilmiştir. Ancak yine de organizmanın yavaş büyümesi ve zorlu kültivasyon gereksinimleri nedeniyle klasik kültür yöntemleri halen sınırlı başarıya sahiptir. Bu durum, boğmaca hastalığının tanı ve izlem süreçlerinde zorluklara yol açmaktadır (Kilgore & ark., 2016).

2.2 Genetik özellikler ve evrimsel adaptasyon

Bordetella pertussis genomu yaklaşık 4.1 Mb uzunluğundadır ve bu, yaklaşık 5.3 Mb büyüklüğündeki *B. bronchiseptica* genomundan önemli ölçüde küçüktür. Bu fark, *B. pertussis*'in zamanla genomunu sadeleştirilmesi (genomic streamlining) ile açıklanmaktadır. Bu evrimsel süreç, bakterinin insan konakçısına özgü parazit yaşam tarzına geçişi sırasında, doğal çevreye yaşama uyumuyla ilgili birçok genin işlevini kaybetmesi veya tamamen silinmesiyle sonuçlanmıştır (Parkhill & ark., 2003).

Bordetella pertussis genomunda, özellikle *IS481* olmak üzere çok sayıda insersiyon dizisi yer almaktadır. Bu mobil genetik elemanlar hem genetik rekombinasyona yol açmakta hem de gen bozulmalarına neden olarak genomun küçülmesine katkı sağlamaktadır (Brinig & ark., 2006; Parkhill & ark., 2003;). *IS481* dizileri, genomun yaklaşık %3'ünü oluşturur ve bu elementlerin yaygınlığı, genetik stabiliteyi olumsuz etkileyerek gen kayıplarını tetiklemiştir. Bu sürecin sonucunda, *B. pertussis* birçok metabolik yolda görevli geni, çevresel stres yanıtı genlerini ve bazı taşıyıcı proteinleri kaybetmiştir. Bu kayıplar, bakterinin konak dışındaki ortamlarda yaşama yeteneğini azaltmış; ancak buna karşılık, insan solunum epiteline bağlanma, bağışıklık sisteminden kaçınma ve patojenite gibi özellikleri ön plana çıkarmıştır (Belcher & Preston, 2015).

Bordetella pertussis, yüksek düzeyde genetik monomorfizm sergiler yani popülasyon içindeki suşlar arasında genetik çeşitlilik oldukça sınırlıdır (Bart & ark., 2010). Bu durum, genomik daralmanın yalnızca bireysel bir adaptasyon değil, aynı zamanda tür düzeyinde evrimsel bir “dar boğaz” geçirdiğini düşündürmektedir. Buna rağmen, bazı varyant genlerde (*ptxP*, *fim3* ve *prn* gibi) nokta

mutasyonlar ve delesyonlar gözlenmiştir. Bu varyasyonlar, aşılama baskısına karşı gelişen evrimsel yanıtlar olarak değerlendirilmektedir (Mooi & ark., 2009).

2.3 Metabolik kapasite

Bordetella pertussis, karbon kaynaklarının kullanımı bakımından son derece sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Genomundaki gen kayıpları, glukoz gibi karbonhidratların klasik glikoliz yoluyla metabolize edilmesini imkânsız hale getirmiştir. Özellikle glikolizin anahtar enzimi olan 6-fosfofruktokinazın eksikliği nedeniyle bu yol aktif değildir (Higgins & ark., 2012). Bu nedenle bakteri, enerji üretimini ağırlıklı olarak TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yoluyla gerçekleştirir. Bu yollar, amino asitler ve diğer konakçı kaynaklı maddelerin katabolizması ile başlatılır. Bakteri, özellikle serin, glutamat ve diğer bazı amino asitleri enerji üretiminde kullanır (Zhang et al., 2011). Amino asit metabolizması, *B. pertussis* için büyük öneme sahiptir. Bakteri, çevresel karbon kaynaklarını kullanamadığından, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için konakçıdan sağladığı amino asitlere bağımlıdır (Parkhill & ark., 2003). Buna ek olarak, azot metabolizmasına ilişkin bazı enzimler de kaybolmuştur. Örneğin, birçok bakteride yaygın olarak bulunan nitrat redüktaz enzimi bu bakteride bulunmaz; bu da anaerobik azot metabolizmasını sınırlamaktadır (Goodnow, 1980).

Metabolik kısıtlamalar yalnızca substrat kullanımında değil, aynı zamanda moleküllerin alımı için gerekli olan taşıyıcı proteinlerde de gözlenir. Genomun sadeleşmesi, birçok ABC taşıyıcı sistemi, şeker permeazları ve katabolik enzim sistemleri gibi önemli işlevleri kodlayan genlerin kaybına neden olmuştur. Bu durum, bakterinin besin alımında ve çevresel adaptasyonda zayıflamasına neden olmuş, ancak insana özgü hücre içi kaynaklara bağımlılığı artırmıştır (Melvin & ark., 2014).

2.4 Hücre duvarı yapısı ve lipooligosakkarit (LOS)

Bordetella pertussis, klasik Gram-negatif bakterilerden farklı olarak dış zarında lipooligosakkarit (LOS) barındırır; bu yapı, *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi türlerde görülen tipik lipopolisakkarit (LPS)'ten yapısal olarak farklıdır (Preston & ark., 2003). LOS, lipid A ve kısa bir oligosakkarit zincirinden oluşur ve tam bir O-antijen kısmı içermez. Bu yapı, doğrudan konak bağışıklık sistemiyle etkileşime girer (Yılmaz-Çolak & Tefon-Öztürk, 2023).

LOS, özellikle Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılığıyla doğal bağışıklık sisteminin güçlü bir uyarıcısıdır. Bu etkileşim sonucunda inflamatuvar sitokinlerin salınımı tetiklenir ve boğmaca hastalığına özgü güçlü inflamasyon cevabı oluşur (Preston & ark., 2003; Melvin & ark., 2014). Aynı zamanda adezin proteinleri, bakterinin solunum epitelinde kalıcı kolonizasyon oluşturmalarını sağlar. Bu yapıların aşı antijenleri olarak kullanılması, koruyucu bağışıklık geliştirilmesinde temel strateji olmuştur (Cherry, 2012; Yılmaz-Çolak & Tefon-Öztürk, 2023).

2.5 Virülans faktörleri ve bvgAS düzenleyici sistemi

Virülans faktörleri bakterinin solunum epiteline tutunmasını, bağışıklık sisteminden kaçmasını, konak hücrelerini etkilemesini ve enfeksiyonu sürdürmesini Patojenitei ile ilişkili bu faktörlerin ekspresyonu büyük ölçüde bvgAS iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem çevresel sinyallere yanıt olarak genetik ekspresyonu dinamik biçimde düzenler (Cotter & Jones, 2003).

Bordetella pertussis'in virülans faktörleri şu başlıklar altında incelenebilir: Adezyon faktörleri, toksinler ve diğer yapılar ve faktörler.

Bu faktörler, bakterinin enfeksiyon sürecinin her aşamasında farklı roller üstlenir ve genellikle bvgAS isimli iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından kontrol edilir (Decker & ark., 2012).

2.5.1 Adezyon faktörleri

2.5.1.1 Filamentöz hemaglütinin (FHA)

FHA, bakterinin trakeal epitel hücrelerine bağlanmasını sağlayan büyük, çok işlevli bir adezin proteindir. Aynı zamanda bağışıklık sisteminden kaçışta rol oynayan immünmodülatör etkileri de vardır. FHA, hem konak hücre reseptörleri hem de fagositik hücreler ile etkileşime girerek internalizasyonu etkileyebilir (Relman & ark., 1989; Locht & ark., 2011).

FHA, başlangıçta *phaB* geni tarafından sentezlenen yaklaşık 367 kDa büyüklüğünde bir öncül proteinden türetilir. Bu öncül protein, bakteriyel tip V salgı sistemi aracılığıyla periplazmaya aktarılır ve burada proteolitik işlemle olgun ~220 kDa'lık formuna dönüştürülür. FHA'nın olgun formu, birçok tekrar içeren modüler bir yapıya sahiptir ve farklı bağlanma bölgeleri aracılığıyla hem hücresel hem de hücre dışı matris bileşenleri ile etkileşim kurabilir (Locht & Keith, 1986; Coutte & ark., 2001).

FHA'nın en belirgin rolü, *B. pertussis*'in solunum epiteline ve fagositik olmayan hücrelere bağlanmasını sağlamaktır. FHA, özellikle galaktoz–fukoz–N-asetilglukozamin içeren reseptör yapıları ve heparan sülfat proteoglikanlar gibi hücre yüzeyi moleküllerine yüksek afiniteli bağlanma yeteneğine sahiptir (van den Berg & ark., 1999). FHA, ayrıca laminin ve fibronektin gibi hücre dışı matris proteinlerine bağlanarak kolonizasyonu artırır ve konak hücre etkileşimini güçlendirir (Leininger & ark., 1991).

FHA, sadece yapısal bir adezin değil, aynı zamanda konak bağışıklık sistemini modüle eden bir faktördür. Fagositlere bağlandıktan sonra proinflamatuvar sitokinlerin salımını etkileyebilir, fagositozu azaltabilir ve apoptozu indükleyebilir (Belcher & ark., 2021). Bu özellikleriyle FHA, *B. pertussis*'in inatçı enfeksiyon yeteneğine katkıda bulunur.

2.5.1.2 Fimbriya proteinleri (Fim2, Fim3)

Fimbriyal yapılar bakterinin yüzeyinde yer alan filamentöz protein yapılar olup bakterinin solunum yolu epitel hücrelerine tutunmasında rol oynar. Bu fimbriyalar, bakteriyel adezyonun yanı sıra immün sistemin uyarılması, koloni formasyonu ve konak savunmalarından kaçış gibi birçok patojenik süreçte işlev görür. *B. pertussis*'te tanımlanmış başlıca fimbriyal proteinler fimbriya tip 2 (Fim2), fimbriya tip 3 (Fim3) ve daha az yaygın olan FimX ve diğer alt tiplerdir. Bu proteinler, bakteriyel yüzeyde filamentöz uzantılar şeklinde yer alır ve *fim* gen kümesi tarafından kodlanır. Genellikle 22–25 kDa arası küçük proteinlerdir (Mooi, Van Loo & King, 2001).

Bu bakteriye ait fimbriyalar, çoğunlukla fimbrin adı verilen yapısal alt birimleri kodlayan *fim2* ve *fim3* genlerinden, şaperon görevi gören FimC'yi kodlayan *fimC* geninden, membranda transportta görev alan FimD'yi kodlayan *fimD* geninden ve ürünleri yardımcı proteinler olarak görev alan *fimA*, *fimX*, *fimN* genlerinden oluşan bir operon yapısında organize edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu, BvgAS adlı iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından sıkı şekilde kontrol edilir. Bu sistem, bakterinin çevresel koşullara göre fimbrial ekspresyonunu düzenlemesini sağlar (Chen & Stibitz, 2019).

Bordetella pertussis izolatları, taşıdıkları fimbrial tiplere göre Fim2, Fim3 veya her ikisini içerebilir (Fim2/3). Bu farklılıklar, epidemiyolojik takip ve bağışıklık kaçışı açısından önemlidir. Yapılan genomik çalışmalar, aşılama sonrası seçim baskısıyla bazı fimbrial tiplerin daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu durum, aşı-antijen uyumsuzluğu olasılığını ve aşıların yeni dolaşımda olan suşlara karşı koruyuculuğunun azalma ihtimalini de doğurur (Mooi & ark., 2009).

2.5.1.3 Pertaktin

Pertaktin, *B. pertussis* tarafından üretilen bir oto-transporter dış membran proteini olup, bakterinin solunum yollarına tutunmasını ve konak bağışıklık sisteminden kaçışını sağlayan önemli bir adezin ve virülans faktörüdür. Konak hücre üzerindeki RGD (arjinin-glisin-

aspartik asit) motifleri aracılığıyla integrin benzeri reseptörlere bağlanabilir (Emsley & ark., 1996). Günümüzde kullanılan asellüler boğmaca aşılarında (aP) bulunan anahtar antijenlerden biridir (Belcher & Preston, 2015; Melvin & ark., 2014).

Pertaktin proteini, yaklaşık 69 ila 93 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip olup, farklı izoformları bulunan bir yüzey proteinidir. Bu protein, *B. pertussis* genomunda yer alan *prn* geni tarafından kodlanmaktadır ve oto-transporter (tip V) protein ailesine aittir. Yapısal olarak modüler bir organizasyona sahiptir: Protein, N-terminalde yer alan ve hücre dışında sergilenen fonksiyonel pasaj bölgesi ile C-terminalde bulunan β -barrel yapısından oluşur. C-terminal β -barrel bölgesi, proteinin dış membranı aşmasını sağlarken, fonksiyonel N-terminal kısmı bakteriyel yüzeyde aktif rol oynar. *B. pertussis*'in dış membranını geçtikten sonra bu protein, proteolitik olarak işlenerek yüzeye yerleşir ve burada virülansla ilişkili işlevlerini yerine getirir (Mattoo & Cherry, 2005).

Pertaktin geninde çeşitli nükleotid değişiklikleri, insersiyonlar ve delesyonlar gözlenmiştir. Bu genetik varyasyonlar sonucunda farklı pertaktin alelleri, örneğin *prn1* ve *prn2* gibi tipler, ortaya çıkmaktadır. Aşılarda pertaktin antijeninin kullanılması, bu antijene karşı bağışıklık baskısının oluşmasına yol açmıştır. Bu bağışıklık baskısı altında, özellikle yüksek aşılama oranlarına sahip ülkelerde pertaktin-negatif *B. pertussis* suşlarının giderek daha sık izole edildiği bildirilmektedir (Lam & ark., 2014). Bu suşlarda genellikle *prn* genine *IS481* elemanının insersiyonu sonucu genetik inaktivasyon meydana gelmektedir. Bu durum, ilgili suşlara aşıya karşı bir seçim avantajı kazandırmış olabilir. Ancak bazı çalışmalar, bu pertaktin-negatif suşların virülanslarının daha düşük olabileceğine de işaret etmektedir (Hegerle & Guiso, 2014).

Pertaktin, asellüler boğmaca aşılarının (DTaP, Tdap) çoğunda yer almakta ve bağışıklık sistemini spesifik IgG antikorlarının üretimi yönünde uyarmaktadır. Bu antikorlar, *B. pertussis*'in konak hücrelere adezyonunu engelleyerek koruyucu bağışıklık sağlar. Bununla birlikte, pertaktin-negatif suşların görülme sıklığının artması, yalnızca pertaktine karşı geliştirilen

başıklığın hastalığı önlemede yetersiz olabileceğini ortaya koymaktadır (Pawloski & ark., 2013; Hegerle & Guiso, 2014).

Pertaktin-negatif suşların klinik ve epidemiyolojik olarak ortaya çıkması, mevcut aşılama stratejilerinin yeniden değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu bağlamda, aşılarda yalnızca pertaktin değil, aynı zamanda filamentöz hemaglutinin, pertussis toksini ve fimbrial antijenler gibi diğer hedeflere de yönelmesi önem kazanmaktadır. Ayrıca, epidemiyolojik izleme açısından pertaktin pozitif ve negatif suşların ayrımı, *B. pertussis*'in evrimsel dinamiklerini takip edebilmek adına kritik bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Xu & ark., 2019; Barkoff & ark., 2024).

2.5.2 Toksinler

2.5.2.1 Pertussis toksini (PT ya da PTx)

Pertussis toksini (PT), bakterinin solunum yolu epitel hücrelerine kolonizasyonunu kolaylaştırır ve hastalığın sistemik belirtilerinin çoğundan sorumludur (Melvin, Scheller, Miller & Cotter, 2014). *B. pertussis*'in en önemli ve immünmodülatör etkileri olan virülans faktörlerinden biridir. PT, AB_s tipi bir ekzotoksindir ve toplamda altı alt birimden oluşur: A alt birimi (S1), toksinin katalitik kısmıdır ve ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. B alt birimi, beş alt birimden oluşur: S2, S3, iki adet S4 ve S5. Bu alt birimler, toksinin hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını sağlar. Bu yapı, toksinin hem bağlanma hem de hücre içi toksik etkiler göstermesini mümkün kılar (Locht & Keith, 1986).

Toksin hedef hücrelerde bulunan Gi/o proteinlerini ADP-ribozilasyon yoluyla inaktive eder. Bu inaktivasyon, adenilat siklaz enziminin kontrolsüz bir şekilde aktive olmasına ve hücre içi cAMP düzeylerinin artmasına neden olur. Artan cAMP düzeyleri, hücre içi sinyal iletim yollarının bozulmasına ve birçok fizyolojik etkinin ortaya çıkmasına yol açar (Hsia 1984). Bu etkiler arasında bağışıklık sisteminin baskılanması önemli bir yer tutar; özellikle fagositik hücrelerin kemotaksisi ve aktivasyonu engellenir. Ayrıca, kan

dolaşımında lenfosit sayısında artışa neden olan lenfositoz ve insülin salınımını artırarak hipoglisemiye yol açabilecek endokrin etkiler de gözlenmektedir (Carbonetti, 2015).

PT, hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarını baskılayabilir. Nötrofil ve makrofajların enfeksiyon bölgesine göçü engellenir, kemokin üretimi azaltılır ve lenfosit proliferasyonu inhibe edilir. Bu immün modülatör etkiler, patojenin konak savunma mekanizmalarından kaçınmasına olanak tanır (Klimova & ark., 2022).

PT, aynı zamanda asellüler boğmaca aşılarının (DTaP, Tdap) temel bileşenlerinden biridir. Aşıda kullanılan PT formu genellikle inaktive edilmiş, yani toksoid haline getirilmiş bir versiyondur. Bu form, spesifik IgG antikorlarının oluşumunu teşvik eder ve toksine karşı nötrolizan bağışıklık geliştirir. Ancak yalnızca PT'ye karşı bağışıklık, enfeksiyonu önlemede tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle aşılarda PT ile birlikte FHA, pertaktin ve fimbrial antijenler gibi diğer virülans faktörleri de antijen olarak kullanılmaktadır (Cherry, 2012).

Bu toksin boğmaca hastalığının klasik klinik bulgularının – özellikle şiddetli ve uzun süren öksürük nöbetlerinin, lenfositozun ve solunum yollarında mukus birikiminin – ortaya çıkmasında merkezi bir rol oynar. Ayrıca, sistemik etkileri nedeniyle hastalığın şiddetini artırabilir ve özellikle bağışıklık sistemi henüz tam gelişmemiş olan bebeklerde daha ağır klinik tabloların gelişmesine neden olabilir (Cherry, 2012; Nguyen & ark., 2020).

2.5.2.2 Adenilat siklaz toksini (CyaA)

Adenilat siklaz toksini (ACT) ya da CyaA, *B. pertussis*'in patogenezinde çok önemli bir rol oynayan, bifonksiyonel bir ekzotoksindir. Hem adenilat siklaz aktivitesi gösterir hem de por oluşturma özelliği taşır. Bu toksin, öncelikle fagositik hücreleri hedef alarak bağışıklık sistemini baskılar ve bakterinin konak savunmalarından kaçmasına yardımcı olur (Aktories & Barbieri, 2005; Guiso, 2017).

Bu toksin, *cyaA* geni tarafından kodlanmakta ve yaklaşık 1706 amino asit uzunluğunda büyük bir protein olarak sentezlenmektedir. ACT, RTX (repeats-in-toxin) ailesinin bir üyesidir ve modüler bir yapıya sahiptir. Protein yapısında, N-terminalde yer alan yaklaşık 400 amino asitlik bir adenilat siklaz bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge kalmodulin-bağımlı aktivite göstererek ATP'yi cAMP'ye çevirir. C-terminalde ise hemolitik bir RTX domaini yer alır; bu yapı hedef hücre zarında gözenekler oluşturarak hücresel permeabiliteyi artırır. Ayrıca C-terminaldeki kalsiyum bağlayıcı tekrar bölgeleri, hem toksinin stabilitesini sağlamakta hem de konak hücre yüzeyine bağlanmasında rol oynamaktadır. ACT'nin bakteriden salınımı ise HlyB-D adlı ABC taşıyıcı sistem proteinleri ve dış membran kanalı TolC aracılığıyla gerçekleşir (Glaser & ark., 1988; Chen & ark., 2010).

Toksin, konak hücreye reseptör aracılığına ihtiyaç duymadan bağlanabilmekle birlikte, özellikle CD11b/CD18 (CR3, Mac-1) integrin reseptörünü taşıyan hücrelere—örneğin makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücrelere—yüksek özgüllükle tutunur (Vojtova, Kamanova & Sebo, 2006). Hücreye giriş sürecinde ACT, hedef hücre zarıyla doğrudan etkileşime girer ve adenilat siklaz bölgesi hücre sitoplazmasına transloke olur. Sitoplazmada kalmodulin ile etkileşime girerek aktifleşir ve hücre içi ATP'yi cAMP'ye çevirir. Hücre içi cAMP seviyesinin aşırı artışı, bağışıklık hücrelerinde kemotaksisin baskılanması, fagositik aktivitenin engellenmesi, oksidatif patlama kapasitesinin düşürülmesi, sitokin üretiminin bozulması ve apoptozun tetiklenmesi gibi çeşitli işlev bozukluklarına yol açar. Bu etkiler, bakterinin bağışıklık sisteminden korunmasını ve enfeksiyonun kalıcılığını destekler (Confer & Eaton, 1982; Carrica & ark., 2023).

CyaA, immün modülasyon kapasitesi nedeniyle aşı geliştirme çalışmaları açısından da önem arz etmektedir. ACT, yeni nesil aşı stratejilerinde yalnızca antijen olarak değil, aynı zamanda taşıyıcı sistem (antigen delivery vehicle) olarak da değerlendirilmektedir. Rekombinant CyaA proteinleri, heterolog antijenleri taşıyacak şekilde modifiye edilerek dendritik hücrelere

sunulmak üzere kullanılabilmektedir (Scanlon, Skerry & Carbonetti, 2019).

ACT'nin klinik önemi yalnızca patogeneze ile sınırlı değildir. Bu toksine karşı gelişen antikorlar, *B. pertussis* enfeksiyonlarının serolojik tanısında potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, ACT-negatif mutant suşların hayvan modellerinde daha az virülen olduğu gözlemlenmiş, bu da onu zayıflatılmış canlı aşı adayları için potansiyel bir hedef haline getirmiştir (Carbonetti, 2010).

2.5.2.3 Trakeal sitotoksin (TCT)

Bordetella pertussis'in enfeksiyon sürecinde konak epitel dokusuna verdiği hasarın önemli bir nedeni olan trakeal sitotoksin (TCT), bakterinin patogeneze görev alan özgün ve oldukça etkili bir toksindir. TCT, bakteri tarafından sentezlenip aktif şekilde salgılanan bir protein değil, peptidoglikan yapısının parçalanmasıyla açığa çıkan küçük bir hücre duvarı fragmentidir. Bu yönüyle, klasik anlamda bir protein toksinden ziyade bir metabolik ürün olarak tanımlanabilir. Ancak fizyolojik etkileri son derece güçlü ve konak hücresinde doku tahribatı oluşturabilecek düzeydedir (Kessie & ark., 2021).

TCT, peptidoglikan yapısının lizozim benzeri enzimlerle yıkımı sonucunda ortaya çıkan 1,6-anhydro N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-diaminopimelyl-D-alanine (MurNAc-tetrapeptid) yapısında küçük bir muropeptid olarak tanımlanır. Bu toksin, bakterinin otolizin aktivitesi sırasında hücre duvarından ayrılarak çevreye salınır ve hedef konak hücrelere ulaşarak inflamasyon ve doku yıkımı başlatır (Folkening & ark., 1987).

TCT'nin en belirgin etkisi, solunum yolu epiteli üzerinde bulunan silialı hücreler (silia içeren hücreler) üzerinde görülür. Bu toksin, bu hücrelerin silier aktivitesini durdurur ve zamanla bu hücrelerin ölümüne yol açar. Özellikle trakeal epitelde silier kaybı, mukosiliyer temizleme mekanizmasının bozulmasına ve bakterinin mukozal yüzeylerde uzun süre kalmasına neden olur. Bu olay, öksürük refleksinin şiddetlenmesine ve hastalığın klasik spasmodik

öksürük semptomlarının ortaya çıkmasına katkı sağlar (Flak, & Goldman 1998).

TCT'nin bu toksik etkileri, büyük ölçüde konak bağışıklık sistemi hücrelerinde yer alan nöd benzeri reseptörler (NOD1) aracılığıyla algılanmasından kaynaklanır. TCT, NOD1'i aktive ederek nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolunu uyarır ve proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) salınımını tetikler. Böylece sadece epitel hasarına değil, aynı zamanda sistemik inflamatuvar yanıtı da yol açar (Kessie & ark., 2021).

TCT, ayrıca lipooligosakkarit (LOS) ile sinerjistik olarak etki gösterir. Bu iki molekül birlikte konak hücrelerde sitokin salınımını sinerjik biçimde uyatarak daha güçlü bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkarır (Cookson & ark, 1989).

Aşılama açısından bakıldığında, TCT proteik bir yapı taşımadığı için doğrudan asellüler boğmaca aşılarının bir bileşeni değildir. Ancak, TCT'nin konak savunması üzerindeki immünolojik etkileri, enfeksiyon sonrası gelişen bağışıklık yanıtlarının anlaşılması ve yeni nesil aşı stratejilerinin tasarlanması açısından önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Szymkowicz, Dey & McMahon, 2021).

2.5.3 Diğer yapılar ve faktörler

2.5.3.1 Lipooligosakkarit (LOS)

Bordetella pertussis'in hücre duvarında yer alan önemli bir yapısal bileşen olan lipooligosakkarit (LOS), bakterinin patogeneğinde ve konak bağışıklık sistemiyle etkileşiminde merkezi bir rol oynar. LOS, Gram-negatif bakterilerin çoğunda bulunan lipopolisakkarite (LPS) benzer bir yapıya sahip olmakla birlikte, ondan farklı olarak uzun O-antijen zincirlerine sahip değildir. Bu özelliğiyle LOS, daha kısa ve daha sabit bir yapıya sahip olup, *B. pertussis*'in immün sistemle olan etkileşiminde farklı bir biyolojik profil sergiler (Preston & ark., 2003).

Bordetella pertussis'e ait LOS, tipik olarak üç ana bölgeden oluşur: Lipid A, hidrofobik kısmı oluşturur ve konak hücrelerde Toll-like reseptör 4 (TLR4) üzerinden immün yanıtı tetikler. Yapısal olarak difosforil hekzosamin içerir ve endotoksik etkiye sahiptir. Merkez (core) oligosakkarit, lipid A'ya kovalent bağlıdır ve çeşitli şeker alt birimlerinden oluşur. Bu bölge LOS'un özgünlüğünü ve biyolojik aktivitesini belirler. LOS'a ait O-antijen zinciri yoktur. Bu, LOS'u klasik LPS'ten ayıran en temel özelliktir. O-antijen eksikliği nedeniyle LOS, bağışıklık sisteminden daha kolay fark edilebilir hale gelir, fakat bağışıklık kaçıışı stratejilerini de farklılaştırır. Yapısal olarak LOS, *Neisseria meningitidis* gibi diğer patojen bakterilerin LOS yapısına benzerlik gösterir, fakat *B. pertussis*'in LOS'u, virülans açısından benzersiz biyolojik etkiler taşır (Brodeur & ark., 1993).

Bordetella pertussis tarafından üretilen lipooligosakkarit (LOS), bakterinin önemli bir virülans faktörü olup konak bağışıklık sistemiyle doğrudan etkileşime girer. LOS, konak hücre yüzeyinde bulunan Toll-like reseptör 4 (TLR4) aracılığıyla tanınır ve bu tanıma olayının ardından doğuştan gelen bağışıklık yanıtı aktive edilir. TLR4'ün uyarılması, özellikle nükleer faktör- κ B (NF- κ B) sinyal yollarının etkinleşmesine yol açar ve bunun sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin üretimi belirgin şekilde artar. Bu inflamatuvar yanıt, enfeksiyonun erken dönemlerinde bakterinin kontrol altına alınmasına yardımcı olmakla birlikte, aşırı veya kontrolsüz inflamasyon durumunda bronşit, lökositöz ve doku hasarı gibi patolojik etkiler ortaya çıkabilir (Roberts & ark., 2008).

LOS'un patojenite üzerindeki etkisi yalnız başına sınırlı kalmamakta, aynı zamanda *B. pertussis*'in bir diğer önemli toksini olan TCT ile sinerjistik bir etki oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, LOS'un TCT ile uygulanması durumunda özellikle IL-1 üretiminin anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir. Bu sinerjistik etki, solunum yollarındaki epitel hasarını ve inflamatuvar sürecin şiddetini belirgin ölçüde artırarak boğmaca patogenezine katkı sağlamaktadır (Kessie & ark., 2021)

LOS'un kısa yapısı, antijenik çeşitlilik oluşturma yeteneğini sınırlasa da konak tarafından daha kolay tanınmasını sağlayabilir. Bu durum, bakterinin daha akut enfeksiyonlar oluşturmaya ve hücre duvarının immünojenitesini artırmasına neden olur. Bununla birlikte, bazı *B. pertussis* izolatlarında LOS'un yapısında meydana gelen küçük değişikliklerin immün tanımayı etkileyebildiği bildirilmiştir (King & ark., 2013).

Asellüler boğmaca aşılarında, LOS genellikle doğrudan bir antijen olarak yer almaz çünkü yapısı oldukça değişkendir ve endotoksik etkileri sistemik inflamasyona neden olabilir. Ancak, bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri nedeniyle LOS türevleri veya modifiye lipid A yapıları, yeni nesil aşılarda adjuvan olarak değerlendirilmektedir. Buna ek olarak, LOS'a karşı oluşan spesifik antikorlar, enfeksiyon tanısında potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilecek niteliktedir (Kessie & ark., 2021).

2.5.3.2 Biyofilm oluşumu

Bordetella pertussis, yalnızca akut solunum yolu enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen bir patojen değil, aynı zamanda konak mukozasında uzun süreli kalıcılığı mümkün kılan gelişmiş çevresel adaptasyon stratejilerine sahip bir organizmadır. Bu stratejilerden biri, bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesidir. Biyofilmler, bakterilerin kendilerini dış çevreden korumak amacıyla ürettikleri ekstraselüler polimerik bir matriks içerisinde, yüzeylere tutunarak oluşturdukları çok hücreli yapılardır. Bu yapılar hem antibiyotiklere hem de konak bağışıklık sistemine karşı direnç sağlar (Cattelan & ark. 2016).

Bordetella pertussis biyofilmleri; bakteri hücrelerinin, yapışkan bir matriks içinde kümelenerek oluşturduğu organize yapılar olup, genellikle ekstraselüler DNA (eDNA), polisakkaritler, proteinler ve fimbrial yapılar içeren bir matriksten oluşur. Matriksin önemli bileşenlerinden biri filamentöz hemaglutinin (FHA)'dır. FHA hem biyofilm oluşumunda hem de bakteri-bakteri ve bakteri-yüzey etkileşimlerinde kritik rol oynar. FHA'sız mutant suşlarda

biyofilm formasyonu belirgin şekilde azalmaktadır (Serra & ark., 2011).

Biyofilm oluşumu, *B. pertussis*'te BvgAS adı verilen iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından kontrol edilir. BvgAS, bakterinin çevresel sinyallere yanıt vererek virülans genlerini ifade etmesini sağlayan bir sinyal iletim sistemidir. Bvg+ fazında (virülans genleri aktif), adezin ve toksin üretimi artar; bu da biyofilm oluşumunu destekler. Ancak bazı çalışmalar, biyofilm oluşumunun sadece Bvg+ fazında değil, Bvg-intermediyer fazında da gerçekleşebileceğini göstermiştir. Bu durum, *B. pertussis*'in biyofilm formasyonunun çok katmanlı ve dinamik bir süreç olduğunu ortaya koymaktadır (Serra & ark., 2011).

Bordetella pertussis biyofilmleri, bakterinin uzun süreli koloni oluşturmaya, tekrar enfeksiyonlara ve subklinik taşıyıcılığa neden olabilir. Bu özellik, özellikle aşılanmış bireylerde görülen hafif ya da asemptomatik enfeksiyonların açıklanmasında önemli bir faktördür. Biyofilm formasyonunun, bakterinin üst solunum yollarında kalıcılığını artırarak, kişiden kişiye bulaşmayı kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Cattelan & ark. 2016).

Ayrıca, biyofilmler bakterilerin antibiyotik tedavilerine karşı dirençli hale gelmesinde etkili olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler, düşük metabolik hızları, fizyolojik heterojenlikleri ve matriks bariyeri nedeniyle antimikrobiyal ajanlara daha az duyarlıdır. Bu durum, özellikle uzun süren öksürük semptomlarının ve tedaviye yanıtız vakaların açıklanmasında önemli bir etmendir (Cattelan & ark. 2016).

2.5.4 BvgAS sistemi

Bordetella pertussis'in patogenezi de çevresel sinyalleri algılayarak virülans faktörlerinin gen ekspresyonunu koordine eden karmaşık bir düzenleyici sistem olan BvgAS iki bileşenli sistem yer alır. Bu sistem, bakterinin patojenitesini belirleyen başlıca kontrol noktasıdır ve konakta kolonizasyon, bağışıklık sisteminden kaçış ve enfeksiyonun sürdürülmesi gibi süreçleri yönlendirir (Cotter & Jones, 2003; Melvin & ark., 2014).

BvgAS sistemi, bakterilerde yaygın olarak bulunan klasik bir iki bileşenli düzenleyici sistem (Two-Component Regulatory System, TCRS) modelini izler. İki temel protein bu sistemin merkezindedir: BvgS zar-bağı bir sensör kinaz proteindir. Çevresel sinyalleri (örn. ısı, magnezyum sülfat, nikotin amid gibi kimyasal stres faktörleri) algılar ve ardından otofosforilasyon yoluyla aktive olur. BvgA sitoplazmik bir yanıt düzenleyici proteindir. Fosforile BvgS tarafından fosfat grubu aktarımıyla aktive edilir ve DNA'ya bağlanarak spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Moon & ark, 2017; Chen & Stibitz, 2019). Fosforile BvgA (BvgA~P), yüksek afiniteli hedef promotör bölgelerine bağlanarak birçok virülans geninin ekspresyonunu doğrudan düzenler.

BvgAS sistemi, çevresel koşullara bağlı olarak *B. pertussis*'in gen ekspresyon profilini üç temel fenotipe ayırır:

Bvg⁺ (aktif virülens fazı): Konak ortamında baskın olan fazdır. Virülans genleri (örneğin *ptx*, *fhaB*, *prn*, *fim*) yüksek düzeyde eksprese edilir.

Bvg⁻ (avirulent faz): Düşük sıcaklık ya da MgSO₄ gibi indükleyici ajanların varlığında tetiklenir. Virülans genleri susturulur, çevresel yaşamla ilişkili bazı genler (örneğin flagellum yapısı gibi) eksprese olur.

Bvgⁱ (intermediyer faz): Geçiş fazıdır. Bazı virülans genleri düşük düzeyde ekspresyon gösterirken, diğerleri baskılanır (Boucher & Stibitz, 1995). Bu faz geçişleri bakteriye çevresel değişkenliğe karşı yüksek esneklik kazandırır.

BvgAS sistemi, *B. pertussis*'in virülens repertuarının tamamına yakınına doğrudan ya da dolaylı olarak kontrol eder. bvgA~P tarafından aktive edilen genler “*bvg-activated genes* (*vags*)”, baskılananlar ise “*bvg-repressed genes* (*vrgs*)” olarak adlandırılır (Stibitz, 1994).

bvg ile aktive edilen başlıca genler şunlardır:

ptx operonu – Pertussis toksini (PT)

fhaB – Filamentöz hemaglutinin (FHA)

prn – Pertaktin

fim2/fim3 – Fimbrial proteinler

cyaA – Adenilat siklaz toksini

bopABD – Tip III sekresyon sistemi proteinleri (Melvin & ark., 2014)

bvg tarafından baskılanan genler genellikle çevresel hayatta kalma ve metabolik esneklikle ilişkilidir, ancak *B. pertussis*'te bu genler, genomik daralma nedeniyle büyük ölçüde silinmiştir.

BvgA~P'nin hedef gen promotörlerine bağlanması, transkripsiyonel aktivasyonun anahtarıdır. Bu bağlanma genellikle promotor bölgesindeki tandem tekrar dizilerine olur. Gen ekspresyon seviyeleri, bu tekrarların sayısı ve dizilim motiflerine olan afinitesi ile orantılıdır. Ayrıca bazı genlerde BvgA~P, RNA polimeraz ile doğrudan etkileşerek transkripsiyonel başlatmayı kolaylaştırır. Bu durum, gen ekspresyonunun yukarıda bahsedilen ince ayarla kontrolünü mümkün kılar (Moon & ark., 2017).

BvgAS sistemi tarafından düzenlenen bu antijenlerin birçoğu aselüler boğmaca aşılarında yer alır. Aşı baskısı altında, *ptxP3* varyantı gibi yeni promotor alellerinin ve Prn-negatif suşların ortaya çıktığı gözlenmiştir (Mooi & ark.,2009; Belcher & Preston, 2015).

3. Sonuç

Bordetella pertussis, insanlara özgü olan ve yalnızca bu konağı enfekte edebilen, yüksek bulaşıcılığa sahip bir bakteridir. Bu mikroorganizmanın neden olduğu boğmaca hastalığı, özellikle bebeklerde ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir. Aşılamanın küresel düzeyde yaygınlaşmasına rağmen, son yıllarda boğmaca insidansında gözlenen artış hem mikrobiyolojik hem de epidemiyolojik açıdan yeniden değerlendirilmesi gereken bir durumdur. Bu artışın altında yatan nedenler arasında aşı kaynaklı bağışıklığın zamanla azalması, patojenin antijenik yapısında meydana gelen değişimler, pertaktin-negatif suşların ortaya çıkışı ve tanı yöntemlerindeki gelişmeler yer almaktadır.

Moleküler düzeyde incelendiğinde, *B. pertussis*'in patogeneğinde başrol oynayan bvgAS regulonuna bağılı olarak ekspresse edilen çeşitli adezinler ve toksinler, bakterinin konak dokularına bağlanmasını, immün sistemden kaçmasını ve hastalığın karakteristik semptomlarını oluşturmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, sub-minimal inhibitör konsantrasyonlardaki antibiyotiklerin (özellikle makrolidlerin) *B. pertussis*'in virülans gen ekspresyonlarını, biyofilm oluşturma yeteneğini ve büyüme hızını anlamlı şekilde etkileyebildiğini göstermektedir. Bu bulgular, sadece tedavi stratejileri açısından değil, aynı zamanda yeni aşılama ve ilaç geliştirme yaklaşımları açısından da önemli ipuçları sunmaktadır.

Ayrıca, halihazırda kullanılan aselüler aşılardan uzun dönemli koruyuculuk düzeyinin sınırlı olduğu; bu nedenle daha geniş kapsamlı ve kalıcı bağışıklık sağlayacak yeni aşı stratejilerine ihtiyaç duyulduğu açıktır. Maternal aşılama programları, bağışıklama takvimlerinin gözden geçirilmesi ve varyant suşlara karşı çapraz koruyuculuk sağlayacak aşı bileşenlerinin geliştirilmesi, boğmaca ile mücadelede kritik adımlardır.

Sonuç olarak, boğmaca hastalığı ve etkeni *B. pertussis*'e dair güncel mikrobiyolojik, moleküler ve epidemiyolojik bilgilerin sentezlenmesi hem klinik hem de halk sağlığı uygulamalarında daha etkili koruma ve müdahale stratejilerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır. Bu bağlamda, disiplinler arası yaklaşım ve sürekli bilimsel güncelleme, boğmaca ile mücadelede sürdürülebilir başarının temelidir.

Not: Bu çalışmanın hazırlanmasında, bazı metinlerin yapılandırılması ve referansların düzenlenmesi gibi aşamalarda OpenAI tarafından geliştirilen ChatGPT (GPT-4) yapay zekâ destekli dil modeli yardımcı araç olarak kullanılmıştır. Nihai içerik, yazar tarafından kontrol edilmiş ve bilimsel doğruluğu sağlanmıştır.

Kaynakça

Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature reviews. Microbiology*, 3(5), 397–410. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1150>

Amirthalingam, G., Gupta, S., & Campbell, H. (2013). Pertussis immunisation and control in England and Wales, 1957 to 2012: a historical review. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(38), 20587. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20587>

Barkoff, A. M., Kastrin, T., Seme, K., Vitek, M. G., Mertsola, J., & He, Q. (2024). Prevalence of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Slovenia. *Emerging infectious diseases*, 30(11), 2429–2432. <https://doi.org/10.3201/eid3011.231393>

Bart, M. J., van Gent, M., van der Heide, H. G. J., et al. (2010). Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics*, 11, 627.

Belcher, T., & Preston, A. (2015). *Bordetella pertussis* evolution in the (functional) genomics era. *Pathogens and disease*, 73(8), ftv064. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv064>

Belcher, T., Dubois, V., Rivera-Millot, A., Locht, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2021). Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*, 12(1), 2608–2632.

Brinig, M. M., Register, K. B., Ackermann, M. R., & Relman, D. A. (2006). Genomic features of *Bordetella parapertussis* clades with distinct host species specificity. *Genome biology*, 7(9), R81. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r81>

Brodeur, B. R., Martin, D., Hamel, J., Shahin, R. D., & Laferrière, C. (1993). Antigenic analysis of the saccharide moiety of the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis*. *Springer seminars in immunopathology*, 15(2-3), 205–215.
<https://doi.org/10.1007/BF00201101>

Carbonetti N. H. (2016). *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Current opinion in infectious diseases*, 29(3), 287–294.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000264>

Carbonetti, N. H. (2015). Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathogens and Disease*, 73(8), ftv073. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv073>

Carriça, M. D. C., Gorgojo, J. P., Lamberti, Y. A., Valdez, H. A., & Rodriguez, M. E. (2023). *Bordetella parapertussis* adenylate cyclase toxin promotes the bacterial survival to the encounter with macrophages. *Microbial pathogenesis*, 174, 105898.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105898>

Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O. M., & Deora, R. (2016). *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathogens and disease*, 74(1), ftv108.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>

Chen, Q., & Stibitz, S. (2019). The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Current opinion in microbiology*, 47, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.01.002>

Cherry J. D. (1996). Historical review of pertussis and the classical vaccine. *The Journal of infectious diseases*, 174 Suppl 3, S259–S263. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_3.s259

Cherry, J. D. (2012). Epidemic pertussis in 2012—The resurgence of a vaccine-preventable disease. *New England Journal*

of *Medicine*, 367(9), 785–787.
<https://doi.org/10.1056/NEJMp1209051>

Cherry, J. D., & Doustmohammadi, S. (2022). Pertussis vaccines. *Current Opinion in Pediatrics*, 34(2), 126–131.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001108>

Clark, T. A. (2014). Changing pertussis epidemiology: Everything old is new again. *The Journal of infectious diseases*, 209(7), 978–981. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu001>

Confer, D. L., & Eaton, J. W. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* (New York, N.Y.), 217(4563), 948–950.
<https://doi.org/10.1126/science.6287574>

Cookson, B. T., Cho, H. L., Herwaldt, L. A., & Goldman, W. E. (1989). Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 57(7), 2223–2229. <https://doi.org/10.1128/iai.57.7.2223-2229.1989>

Cotter, P. A., & Jones, A. M. (2003). Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends in Microbiology*, 11(8), 367–373. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00161-3)

Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2001). Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *The EMBO Journal*, 20(18), 5040–5048.
doi:<https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5040>

Decker, K. B., James, T. D., Stibitz, S., & Hinton, D. M. (2012). The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology*, 158(7), 1665–1678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058941-0>

Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F., & Isaacs, N. W. (1996). Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*, 381(6577), 90–92. <https://doi.org/10.1038/381090a0>

Flak, T. A., & Goldman, W. E. (1998). Muramyl peptide probes derived from tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Analytical biochemistry*, 264(1), 41–46. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2826>

Folkner, W. J., Nogami, W., Martin, S. A., & Rosenthal, R. S. (1987). Structure of *Bordetella pertussis* peptidoglycan. *Journal of bacteriology*, 169(9), 4223–4227. <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4223-4227.1987>

Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichon, J., Ullmann, A., & Danchin, A. (1988). The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: Cloning and expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2(1), 19–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00003.x>

Goodnow R. A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological reviews*, 44(4), 722–738. <https://doi.org/10.1128/mr.44.4.722-738.1980>

Goodridge, D., Marrie, T. J., & Orr, P. (2015). Laboratory diagnosis of infectious diseases: Principles and practice. In G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th ed., pp. 2253–2264). Elsevier.

Guiso N. (2017). *Bordetella* Adenylate Cyclase-Hemolysin Toxins. *Toxins*, 9(9), 277. <https://doi.org/10.3390/toxins9090277>

Hamidou Soumana, I., Linz, B., & Harvill, E. T. (2017). Environmental origin of the genus *Bordetella*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00028>

Hegerle, N., & Guiso, N. (2014). *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: Lessons for pertussis vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 13(9), 1135–1146. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.932254>

Hsia, J. A., Moss, J., Hewlett, E. L., & Vaughan, M. (1984). ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *The Journal of biological chemistry*, 259(2), 1086–1090.

Kessie, D. K., Lodes, N., Oberwinkler, H., Goldman, W. E., Walles, T., Steinke, M., & Gross, R. (2021). Activity of tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis* in a human tracheobronchial 3D tissue model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 614994. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.614994>

Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., & Schmitt, H. J. (2016). Pertussis: Microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 449–486.

King, A. J., van der Lee, S., Mohangoo, A., van Gent, M., van der Ark, A., & van de Waterbeemd, B. (2013). Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PloS one*, 8(6), e66150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066150>

Klimova, N., Holubova, J., Streparola, G., Tomala, J., Brazdilova, L., Stanek, O., ... & Sebo, P. (2022). Pertussis toxin suppresses dendritic cell-mediated delivery of *Bordetella pertussis* into lung-draining lymph nodes. *PLoS Pathogens*, 18(6), e1010577. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010577>

Lam, C., Octavia, S., Ricafort, L., Sintchenko, V., Gilbert, G. L., Wood, N., & Lan, R. (2014). Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 20(4), 626–633. <https://doi.org/10.3201/eid2004.131478>

Lee, A. D., Cassiday, P. K., Pawloski, L. C., Tatti, K. M., Martin, M. D., Briere, E. C., Tondella, M. L., & Martin, S. W. (2018). Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). *PLoS ONE*, 13(4), e0195979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195979>

Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J. G., & Charles, I. G. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence to mammalian cells. *PNAS*, 88(3), 1215–1219. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.1215>

Locht C. (2018). Will we have new pertussis vaccines?. *Vaccine*, 36(36), 5460–5469. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.055>

Mattoo, S., & Cherry, J. D. (2005). Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 326–382.

Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F., & Cotter, P. A. (2014). *Bordetella pertussis* pathogenesis: Current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 12(4), 274–288. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>

Mooi, F. R., van Loo, I. H., & King, A. J. (2001). Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: A cause for its reemergence? *Emerging Infectious Diseases*, 7(3 Suppl), 526–528. <https://doi.org/10.3201/eid0707.017708>

Mooi, F. R., van Loo, I. H., van Gent, M., He, Q., Bart, M. J., Heuvelman, K. J., de Greeff, S. C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., & Mertsola, J. (2009). *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1206–1213. <https://doi.org/10.3201/eid1508.081511>

Moon, K., Bonocora, R. P., Kim, D. D., Chen, Q., Wade, J. T., Stibitz, S., & Hinton, D. M. (2017). The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio*, 8(5), e01526-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01526-17>

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2021). *Medical Microbiology* (9th ed.). Elsevier.

Nguyen, A. W., DiVenere, A. M., Papin, J. F., Connelly, S., Kaleko, M., & Maynard, J. A. (2020). Neutralization of pertussis toxin by a single antibody prevents clinical pertussis in neonatal baboons. *Science Advances*, 6(6), eaay9258.

Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., Holden, M. T., Churcher, C. M., Bentley, S. D., Mungall, K. L., Cerdeño-Tárraga, A. M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M. A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., ... Maskell, D. J. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1), 32–40. <https://doi.org/10.1038/ng1227>

Pawloski, L. C., Queenan, A. M., Cassiday, P. K., Lynch, A. S., Harrison, M., Shang, W., ... & Tondella, M. L. (2013). Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(9), 1194–1197. <https://doi.org/10.1128/CVI.00717-13>

Relman, D. A., Domenighini, M., Tuomanen, E., et al. (1989). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. *PNAS*, 86(8), 2637–2641. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2637>

Roberts, R., Moreno, G., Bottero, D., Gaillard, M. E., Fingermann, M., Graieb, A., Rumbo, M., & Hozbor, D. (2008). Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, 26(36), 4639–4646. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.004>

Scanlon, K., Skerry, C., & Carbonetti, N. (2019). Role of Major Toxin Virulence Factors in Pertussis Infection and Disease Pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1183, 35–51. https://doi.org/10.1007/5584_2019_403

Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., & Deora, R. (2011). FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PloS one*, 6(12), e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>

Szymkowicz, L., Dey, S., & McMahon, S. A. (2021). Design of a quantitative LC-MS method for residual toxins adenylate cyclase toxin (ACT), dermonecrotic toxin (DNT), and tracheal cytotoxin (TCT) in *Bordetella pertussis* vaccines. *Toxins*, 13(11), 763. <https://doi.org/10.3390/toxins13110763>

van den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Willems, R. J., Mooi, F. R., & van Furth, R. (1999). Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infection and immunity*, 67(3), 1056–1062. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1056-1062.1999>

Vojtova, J., Kamanova, J., & Sebo, P. (2006). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Current opinion in microbiology*, 9(1), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.011>

World Health Organization. (2015). Pertussis vaccines: WHO position paper—August 2015. *Weekly Epidemiological Record*, 90(35), 433–458. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9035>.

Xu, Z., Octavia, S., Luu, L. D. W., Payne, M., Timms, V., Tay, C. Y., Keil, A. D., Sintchenko, V., Guiso, N., & Lan, R. (2019). Pertactin-negative and filamentous hemagglutinin-negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1196–1199. <https://doi.org/10.3201/eid2506.180240>

Yılmaz Çolak, Ç., & Tefon Öztürk, B. E. (2023). *Bordetella pertussis* and outer membrane vesicles. *Pathogens and Global Health*, 117(4), 342–355. <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2117937>

Zhang, S., Xu, Y., Zhou, Z., Wang, S., Yang, R., Wang, J., & Wang, L. (2011). Complete genome sequence of *Bordetella pertussis* CS, a Chinese pertussis vaccine strain. *Journal of bacteriology*, 193(15), 4017–4018. <https://doi.org/10.1128/JB.05184-11>

FUNGAL HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE KULLANILAN BAZI MOLEKÜLER YÖNTEMLER VE DNA BARKODLAMA

AYTEN DİZKIRICI TEKPINAR¹

1. Giriş

Funguslar, doğada yaygın olarak bulunan ve organik maddeleri ayrıştırarak karbon, azot ve diğer elementlerin döngüsünde önemli roller oynayan ökaryotik mikroorganizmalardır (Corbu & ark., 2023). Ancak bazı türler insanlarda, bitkilerde ve diğer canlılarda ciddi enfeksiyonlara ve/veya hastalıklara yol açabilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde, hastane enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları ve yüzeysel deri enfeksiyonları gibi ciddi sağlık sorunlarına (aspergillosis, kandidiyazis, pneumocystis pnömonisi, kriptokokal menenjit vb) neden olan fungal patojenler, günümüzde artan bir tehdit oluşturmaktadır (Strickland & Shi, 2021; Hoenigl & ark., 2022; Pagano & Fernández, 2025). Son yıllarda, fungus enfeksiyonlarının küresel yükü alarm verici bir hızla artmakta olup, yanlış teşhis ciddi ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden sonuçlara yol açmaktadır (Denning, 2024).

¹ Prof. Dr., Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0002-0578-5092 aytekdizkirici@gmail.com

Funguslar, sadece insanlarda değil bitkilerde de hastalıklara neden olabilmektedir (Zuo & ark., 2019; Balestrini, 2021; Priyashantha & ark., 2023; Mishra & ark., 2024). Bitkilerde hastalıklara neden olan funguslar, farklı ekosistemlerde ve tarım alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Örneğin, Pas (Rust) fungusları (*Puccinia* ve *Cronartium* türleri), buğday, arpa ve yulaf gibi tahıllarda ciddi verim kaybına neden olurken (Zuo & ark., 2019), sürme (smut) fungusları (*Ustilago*, *Tilletia* gibi türler) mısır ve buğday gibi tahıllarda, tanelerin kalitesini bozarak büyüme bozukluklarına sebep olmaktadır (Ghimire & ark., 2020). Küf fungusları arasında yer alan *Erysiphe*, *Blumeria* ve *Leveillula* gibi türler ise bağcılık ve sebze tarımında kalite kaybına yol açan hastalıkları oluşturmaktadır (Lebeda & ark., 2024). *Fusarium* türleri, domates, muz, buğday ve mısır gibi bitkilerde solgunluk, nekroz ve mikotoksin kontaminasyonu ile tarımsal üretimi tehdit ederken (Zakaria & ark., 2023; Ismaila & ark., 2023), mildiyö (mildew) fungusları (*Plasmopara*, *Peronospora*, *Hyaloperonospora*) yaprak lekeleri, kloroz ve erken yaprak dökümü gibi etkilerle bitkilerin büyümesini ve gelişimini engellemektedir (Salcedo & ark., 2021, 2023).

Fungusların canlılara olan zararlı etkilerini yok etmek veya olabildiğince en aza indirmek, yayılmasını kontrol altına almak için ilk yapılması gereken basamak patojenlerin teşhislerinin kısa zamanda doğru olarak yapılabilmesidir. Tanı olanaklarının eksikliği ve mantar teşhisi için alanında uzman sayısının az olması, birçok mantar enfeksiyon veya hastalığının tespit edilememesine yol açmakta ve bu da canlı güvenliğini tehlikeye atarken ileri aşamalarda da artan kayıplara neden olmaktadır (Lockhart, Chowdhary & Gold, 2023). Ayrıca, etkili iyileştirme ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olması da enfeksiyona veya hastalıklara neden olan fungusların en kısa ve güvenilir şekilde teşhis edilmesinin önemini arttırmaktadır.

Mikoloji alanında, mantar tespiti ve tanısı için moleküler yöntemlerde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İzolasyon, kültür, morfolojik gözlem ve biyokimyasal özelliklere dayanan geleneksel tespit yöntemleriyle karşılaştırıldığında, moleküler tanı yöntemleri patojenlerin belirlenmesinde daha doğru

ve verimli olabilmektedir. Özellikle kriptik (morfolojik olarak birbirine çok benzeyen) veya kültürlenemeyen türlerin tespiti için moleküler yöntemler oldukça hızlı ve güvenilirdir (Fang & ark., 2023). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli testler; konvansiyonel (standart) PCR, nested-PCR, multipleks-PCR, q (quantitative real-time)-PCR, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), HDA (helicase dependant amplification), (meta)barcoding en sık kullanılan moleküler tabanlı yöntemlerdir (Palka-Santini & ark., 2009; Bellemain & ark., 2010; Avni, Leibovici & Paul, 2011; Chong & ark., 2015; Dannaoui & ark., 2017; Arastehfar & ark., 2018; Jainlabdin & ark., 2018; Arastehfar & ark., 2019; Carvalho-Pereira & ark., 2020; Sun & ark., 2020; D'Andreano & ark., 2021; Hariharan & Prasannath, 2021; Avenot & ark., 2022; White & ark., 2021; Mendonça & ark., 2022; Fang & ark., 2023; Shi & ark., 2023; Wang & ark., 2023; Chen & ark., 2024; Cotter & ark., 2024; Kaishian & ark., 2024; Letsiou & ark., 2024; Thambugala & ark., 2024; Weaver & ark., 2024). PCR tabanlı yöntemler, patojenlerin tiplendirmesi, hastalıkların tanısı, gen ekspresyon çalışmaları, taksonomi çalışmaları, nokta mutasyonu analizi, polimorfizm, popülasyon çalışmaları ve filogenetik analizler gibi geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılmaktadır.

2. Kullanılan Moleküler Yöntemler

Aşağıda fungusların tanımlanması ve isimlendirilmesi için kullanılabilecek bazı moleküler temelli metodlar ve bu metodları kullanan güncel birkaç çalışma hakkında bilgiler verilmiştir.

2.1 Konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu

Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), endpoint PCR olarak da adlandırılır ve 1980'lerin ortalarında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir (Mullis & Faloona, 1987). Moleküler biyolojide yapılan çalışmalar için önemli bir yere sahip olan bu yöntem, geleneksel tanı yöntemlerinde karşılaşılan engelleri veya sınırlamaları azaltarak bitkilerde ve diğer canlılarda enfeksiyon ve diğer hastalıklara neden olan patojenlerin hassas şekilde tespitine olanak sağlamıştır. PCR yönteminin amacına ulaşabilmesi için DNA

şablonu, *Thermus aquaticus* adlı termofilik bakteriden elde edilen ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz, bir çift oligonükleotit primer (forward ve reverse), deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), tampon solüsyon ve monovalent (K^+) ile divalent katyonlar (Mg^{2+} veya Mn^{2+}) gereklidir. Hedef DNA bölgesinin amplifiye edilip edilemediğini görmek için ise genellikle agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. PCR'nin kalitesi, hedef DNA dizisinin (sekans) uzunluğu ve izolasyon sonunda alınan DNA'nın kalitesi gibi faktörlerden etkilenebilir (Bastien, Procop & Reischl, 2008). Düşük konsantrasyonlardaki DNA'nın bile PCR yöntemiyle çoğaltılabilmesi, bulaş sonrasında daha semptomlar kendini göstermeden önce dahi patojenin tespitine olanak vermektedir. Her yöntemde olduğu gibi standart PCR'ın da dezavantajlı olduğu noktalar vardır. Özellikle kontaminasyona karşı hassasiyeti ve hatalı pozitif sonuçlar yöntemin önemli dezavantajları arasında yer almaktadır (Hajia, 2018). Bununla birlikte, geleneksel patojen tespit yöntemleriyle kıyaslandığında PCR, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü sayesinde bu sınırlamaları büyük ölçüde dengelemektedir. Ayrıca agaroz jel elektroforezinin, amplifiye edilmiş DNA uzunluklarının farklılıklarını ayırt etme kapasitesi sınırlıdır; çok yakın uzunluğa sahip olan DNA bantlarını ayırmaz ve bu durum PCR'nin avantajının azalmasına neden olmaktadır. Tüm bu kısıtlamalara rağmen, PCR bitki ve insan patojenlerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılan temel tekniklerden biri olmaya devam etmektedir. Örneğin, Ghaedi ve arkadaşlarının 2025 yılında Scientific Reports dergisinde basmış oldukları yayında, incir ağaçlarında ciddi verim kaybına neden olan (Kabuk yanıklığı ve Dal kuruması hastalıkları) *Botryosphaeriaceae* familyasına ait üç ayrı mantar türünün (*Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum*) teşhisinde PCR temelli yaklaşımlar (standart, nested ve multipleks) kullanılmıştır. Çalışmada β -tubulin (tub) ve RNA polimeraz II (rpb2) gen bölgeleri için her bir türe özgü primer çiftleri (*Botryosphaeria dothidea*; TUB-Bd1, *Neofusicoccum parvum*; TUB-Np1 ve *Neoscytalidium dimidiatum*; RPB-Nd2) dizayn edilmiştir. β -tubulin bölgesinin PCR çalışmalarında nested PCR tercih edilirken, rpb2 bölgesi için standart PCR protokolü

yeterli olmuştur. RNA polimeraz II bölgesini hedef alan RPB-Nd2 primer çifti ile yapılan doğrudan PCR uygulaması sonucunda, semptomatik odunsu örneklerin %25,5'inde ve bir yaşındaki asemptomatik dal örneklerinin %13'ünde *N. dimidiatum* tespit edilmiştir. Bu oranın, PDA (potato dextrose agar) besiyerinde yapılan geleneksel kültürleme yöntemleriyle elde edilen %6,67'lik tespit oranına kıyasla oldukça yüksek olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

İnsanda hastalıklara neden olan mantar patojenlerinin teşhis edilmesinde standart PCR protokolünü kullanan çalışma sayısı azdır. Bunun en önemli nedeni PCR temelli olan moleküler yöntemlerin hızla ilerleyerek standart PCR'a göre daha yeni ve etkin yöntemlerin geliştirilmesidir. Standart PCR yönteminin kullanıldığı araştırmalardan biri Fong-Flores ve arkadaşlarının (2022) *Advances in Infectious Diseases* dergisinde basmış oldukları yayındır. Bu çalışmada kritik enfeksiyon şüphesi taşıyan 30 hastanın kan, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj ve asit sıvısı örnekleri kullanarak mantar enfeksiyonu olup olmadıkları incelenmiştir. Mantar türlerinin tespitinde 16S, 18S ve EF1 genleri hedef alınarak PCR ile çoğaltılmış ve Sanger metodu ile DNA dizileri alınmıştır. Hastaların %40'ında yalnızca mantar, %26,7 örnekte hem bakteri hem de mantar DNA'sı saptanmıştır. Geleneksel kültür yöntemleriyle fungusların ortalama 14 günde tanımlanabildiği bu sürenin moleküler yöntemlerle ortalama 1 güne düşürülebildiğine dikkat çekilerek, moleküler yöntemlerin insan fungus patojenlerinin tespitinde önemli olduğu vurgulanmıştır.

2.2 Nested PCR

Nested PCR, standart PCR tekniğinden farklı olarak hedef DNA bölgesini amplifiye etmek için tek bir primer çifti yerine iki farklı primer çifti kullanılan bir yöntemdir (Koentjoro & ark., 2023; Negahban & ark., 2024). Bu tekniğin en önemli avantajı, ikinci primer çifti tarafından gerçekleştirilen ikinci amplifikasyonun, ilk amplifikasyon sırasında oluşan hatalı fragmentleri düzelterek özgüllüğü ve doğruluğu artırmasıdır (Qin & ark., 2011). Nested PCR tekniği, bitkilerde ve insanlarda fungusların neden olduğu

enfeksiyonları tespit etmek için kullanılmaktadır (Zang & ark., 2012; Wei & ark. 2018; Mudiyansele & ark., 2021; Ellis & ark., 2024; Negahban & ark., 2024; Ghaedi & ark., 2025).

Yukarıda standart PCR'a örnek verilen Ghaedi ve arkadaşlarının 2025 yılında İncir ağacında hastalık etkisi olan fungusların moleküler tespitini konu alan çalışma, Nested PCR yöntemine de örnek olarak verilebilir. Bu çalışmada patojenlerin β -tubulin ve RNA polimeraz II bölgelerinin çoğaltılmasında standart PCR'a ek olarak nested PCR da kullanılmıştır. Bunun en önemli nedeni, β -tubulin bölgesinin standart PCR yöntemiyle çoğaltılmasında problemlerin yaşanmasıdır. β -tubulin gen bölgesinin çoğaltılmasında doğrudan PCR ile kıyaslandığında nested PCR'ın belirgin üstünlüğünü gösterilmiştir. Nested PCR ile *B. dothidea* patojeni için 1 milyon kat, *N. parvum* patojeni için ise 10 milyon kat daha fazla duyarlılık elde edilmiştir. Buna karşılık, RPB-Nd2 primer çifti için nested PCR, doğrudan PCR'a kıyasla belirgin bir hassasiyet artışı sağlamıştır. Sadece DNA bant yoğunluğunda bir artış gözlemlenmiştir.

Ellis ve arkadaşları (2024) Open Forum Infectious Diseases dergisinde yayınladıkları bir araştırmada, savaş yaralanmalarında görülen invaziv fungal enfeksiyonlarına neden olan fungusların teşhisinde semi-nested PCR yöntemini kullanmışlardır. 2009-2014 yılları arasında savaşta yaralanmış olan yaklaşık 60 askerden doku örnekleri alınarak invaziv fungal enfeksiyonlarına neden olan *Aspergillus* ve *Fusarium* türleri saptanmaya çalışılmıştır. 18S rDNA'nın V4/V5 bölgeleri, Mitokondriyal tRNA bölgeleri ve ITS (Internal Transcribed Spacer) / 28S DNA bölgeleri nested PCR ile çoğaltılmıştır. Sonuç olarak semi-nested PCR testlerinin, özellikle anjiyoinvazyon (damar invazyonu) gösteren dokularda, invaziv fungal enfeksiyonların tanısında etkili ve hızlı bir yöntem olduğu ifade edilmiştir. Bu yöntemin, geleneksel kültür ve histopatolojiye kıyasla daha hızlı sonuç vermesinin özellikle savaş yaralanmalarında erken tanı ve tedaviye olanak sağlaması açısından önemi vurgulanmıştır.

2.3 Multipleks PCR

Standart bir PCR testi bir çift primerin kullanılması ile belirli bir gen bölgesini amplifiye etme prensibi ile çalışırken, farklı spesifik özelliklere sahip fazla sayıda primer çiftlerinin aynı reaksiyonda kullanılarak çok boyutlu bir perspektif kazandırmış formuna multipleks PCR denilmektedir. Multipleks PCR yöntemi, tek bir PCR reaksiyonunda birden fazla hedef bölgeyi eş zamanlı olarak çoğaltmaya olanak tanımaktadır. Bu teknik geleneksel kültür yöntemlerine kıyasla çok daha hızlı sonuç verdiği için insan ve bitkilerde enfeksiyonlara neden olan fungusların tespitinde avantajlar sağlamaktadır (Lucignano & ark., 2011; Carvalho-Pereira & ark., 2020; Kim & ark., 2020; Deng & ark., 2024; Bruce & ark., 2025; Khalid & ark., 2025). İnsanlarda hastalıklara neden olan fungusların son zamanlarda dikkat çeken moleküler teknikler kullanılarak teşhis edilmesi en iyi tanısal strateji olabilir. Bunun nedeni PCR temelli testlerin, mevcut kültüre dayalı yöntemlere göre daha hassas olması, kültür testlerine kıyasla moleküler yöntemlerin daha az zaman alması, kan, vücut sıvıları, beyin omurilik sıvısı gibi birçok klinik örnek türüne uygulanabilmesi ve kültürle üretilemeyen türlerin tespitinde kullanılabilmesi şeklinde sıralanabilir. Bitkilerde hastalıklara neden olan ve toprak kaynaklı olduğu düşünülen hastalıkların genellikle patojen kompleksleri tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, tek bir patojenin tanımlanması, hastalığın ve/veya nedenlerinin belirlenmesi için yeterli olmayabilir. Tekli PCR ile karşılaştırıldığında, multipleks PCR daha yüksek tespit verimliliğine sahiptir ve aynı anda birden fazla patojeni saptayarak maliyeti azaltmasının yanında zamandan da tasarruf sağlamaktadır. Multipleks PCR, birden fazla hedef diziyi eş zamanlı olarak çoğaltabilir ve tıbbi, çevresel ve tarımsal bilimlerde patojen DNA'sının tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Quintero-Vásquez & ark., 2013; Ali & ark., 2015; Rappo & ark., 2016; Wang & ark., 2023). Multipleks PCR yönteminde araştırılan her bir patojene spesifik olan bir primer çifti kullanılmaktadır. Çok sayıda primerin aynı anda PCR reaksiyonuna dahil edilmesi, primerlerin çapraz bağlanmasına ve dimer oluşumuna yol açarak amplifikasyon verimliliğini azaltabilir. Bu

tarz problemleri en aza indirgeyebilmek adına genom dizisi dikkate alınarak ve birden fazla patojen için ortak primerler belirlenerek multipleks PCR sistemindeki primer sayısı azaltılabilir (Liu & ark., 2024).

Wang ve arkadaşları (2023), Yerfıstığında güney çürüklüğü (Southern blight), gövde çürüklüğü ve kök çürüklüğü hastalıklarına neden olan üç fungal patojenin (*Sclerotium rolfsii*, *Lasiodiplodia theobromae* ve *Fusarium oxysporum*) aynı anda tespiti için multiplex PCR yöntemini kullanmışlardır. Bu hastalıklara neden olan fungusların bitkiye girdikleri evrede teşhis edilmesi güç olduğundan tedavi döneminin kaçırılmasına ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Bu nedenle moleküler teknikler kullanılarak, bu üç hastalığa neden olan fungus patojenleri erken evrede tespit edilmeye çalışılmıştır. Ağustos 2020’de Shandong Eyaleti’ndeki yerfıstığı tarlalarında bulunan 102 bitki örneğinden 216 tohum toplanarak rizom ve tohumlardan total DNA izole edilmiştir. Daha sonra her patojenin tespitinde kullanılacak olan patojene spesifik primerler tasarlanmış ve bunlar aynı PCR tüpünde birlikte kullanılarak, tek bir PCR reaksiyonuyla teşhis edilmiştir. Bu yöntem sayesinde, geleneksel kültür ve tekli PCR yöntemlerine göre zaman ve maliyet tasarrufu elde edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmaya benzer olarak Sun ve arkadaşları (2020) multiplex PCR tekniğini kullanarak buğdayda keskin göz lekesi, yaygın kök çürüklüğü ve taç çürüklüğüne neden olan *Rhizoctonia cerealis*, *Bipolaris sorokiniana* ve *Fusarium spp.* taksonlarını tespit etmeye çalışmışlardır. Hastalığın teşhisi için gerekli olan örnekler Shandong Eyaleti'ndeki bir buğday tarlasından alınmıştır. Her bir patojene spesifik olan primerler tasarlanarak *R. cerealis*'in ve *B. Sorokiniana* türlerinin ITS bölgesi, *Fusarium spp.*'nin ise TEF1- α bölgesinin PCR ile çoğaltılarak buğdayda fungus patojenleri tespit edilmiştir. Geleneksel bitki patojenlerini tespit yöntemlerinin kültür temelli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal incelemelere dayandığı dikkate alındığında moleküler temelli yaklaşımların basit, duyarlı ve zaman kazandırıcı olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, tek bir patojeni tespit etmek için kullanılan konvansiyonel PCR yöntemine kıyasla multiplex PCR’in birden

fazla gen hedefini aynı anda tanımlayıp ayırt edebilme özelliğinden dolayı oldukça başarılı olduğuna da dikkat çekilmiştir.

Multipleks PCR yöntemini bitkilerde patojenlerinin tespitinde kullanan en güncel çalışmalardan birini Bruce ve arkadaşları (2025) Canadian Journal of Plant Pathology dergisinde yayınlamışlardır. Baklada yaprak hastalığına neden olarak ekonomik kayıplara neden olan patojenlerin (*Ascochyta fabae*, *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *B. fabae*, *Colletotrichum lentis* ve *Stemphylium* spp.) tespitinde multipleks PCR yöntemini tercih etmişlerdir. Saskatchewan eyaletinde yetiştirilen bakla bitkisinin enfekte olan yapraklarından ve laboratuvar şartlarında her bir patojenle enfekte edilmiş yapraklardan DNA izolasyonu yapılmıştır. Hedef patojen türüne özgü primer çiftleri kullanılarak multipleks PCR yapılmış ve moleküler seviyede patojenler tespit edilmiştir. Saskatchewan eyaletinde *Alternaria* sp. ve *Stemphylium* spp. taksonlarının bilinenden daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, multipleks analizin bakladaki yaprak hastalıklarının hızlı teşhisi için değerli bir yöntem olduğu, lezyon görünümüne dayalı görsel teşhisin belirsizliğini ortadan kaldırdığı ve patojen morfolojisine dayalı izolasyon ve teşhis için gereken zaman ve çabayı en aza indirdiği ifade edilmiştir.

Bogdan ve arkadaşları (2023) ciddi seviyede hastalık belirtileri gösteren Covid hastalarında oluşan mantar enfeksiyonlarına neden olan patojenlerin teşhisi için multipleks PCR yöntemini kullanmışlardır. Örnekleme, 2020-2022 yıllarında belirli pandemi dalgalarında Romanya Victor Babes Hastanesi'ne gelen Covid hastaları olarak belirlenmiştir. DNA izolasyonu için solunum örnekleri, kan ve idrar kullanılmıştır. 288 hastanın 96'sında (%33,3) fungal enfeksiyonlar (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*) tespit edilmiştir ve en yaygın patojenin *Candida* türleri olduğu gösterilmiştir. Multipleks PCR'ın yapılabilmesi için her bir fungus taksonuna spesifik olan primerler literatüre bakılarak belirlenmiştir. Mantar enfeksiyonu olan hastaların olmayanlara oranla daha obez olduğu, ventilatör kullanımının daha yüksek olduğu, yoğun bakım ünitesine yatış ve mortalitenin de önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

2.4 Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR)

2000'lerin başlarında, fungal DNA tespiti üzerine yapılan çalışmalar yaygınlaşmaya başladığında, herhangi bir semptomu neden olmasa bile bitkilerde var olan patojenin tespitinde DNA kullanılmaya başlanmıştır. Genomda hedeflenen bir DNA bölgesinin çoğaltılmasına yönelik teknik seviyedeki gelişmeler, gerçek zamanlı olarak tespit ve nicelleştirebilen yeni bir PCR tekniğinin (kantitatif gerçek zamanlı PCR veya qPCR) geliştirilmesini sağlamıştır (Ciampi & ark., 2020; Iwasaki & ark., 2022; Lhrer & ark., 2022). qPCR, mRNA seviyelerindeki değişikliklerin hassas bir şekilde izlenmesini sağlayan bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Bu yöntem, sınırlı sayıda hücre veya doku rneği ile çalışılan durumlarda büyük önem taşır. qPCR, Kary Mullis'in 1980'lerde yaptığı çığır açan çalışmalara dayanmaktadır ve bu, geleneksel PCR tekniklerinin önemli bir evrimidir (Mullis, 1990). Yıllar içinde qPCR'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, bu yöntemin semptomatik ve asemptomatik dokulardan alınan örneklerden fungal patojenleri doğrudan tespit etmek için kullanılması sağlamıştır. Gerçek zamanlı PCR tekniği, bitkilerde fungusların neden olduğu hastalıkların tespitinde geniş bir uygulama yelpazesi sunar (Luo & ark., 2017; Hariharan & Prasannath, 2021; Romero-Cuadrado & ark., 2023). Bu yöntem yalnızca hedef patojenin bir örnekten bulunup bulunmadığını belirlemekle kalmaz, aynı zamanda patojenin miktarını da nicel olarak ölçerek hastalık yönetimi kararları için bir temel oluşturur. Diğer önemli kullanım alanları arasında patojenin canlılığının belirlenmesi, çoklu tespit (multiplexing) ve fungusit direncinin izlenmesi yer almaktadır. Genel olarak, gerçek zamanlı PCR bilgisi, bitki patojen mikroorganizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak hastalık yönetimini iyileştirme konusunda önemli fırsatlar sunar ve büyük bir rol oynamaktadır (Sharma & ark., 2024). Livak ve arkadaşları (1995) tarafından tanıtılan qPCR, prob

kullanımıyla amplifikasyon reaksiyonunun gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlayarak nükleik asitlerin daha yüksek hassasiyet ve özgüllükle nicelleştirilmesine olanak tanımıştır. qPCR sürecinin tamamı boyunca izlenen floresans sinyali, dizilim-spesifik floresan oligonükleotid problemleri (örn., hidroliz problemleri, scorpion problemleri veya moleküler işaretçiler) aracılığıyla ya da hedef diziden bağımsız, çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) bağlandığında özel floresan özellikler gösteren floresan boyalar (örn., SYBR Green) kullanılarak tespit edilebilir (Gachon, Mingam & Charrier, 2004). Floresansın tespit sinyali olarak kullanılması, sistemin dayanıklılığını artırmış ve otomatik cihazlarla uygulanabilirliğini geliştirmiştir. PCR işlemi, bir dizi döngü gerektirir ve amplifiye edilen DNA veya RNA miktarı, amplifikasyon sırasında yayılan ışık miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Bitkilerde qPCR kullanımına yönelik ilk çalışmalardan biri *Phytophthora* cinsine ait olan bir mantar türünün meşe ve kayın ağaçlarında tespit edilmesidir (Böhm & ark. 1999). He ve arkadaşları (2020), çay bitkilerinin dirençli çeşitlerinin tespiti ve *Colletotrichum* mantarı türlerine bağlı hastalıkların agresyon seviyelerine göre ayırt edilmesi için benzer şekilde hızlı, hassas ve DNA tabanlı bir RT (real-time)-PCR testi geliştirmiştir. Bu yöntem, lezyonların boyutlarının ölçülmesine dayalı eski teknikleri geride bırakmıştır. Bununla birlikte, qPCR'nin belirli bir gen için mevcut dizin verilerine dayanması önemli bir sınırlama olarak karşımıza çıkmaktadır. RT-PCR tekniği, insanlarda enfeksiyonlara neden olan fungusların moleküler yöntemlerle tespit edilmesini sağlayarak, hastalığın doğru teşhis edilmesi ve uygun tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından önemli bir rol oynamaktadır. *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* gibi invaziv patojenler, özellikle bağışıklığı baskılanmış bireyler için ciddi tehditler oluşturmakta ve potansiyel olarak ölümcül sonuçları nedeniyle önemli bir endişe kaynağı haline gelmektedir (Bajpai & ark., 2019; Casadevall & ark., 2019; Ismadi, Mohamad & Harun 2024; Weaver & ark., 2024). Tanıdaki

gecikmeler, prognozu önemli ölçüde olumsuz etkileyebileceğinden mantar enfeksiyonlarının hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması önem taşımaktadır (Pathakumari, Liang & Liu, 2020; Denning, 2024).

2.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), DNA'nın hızlı ve spesifik amplifikasyonunu sağlayan, 4 ila 6 primer kullanılarak çalışması sayesinde PCR'dan daha hızlı olan moleküler bir yöntemdir (Cotter & ark., 2024). Bu yöntem ilk olarak Notomi ve arkadaşları tarafından 2000 yılında geliştirilmiştir. LAMP'ın en önemli özelliklerinden biri, sabit bir sıcaklıkta (izotermal) çalışabilmesidir. Klasik PCR'da üç aşamalı denatürasyon, bağlanma ve uzama döngüleri için sürekli sıcaklık değişimi gerekirken, LAMP yönteminde sabit bir sıcaklıkta (~60-65°C) reaksiyon gerçekleşir, böylece zaman kaybettiren ısı değişim süreçlerine de gerek kalmaz. Standart PCR'da kullanılan Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz enzimi yerine LAMP tekniğinde Bst (*Bacillus stearothermophilus*) polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim, özellikle izotermal amplifikasyon yöntemleri için oldukça önemlidir, çünkü yüksek sıcaklıklarda aktif kalabilen ve DNA ipliklerini sürekli olarak uzatabilen bir özelliğe sahiptir. Standart PCR metodunda denatürasyon aşamasında yüksek sıcaklık (~93-95°C) etkisiyle iki iplikli (double-stranded) DNA çözülerek tek ipliklere ayrılır ve her bir iplik, yeni bir iplik sentezi için şablon olarak kullanılır. LAMP prosedüründe kullanılan Bst polimeraz enzimi iplik değiştirme (strand displacement) özelliğine sahiptir ve ipliklerin çözülmesi için yüksek sıcaklıklara gerek duymayarak mevcut ipliği "itererek" yeni DNA ipliğini sentezler. Bst polimerazın diğer önemli bir avantajı da PCR'da kullanılan standart polimeraz enzimlerine kıyasla bazı inhibitörlere karşı daha toleranslı olmasıdır (Francois & ark., 2011; Kiddle & ark., 2012). Bu durum LAMP'yi ham ekstraktlarda bitki patojenlerinin teşhisi için kullanılabilir hale getirir (Elvira-Gonzalez & ark., 2017; Wilisiani & ark., 2019). Belirtilen avantajlar sayesinde kirli DNA örnekleri dahi 15-20

dakika gibi kısa sürede çoğaltabilir (Hariharan & Prasannath, 2021; Soroka & ark., 2021). Amplifikasyonun tespitinde gerçek zamanlı floresan emilimi veya pH'ye bağlı olarak gerçekleşen renk değişimi (kolorimetrik) yaklaşımları kullanılabilir (Yu & ark., 2021). Bu yöntem, ekonomik açıdan önemli fitopatojenik (bitki hastalığına neden olan) fungusların tespit edilmesi için kullanılmaktadır (Tomlinson, Dickinson & Boonham, 2010; Khan & ark., 2018; Prasannakumar & ark., 2021). LAMP yönteminin önemli avantajları yanında bazı dezavantajları da vardır. Primer tasarımında belirlenen dizilerin kesin olmaması ve seçim için kullanılabilir primer sayısının yüksek olması, bu analiz yönteminin geniş çapta uygulanmasının önündeki başlıca engellerdir. Optimum olmayan primerler ve suboptimal sıcaklık koşulları, spesifik olmayan amplifikasyon ve primer-dimer oluşumuna yol açabilmektedir (Rolando & ark., 2020). Diğer bir dezavantaj ise, çoklu primer setlerinin tasarımının karmaşıklığı nedeniyle LAMP'nin çoklu hedef amplifikasyonu (multiplexing) gerçekleştirme zorluğudur (Tanner, Zhang & Evans, 2012).

LAMP tekniğini kullanarak, bitkilerde hastalıklara neden olan fungus patojenlerinin saptanmasına ait güncel çalışmalardan biri 2025 yılında Palanisamy ve arkadaşları tarafından Hindistan'da yapılmıştır. Bu çalışmada, kabakgillerde (cucurbit) külleme ve yalancı mildiyö hastalıklarına neden olan *Podosphaera xanthii* ve *Pseudoperonospora cubensis* patojenlerini LAMP yöntemiyle tespit edilmeye çalışılmıştır. ITS1-5.8S-ITS2 (*P. Xanthii*) ve selüloz sentezleyici 2 (*P. cubensis*) gen bölgelerini çoğaltmak için uygun LAMP primeleri kullanılmıştır. Dizayn edilen primerler ile bu iki patojen dışında farklı cinslere ait patojenler de (*Macrophomina*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Aspergillus* vb) tespit edilmiştir. Bu sonuç hem seçilen primerlerin hem de kullanılan yöntemin uygunluğunu göstermektedir.

LAMP tekniğini, insanlarda hastalık yapan fungusların teşhisinde kullanan çalışmalardan biri Sridapan ve arkadaşları (2024) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada dünya genelinde insanları ve hayvanları etkileyen 51 *Pythium insidiosum* izolatu ile klinik açıdan benzer etkiler gösteren 70 mantar türü, c-LAMP (a

colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay) ve multipleks PCR yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. c-LAMP yönteminde renk göstergesi olarak hidroksinaftol mavisi (HNB) boyası kullanılan renk değişimine (mor: negatif, gökyüzü mavisi: pozitif) dayalı bir test geliştirilmiştir. c-LAMP yönteminin multipleks PCR'a göre daha duyarlı, ucuz ve doğru olduğu ispatlanmıştır. c-LAMP yönteminde kullanılan DNA miktarının multipleks PCR'a oranla 10.000 kat daha düşük olması, sabit sıcaklıkta yapılması ve 65 dakikada sonuç vermesi (multipleks PCR:180 dakika) c-LAMP yönteminin diğer avantajları olarak gösterilmiştir.

2.6 Helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA)

İnsan ve bitkilerde hastalıklara neden olan patojenlerin moleküler seviyede (DNA) yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi önem arz etmektedir. Özellikle zararlı mikroorganizmaların erken tespiti için düşük maliyetli, dayanıklı ve taşınabilir platformların geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Bu yöntemlerden biri, 2004 yılında New England Biolabs tarafından geliştirilen alternatif bir izotermal teknik olan Helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA)'dır (Vincent & ark., 2004). HDA, standart PCR'a benzeyen ama yüksek ısı gerektiren denatürasyon adımı gerektirmeyen; bunun yerine baştan sona tek bir sıcaklıkta (~ 65°C) çalışan bir yöntemdir (Lau & Botella, 2017). HDA, yaşayan organizmalardaki DNA replikasyon süreciyle benzer prosedürlere sahiptir (Barreda-García & ark., 2018). Prosedür DNA helicaz (uvrD) enzimi tarafından dsDNA'nın hidrojen bağlarının bozulması ve ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyle iki ipliğin ayrılmasıyla başlar. Elde edilen tek sarmallı DNA (ssDNA), tek sarmallı bağlanma proteinleri (SSB'ler) tarafından kaplanarak ipliği stabilize eder ve ayrılan iki iplik arasındaki yeniden hidrojen bağı oluşumu engellenir. Sonrasında, spesifik dizilere sahip iki primer, ssDNA şablonundaki hedef bölgelere bağlanır. DNA polimeraz enzimi tarafından uzatma gerçekleşir ve deoksिनükleotid trifosfatlarının eklenmesiyle iki dsDNA molekülü üretilir. Elde edilen dsDNA'lar aynı replikasyon döngüsüne girer ve şablon olarak görev yapar (Zanoli & Spoto,

2013; Kolm & ark., 2019; Obande & Banga Singh, 2020). Bu yöntemde de LAMP yönteminde olduğu gibi Bst polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Dolayısıyla, reaksiyon sırasında bulunan bitki metabolitlerinden kaynaklanan inhibitörlere karşı daha yüksek bir direnç göstermektedir (Ivanov & ark., 2021). HDA yöntemi, genellikle 60 dakika içinde yeterli miktarda PCR ampikonları üretir (Vincent & ark., 2004). Yukarıda bahsedilen avantajları yanında her yöntemde olduğu gibi HDA'nın da örnek kontaminasyonu, düşük reaksiyon sıcaklığı, primer eşleşme hatalarından kaynaklanan spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşumu ve amplifikasyon inhibisyonu gibi dezavantajları bulunmaktadır (Maffert & ark., 2017; Barreda-García & ark., 2018). Ayrıca HDA'nın uzun DNA hedeflerini amplifiye etme kapasitesinin sınırlı olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu durum, özellikle Guatelli ve ark. (1990) tarafından, kullanılan UvrD helikazının düşük açılma hızıyla ilişkilendirilmiştir. UvrD'nin baz açma hızı saniyede 20 baz çiftiyle sınırlıdır ve toplamda 100 baz çiftinden daha azını işleyebilmektedir. Mechanic ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmalar, MutL proteininin UvrD'nin açılma aktivitesini artırmasına rağmen işlem hızında belirgin bir iyileşme sağlamadığını göstermektedir. Bu sorunun aşılmasına yönelik önemli bir ilerleme, *Thermoanaerobacter tengcongensis* kaynaklı termostabil helikaz Tte-UvrD'nin keşfi olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruyabilen bu enzim, HDA'nın etkinliğini ve verimliliğini artırmada önemli bir rol oynamıştır (An & ark., 2005).

Her ne kadar bu teknik detaylı olarak verilse de mevcut literatür incelendiğinde, HDA'nın fungal patojenlerin tanımlanmasında kullanımına ilişkin çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. HDA yöntemi özellikle bakteriyel ve viral patojenlerin tespitinde kullanılmıştır (O'Neil & ark., 2011; Barreda-García & ark., 2018). Fungal patojenlerin tespitinde daha çok yukarıda ifade edilen standart, nested, q, multipleks PCR ve LAMP gibi alternatif yöntemlerin tercih edildiği dikkat çekmektedir. Teorik olarak HDA'nın fungal DNA'nın amplifikasyonu için uygun bir

platform sunması beklenmesine rağmen, bu alandaki uygulamalar sayıca azdır.

2.7 DNA barkodlama

DNA barkodlama, belirli bir gen veya genlerden alınan kısa bir DNA dizisi kullanarak türlerin tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. DNA barkodlamanın temel prensibi, hedef DNA dizisinin bir referans kütüphanesiyle (BOLD, UNITE, ISHAM, NCBI vb) karşılaştırılarak, kullanılan DNA dizisinin tür veya türaltı seviyesinde eşleştirilebilmesidir. Gen bölgeleri, çeşitli organizmalar için biyolojik barkodlar olarak hizmet edebilir. "Barkodlama Aralığı" veya tür içi (aynı türdeki bireyler arasındaki) ve türler arası (farklı türler arasındaki) varyasyon, hedef gen bölgelerinin seçilmesinde önemli kriterlerdir (Hebert & ark., 2003; Irinyi & ark., 2015). DNA metabarkodlama, DNA barkodlama yönteminin bir uzantısıdır ve bu yöntem, yüksek verimli dizileme teknikleri (HTS, NGS) kullanarak karışık örneklerden (toprak, su, dışkı, hava vb), birden çok organizmanın eşzamanlı olarak tanımlanmasına olanak tanımaktadır (Taberlet & ark., 2012; Cristescu, 2014; Raclariu & ark., 2018; Guo & ark., 2020). Metabarkodlama tekniğinin en önemli avantajı karmaşık ortamlarda düşük oranda bulunan çok sayıda mantar türünü verimli bir şekilde tanımlayabilmesidir (Daniel, 2004). Ayrıca, geleneksel izolasyon kültürlerinde gelişemeyen fungusların tanımlanmasında da oldukça başarılıdır. Son yıllarda, DNA metabarkodlama, bitkisel ürünlerin tüm üretim zincirinde mantar kontaminasyonunu izlemek amacıyla da kullanılmaktadır (Wei & ark. 2020).

İnsan, hayvan, bitki ve bakteri gibi canlılarda, DNA barkodlama yöntemi farklı amaçlar için kullanılmakta olup canlı türüne ve kullanım amacına göre barkodlama için seçilen DNA bölgesi farklılık göstermektedir. Nukleus DNA'sında bulunan ITS bölgesi, çok sayıda kopyaya sahip olması sayesinde tür düzeyinde en yüksek doğruluğu (güvenirliği) sunan hem fungal hem de evrensel primerlerin tasarlanmasına olanak sağlayan, barkodlama da en fazla tercih edilen bölgelerden bir tanesidir (Schoch & ark., 2012; Nilsson & ark., 2019; Manzoor & ark., 2024; Baramidze & ark.,

2025). Tek veya daha fazla DNA bölgesinden elde edilen ampikon dizileme (örnek Sanger metodu), daha pahalı ve zaman alıcı olan tüm genom dizilemesinin (WGS) sınırlamalarını aşmak için tercih edilebilir. Ampikon dizilemede, yalnızca belirli gen bölgesi (ITS1 ve ITS2 vb) dizilenebilmektedir. Dizileme sırasında, daha önce PCR ile çoğaltılmış olan hedef DNA bölgeleri, Sanger dizileme yönteminde olduğu gibi, ddNTP'ler (dideoksinükleotid trifosfatlar) kullanılarak yeniden çoğaltılır. Bu işlem, DNA zincirinin farklı uzunluklarda sonlandırılmasını sağlayarak dizinin belirlenmesine olanak tanır. Sadece belirli hedef bölgelerin PCR ile çoğaltılıp ardından dizilenmesi, maliyet ve zaman açısından tüm genom dizilemesine kıyasla daha verimli bir yöntem sunar. ITS1 ve ITS2 alt bölgeleri sadece barkodlama da değil metabarkodlamada da sıkça kullanılan DNA bölgesidir (Rosa ve ark., 2020). ITS bölgesinin önemli bir sınırlılığı, filogenetik olarak yakın türler veya taksonlar arasında ayırım yapamaması ya da birbirine neredeyse tamamen benzeyen diziler içermesi gibi durumlarda ortaya çıkar (Blaalid & ark., 2013; Abdelfattah & ark., 2015). Bu nedenle, ITS bölgesine ek olarak TEF 1 α (translational elongation factor 1 α), LSU (26S Large Subunit), RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) genleri ikincil fungal DNA barkodları farklı araştırmacılar tarafından önerilmiştir (Robbertse & ark., 2017; Meyer & ark., 2019; Weaver & ark., 2024). Aşağıda, son yıllarda yayımlanan bazı barkodlama çalışmalarına örnekler verilmiştir.

Baramidze ve arkadaşları (2025), üzüm, narenciye ve süs bitkileri gibi ekonomik açıdan önem taşıyan bitki türlerinde önemli hastalıklara neden olan *Alternaria* cinsi mantar türlerinin tespitinde ITS bölgesini barkod bölge olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada, ITS1 ve ITS2 bölgelerini hedefleyen evrensel primerler (600 bp), Oxford Nanopore Technologies (ONT) barkod dizileri ile birleştirilmiştir. Dizileme işlemi; enfekte olmuş asma, mandalina, mazı ve akçaağaç örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Toplamda 38 örnek qPCR ile analiz edilmiş; bunlardan 8'i *Alternaria* pozitif çıkmış ve bu pozitif örnekler, ONT protokolü kullanılarak dizilenmiştir. Sonuç olarak, her pozitif örnekte *Alternaria* başarılı şekilde tanımlanabilmiştir.

ITS bölgesinin en önemli dezavantajı bazı mantar türlerinde genom içinde tekrar halinde bulunan ITS bölgesi içinde dizilim farklılıklarının (intragenomik varyasyon) bulunmasıdır (Kausarud, 2023; Bradshaw ve ark., 2025). Bradshaw ve arkadaşları (2025), 2414 mantar türünün genomu taranarak, intragenomik varyasyonun ne kadar yaygın bir hendikap olduğunu araştırmışlar ve türlerin 641'inin (%~25) genomunda birden fazla ITS kopyası bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu 641 türün 419'unda (%~65) ITS kopyaları arasında dizisel farklılıklar saptanmış ve intragenomik varyasyonun funguslarda oldukça yaygın olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak, kopya dizilerde bulunan varyasyonların, yeni mantar türünün hatalı tanımlanmasına yol açabileceğini ve özellikle çevresel DNA (eDNA) kullanılarak yapılan çeşitlilik tahminlerini yanıltabileceğini ifade etmişlerdir. Bu nedenle, sadece ITS bölgesinin kullanılmasının hatalı sonuçlara neden olabileceği bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır.

Bitkilerde hastalıklara neden olarak ekonomik kayıplara neden olan mantar cinslerinden biri de yaklaşık 8000 türle temsil edilen ve dünya çapında yayılım gösteren *Pucciniales* takımına ait taksonlardır (Kaishian & ark., 2024). Bu funguslar pas fungusları olarak bilinmekte olup doğru ve hızlı şekilde tanımlanabilmesi, mikologlar, botanikçiler, tarım bilimcileri, çiftçiler ve ilgili paydaşlar açısından büyük önem taşımaktadır. Pas funguslarının yaşam döngüsündeki karmaşıklık (beş farklı spor tipi üretimi ve iki ilgisiz konakçı türü arasında dönüşümlü yaşam) tespit edilerek önlem alınmasını zorlaştırmaktadır. En kapsamlı pas mantarı koleksiyonlarından birine sahip olan Purdue Üniversitesi'nde, 3700'den fazla pas mantarı örneğinden 28S ribozomal tekrar bölgesine ait barkod dizileri alınmış ve analiz sonuçlarında bireylerin 120 cinse ve 1100'den fazla türe yayılmakta olduğu saptanmıştır (Kaishian & ark., 2024).

Weaver ve arkadaşları (2024), en sık tercih edilen ve barkod olarak kabul gören ITS bölgesinin kopya sayılarının türler arasında hatta aynı tür içinde değişkenlik gösterdiğini ve bu durumunda canlılarda doğru teşhis yapılmasını engellediğini iddia etmişlerdir. Bu nedenle, Weaver ve arkadaşları, ITS bölgesine alternatif bir

amplikon hedefi kullanmayı tercih ederek insanlarda patojen olan fungusların tanımlamasını yapmışlardır. Bu çalışmada, tek kopyalı, yüksek çeşitliliğe sahip ve tekdüze uzunlukta bir DNA bölgesi (Tef1) tasarlanmış olan evrensel primerler kullanılarak Illumina iSeq100 platformunda mikrobiyom analizi yapılmıştır. Sanger dizileme yöntemine kıyasla, Illumina platformu düşük maliyetli, kompakt ve kolay kullanımlı bir yeni nesil dizileme (NGS) sistemidir. Çalışmaları sonucunda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhizopus*, *Fusarium* ve *Lomentospora* türlerini tef1 bölgesi dizileri kullanılarak başarıyla tanımlamıştır. ITS1 yöntemine kıyasla, karışık fungal topluluklar içinde yakın akraba olan *Aspergillus fumigatus* ile *A. fischeri* türlerinin tanımlamaları yapılabilmektedir.

Yukarıda kısa örnekleri verilen DNA barkodlama yöntemi, patojen etkiye sahip mantar türlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan, belirli bir gene ait kısa DNA dizilerine dayanarak tür düzeyinde organizmaları tanımlamayı amaçlayan güvenilir bir moleküler yaklaşımdır. DNA barkodlamanın temel mantığı, tanımlanmaya çalışılan türe ait DNA dizisinin, benzer DNA parçalarından oluşan bir referans kütüphanesinde karşılaştırılarak organizmanın tür düzeyinde tanımlanmasının ya da teşhisinin yapılmasıdır. Metabarkodlama ise barkodlamanın bir uzantısı olup, karışık örneklerden tür tanımlanmasını mümkün kılan yüksek verimli dizileme (high-throughput sequencing) tekniklerini kullanan bir yöntemdir (Cristescu, 2014). Aşağıda, klasik DNA barkodlamaya göre teknik ve uygulama açısından daha gelişmiş ve kapsamlı bir yaklaşım olan metabarkodlama ile ilgili güncel araştırmalardan örnekler verilmiştir.

Metabarkodlama tekniğinin kullanıldığı dikkat çeken çalışmalarından bir tanesi, Dao ve arkadaşları (2024) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, yaygın olarak ilaç sanayisinde ve besin takviyesi olarak da kullanılan *Angelicae*, *Cistanches*, *Ginseng* ve *Panacis* cinslerine ait bitki türlerinin kök yüzeylerinde bulunan fungal topluluğunu DNA metabarkodlama yöntemiyle analiz etmişlerdir. Çalışmada, yukarıda ismi geçen bitki türlerini temsil eden 12 ayrı örneğin ITS2 bölgesine ait DNA dizileri kullanılmıştır.

Tüm örneklerde, bitkilerde hastalık yapan funguslar (*Rhizopus Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*) yanında, insanda patojen olan (*Alternaria*, *Candida*, *Hyphopichia*, *Malassezia* vb) mantar cinslerine ait türler de tespit edilmiştir.

İnsanların vücuduna girerek hastalık yapan fungusların incelenmesi yanında, solumuş oldukları havada bulunan ve oldukça tehlikeli hastalıklara neden olabilen funguslar da metabarkodlama yöntemiyle tespit edilmiştir. Eriksen ve arkadaşları (2025), atık işleme alanlarında çalışanların maruz kaldıkları hava örneklerinde bulunan tehlikeli mikroorganizmaları (fungus ve bakteri) metabarkodlama yöntemiyle teşhis etmişlerdir. Mikrobiyal metabarkodlama yöntemiyle yapılan analizlerde, havadaki mikrobiyal topluluklar arasında en baskın türlerin *Cladosporium* cinsine ait olduğu belirlenmiş; ayrıca, ilaç direnci geliştirme potansiyeline sahip suşlar içeren potansiyel insan patojenleri olan *Aspergillus* ve *Fusarium* cinsleri de araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir.

İnsanlarda metabarkodlama yöntemiyle fungus türlerinin tespit edilmesinde en ilginç çalışmalardan biri Leita ve arkadaşları tarafından (2024) yapılmıştır. Araştırmacılar, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının bakteriyel ve viral enfeksiyonlarla bağlantısı olabileceğini öne süren çalışmaların bulunduğunu fakat mantar enfeksiyonları ile bağlantısını araştıran çok az sayıda çalışma olduğunu ifade etmişlerdir. Scientific Reports dergisinde yayınlanan çalışmalarında, insan beyin dokusu ve beyin omurilik sıvısındaki mantar cinslerinin varlığını karakterize etmek için nanopore tabanlı dizileme yöntemiyle metabarkodlama yapmışlardır. İki Alzheimer ve yaygın amiloid anjiyopatisi olan bir kontrol hastasının beyin dokusunda *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Cutaneotrichosporon* ve *Cryptococcus* cinsi funguslara ait DNA tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan bireyde de fungusların saptanması, kontrol olarak kullanılan bireyin 90 yaşında amiloid anjiyopatisi olan bir hasta olmasına bağlanmıştır. Amiloid β -peptitleri gibi proteinlerin anormal birikimini de Alzheimer hastalığıyla ilişkili olduğu düşünüldüğünden, kontrol bireyinde mantar DNA'sının varlığı beklenebildiği ifade edilmiştir. Metabarkodlamanın mantar tür

tanımlamasındaki duyarlılığının ve güvenilirliğinin artırılması için, birden fazla analiz hattının (pipeline) ve veritabanının kullanılması, makine öğrenmesine dayalı sınıflandırma sistemlerinin oluşturulması, mantara özgü primerlerin tasarlanmasının gerekli olduğu da vurgulanmıştır.

3. Sonuç

Fungal patojenlerin hızlı ve güvenilir şekilde teşhis edilmesi hem klinik mikoloji hem de tarımsal üretim açısından büyük önem taşımaktadır. Geleneksel yöntemlerin sınırlı hassasiyeti ve zaman alıcı olması, özellikle erken tanı ve tedavi gerektiren durumlarda yetersiz kalmaktadır. Moleküler yöntemlerin hızlı, duyarlı ve güvenilir olmaları, son yıllarda insan ve bitkilerde hastalıklara neden olan fungusların tanı süreçlerinde yaygın olarak kullanılmalarını sağlamıştır.

PCR ve türevleri gibi yöntemler (nested, multipleks, qPCR) hastalıklara neden olan patojenlerin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. LAMP ve HDA gibi izotermal teknikler ise özellikle saha koşullarında uygulanabilirlik açısından araştırmacılara kolaylıklar sağlamaktadır. DNA barkodlama ve metabarkodlama yaklaşımları, yalnızca patojen tespiti değil, aynı zamanda tür düzeyinde ayırt edici teşhis, çevresel izleme ve filogenetik analizler için de güçlü araçlar sunmaktadır. ITS bölgesi başta olmak üzere bazı gen bölgeleri, yüksek doğruluk oranlarıyla barkod olarak kullanılmakta; yeni teknolojilerle birlikte bu yöntemlerin etkinliği daha da artmaktadır.

Günümüzde moleküler tanı sistemlerinin kullanımı, fungal hastalıkların kontrolünde daha hızlı müdahale, daha az ekonomik kayıplar ve daha başarılı tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu tekniklerin geliştirilmesi ve gerektiğinde entegre olarak kullanılması, gelecekte hem insan hem de bitki sağlığında mantar kaynaklı hastalıklarla mücadelede çok daha etkin bir yaklaşım sunacaktır.

Kaynakça

Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola, S. O., Droby, S., & Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS ONE*, *10*(7), e0131069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069>

Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B., Rahman, M. M., Amin, M. A., Rashid, N. R., & Asing. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, *177*(3), 214–224.

An, L., Tang, W., Ranalli, T. A., Kim, H. J., Wytiaz, J., & Kong, H. (2005). Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 28952–28958.

Arastehfar, A., Fang, W., Daneshnia, F., Al-Hatmi, A. M., Liao, W., Pan, W., Khan, Z., Ahmad, S., Rosam, K., Lackner, M., Lass-Flörl, C., Hagen, F., & Boekhout, T. (2019). Novel multiplex real-time quantitative PCR detecting system approach for direct detection of *Candida auris* and its relatives in spiked serum samples. *Future Microbiology*, *14*, 33–45. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0227>

Arastehfar, A., Fang, W., Badali, H., Vaezi, A., Jiang, W., Liao, W., Pan, W., Hagen, F., & Boekhout, T. (2018). Low-cost tetraplex PCR for the global spreading multi-drug resistant fungus, *Candida auris* and its phylogenetic relatives. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01119>

Avenot, H. F., Jaime-Frias, R., Travadon, R., Holland, L. A., Lawrence, D. P., & Trouillas, F. P. (2022). Development of PCR-based assays for rapid and reliable detection and identification of canker-causing pathogens from symptomatic almond trees. *Phytopathology*, *112*(8), 1710–1722. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0351-R>

Avni, T., Leibovici, L., & Paul, M. (2011). PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 665–670. <https://doi.org/10.1128/JCM.01602-10>

Bajpai, V. K., Khan, I., Shukla, S., Kumar, P., Rather, I. A., Park, Y. H., Huh, Y. S., Han, Y. K. (2019). Invasive fungal infections and their epidemiology: Measures in the clinical scenario. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(3), 436–444. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0477-0>

Balestrini, R. (2021). Grand challenges in fungi-plant interactions. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 750003. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.750003>

Baramidze, V., Sella, L., Japaridze, T., Dzotsenidze, N., Lamazoshvili, D., Abashidze, N., Basilidze, M., & Tomashvili, G. (2025). A barcoded ITS primer-based nanopore sequencing protocol for detection of *Alternaria* species and other fungal pathogens in diverse plant hosts. *Journal of Fungi*, 11(4), 249. <https://doi.org/10.3390/jof11040249>

Barreda-García, S., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J., & Lobo-Castañón, M. J. (2018). Helicase-dependent isothermal amplification: A novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 679–693.

Bastien, P., Procop, G. W., & Reischl, U. (2008). Quantitative realtime PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1897–1900.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 9(10), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 218–224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>

Bogdan, I., Reddyreddy, A.R., Nelluri, A., Maganti, R.K., Bratosin, F., Fericean, R.M., Dumitru, C., Barata, P.I., Tapalaga, G., Marincu, I. (2023). Fungal Infections Identified with Multiplex PCR in Severe COVID-19 Patients during Six Pandemic Waves. *Medicina* 59, 1253. <https://doi.org/10.3390/medicina59071253>

Böhm, J., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwatal, J., Oehlmann, R., & Oßwald, W. (1999). Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology*, 147, 409–416. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1999.tb03842.x>

Bradshaw, M.J., Aime, M.C., Rokas, A., Mausti A., Moparthi, S. et al. (2025). Extensive intragenomic variation in the internal transcribed spacer region of fungi. *iScience*, 26(8), 107317

Bruce, M., Stratford, E., Armstrong-Cho, C., & Banniza, S. (2025). A multiplex PCR assay for the detection of six foliar fungal pathogens of faba bean. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/07060661.2024.2448672>

Carvalho-Pereira, J., Fernandes, F., Araújo, R., Springer, J., Loeffler, J., Buitrago, M. J., Pais, C., & Sampaio, P. (2020). Multiplex PCR based strategy for detection of fungal pathogen DNA in patients with suspected invasive fungal infections. *Journal of Fungi (Basel)*, 6(4), 308. <https://doi.org/10.3390/jof6040308>

Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R. J. B., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., & Wear, M. P. (2019). The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, 10, 822–831. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>

Chen, L., Lü, G., Yang, S., Gong, B., Lu, Y., Wu, X., Li, J., & Gao, H. (2024). Advances in the detection technology of vegetable soil borne fungi and bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1460729. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1460729>

Chong, G. L., van de Sande, W. W., Dingemans, G. J., Gaajetaan, G. R., Vonk, A. G., Hayette, M. P., et al. (2015). Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 868–874.

Ciampi, G. M., Ramiro, J., Moraes, M. H. D., Barbieri, M. C. G., Massola Júnior, N. S. (2020). Multiplex qPCR assay for direct detection and quantification of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassicola*, and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds. *Plant Disease*, 104, 3002–3009.

Corbu, V. M., Gheorghe-Barbu, I., Dumbravă, A. Ș., Vrâncianu, C. O., Șesan, T. E. (2023). Current insights in fungal importance—A comprehensive review. *Microorganisms*, 11(6), 1384. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061384>

Cotter, A., Dracatos, P., Beddoe, T., & Johnson, K. (2024). Isothermal detection methods for fungal pathogens in closed environment agriculture. *Journal of Fungi*, 10(12), 851. <https://doi.org/10.3390/jof10120851>

Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: Towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>

Dannaoui, E., Gabriel, F., Gaboyard, M., Lagardere, G., Audebert, L., Quesne, G., et al. (2017). Molecular diagnosis of invasive aspergillosis and detection of azole resistance by a newly commercialized PCR kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(11), 3210–3218. <https://doi.org/10.1128/JCM.01032-17>

Daniel, R. (2004). The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.005>

Dao, Y., Yu, J., Yang, M., Han, J., Fan, C., Pang, X. (2024). DNA metabarcoding analysis of fungal community on surface of four root herbs. *Chinese Herbal Medicines*, 16(1), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.01.003>.

D’Andreano, S., Cuscó, A., & Francino, O. (2021). Rapid and real-time identification of fungi up to species level with long amplicon nanopore sequencing from clinical samples. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), bpaa026. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa026>

Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*.

Deng, S., Chang, W., Liu, Q., Zhao, Y., Liu, J., & Wang, H. (2024). Development and application of multiplex PCR for the rapid identification of four *Fusarium* spp. associated with Fusarium crown rot in wheat. *PeerJ*, 12, e17656. <https://doi.org/10.7717/peerj.17656>

Ellis, G. C., Shaikh, F., Carson, M. L., Sercy, E., Stewart, L., Andrews, J. M., Campbell, W. R., Mende, K., Yabes, J. M., Tribble, D. R., Bialek, R., Wickes, B. L., & Ganesan, A. (2024). A seminested PCR method for the diagnosis of invasive fungal infections in combat injured. *Open Forum Infectious Diseases*, 11(6), ofae078. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofae078>

Elvira-Gonzalez, L., Puchades, A. V., Carpino, C., Alfaro-Fernandez, A., Font-San-Ambrosio, M. I., Rubio, L., & Galipienso, L. (2017). Fast detection of Southern tomato virus by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*, 241, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.06.005>

Eriksen, E., Graff, P., Eiler, A. Straumfors A., Komlavi A. A (2025). DNA metabarcoding and its potential in microbial risk

assessment in waste sorting plants. *Scientific Reports*, 15, 8941. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93697-9>

Fang, W., Wu, J., Cheng, M., et al. (2023). Diagnosis of invasive fungal infections: Challenges and recent developments. *Journal of Biomedicine and Science*, 30, 42. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00926-2>

Fong-Flores, V., Murillo-Gallo, A., Contreras-Ojeda, L. and Barraza, A. (2022) Sanger Sequencing Implementation in Clinically Ill Patients for Bacterial and Fungal Pathogens Identification. *Advances in Infectious Diseases*, 12, 363-382. <https://doi.org/10.4236/aid.2022.123029>

Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E. J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00796.x>

Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. (2004). Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 1445–1454. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh181>

Ghaedi, M., Bolboli, Z., Negahban, H., et al. (2025). PCR-based detection of Botryosphaeria canker pathogens in fig trees. *Scientific Reports*, 15, 4220. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88232-9>

Ghimire, B., Sapkota, S., Bahri, B. A., Martinez-Espinoza, A. D., Buck, J. W., & Mergoum, M. (2020). Fusarium head blight and rust diseases in soft red winter wheat in the southeast United States: State of the art, challenges and future perspective for breeding. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1080. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01080>

Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D., & Gingeras, T. R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled

after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1874–1878. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>

Guo, M., Jiang, W., Yang, M., Dou, X., & Pang, X. (2020). Characterizing fungal communities in medicinal and edible Cassiae Semen using high-throughput sequencing. *International journal of food microbiology*, 319, 108496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108496>

Hajia, M. (2018). Limitations of different PCR protocols used in diagnostic laboratories: A short review. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1, 1-6.

Hariharan, G., & Prasannath, K. (2021). Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 10, 600234. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234>

Hoenigl, M., Seidel, D., Sprute, R., et al. (2022). COVID-19-associated fungal infections. *Nature Microbiology*, 7, 1127–1140. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01172-2>

He, S., Chen, H., Wei, Y., An, T., & Liu, S. (2020). Development of a DNA-based real-time PCR assay for the quantification of *Colletotrichum camelliae* growth in tea (*Camellia sinensis*). *Plant Methods*, 16, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00607-7>

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., et al. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 53(4), 313–337. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>

Ismadi, Y. K. M., Mohamad, S., & Harun, A. (2024). Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of common fungal pathogens in invasive mycoses. *PeerJ*, 12, e18238. <https://doi.org/10.7717/peerj.18238>

Ismaila, A. A., Ahmad, K., Siddique, Y., Wahab, M. A. A., Kutawa, A. B., Abdullahi, A., et al. (2023). Fusarium wilt of banana: Current update and sustainable disease control using classical and essential oils approaches. *Horticultural Plant Journal*, 9, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.02.004>

Iwasaki, S., Okada, N., Kimura, Y., Takikawa, Y., Suzuki, T., Kakutani, K., Matsuda, Y., Bai, Y., & Nonomura, T. (2022). Simultaneous detection of plant-and fungus-derived genes constitutively expressed in single *Pseudoidium neolycopersici* inoculated Type I trichome cells of tomato leaves via multiplex RT-PCR and nested PCR. *Agriculture*, 12(2), 254. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020254>

Ivanov, A. V., Safenkova, I. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2021). The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens. *Plants*, 10(11), 2424. <https://doi.org/10.3390/plants10112424>

Jainlabdin, M. H., Chua, A. L., Nizam, T. M., & Santhanam, J. (2018). Dual panel multiplex PCR assay for rapid detection of medically important fungi and resistant species of *Candida* and *Aspergillus*. *Sains Malaysiana*, 47, 489–498. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4703-08>

Kaishian, P., Layug, C. R. K., Anderson, M., Berg, D. R., & Aime, M. C. (2024). Rust HUBB: DNA barcode-based identification of *Pucciniales*. *IMA Fungus*, 15(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00132-7>

Kauserud, H. (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274>

Khan, M., Wang, R., Li, B., Liu, P., Weng, Q., & Chen, Q. (2018). Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2089. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02089>

Kiddle, G., Hardinge, P., Buttigieg, N., Gandelman, O., Pereira, C., McElgunn, C. J., Rizzoli, M., Jackson, R., Appleton, N., Moore, C., et al. (2012). GMO detection using a bioluminescent real-time reporter (BART) of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology*, 12, 15. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-15>

Koentjoro, M. P., Hidayat, T., Maat, S., Fasya, A. H. Z., & Prasetyo, E. N. (2023). Development of nested-PCR assay for the rapid detection of *Aspergillus fumigatus*. In A. Taufiq, H. Susanto, I. C. Wang, H. Nur, M. Aziz, C.-R. Chang, G. Elbers, S. R. Lestari, M. Diantoro, N. Mufti, C. S. Ng, N. A. N. N. Malek, Sunaryono, Y.-H. Chiu, S. Zubaidah, Aulanni'am, I. Wibowo, & A. Y. Handaya (Eds.), *4th International Conference on Life Science and Technology, ICoLiST 2023 Article 020009* (AIP Conference Proceedings, Vol. 2634). American Institute of Physics Inc. <https://doi.org/10.1063/5.0111758>

Khalid, A., Santhanam, J., Tzar, M. N., Chua, A., Wahid, S. F. A., Mat, W. R. W., Rahman, R. A., Periyasamy, P. (2025). Evaluation of a PCR-based lateral flow device for detecting *Aspergillus* and *Candida* species from clinical specimens. *Heliyon*, 11(3), e42245. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42245>

Kim, W. B., Park, C., Cho, S. Y., Chun, H. S., & Lee, D. G. (2020). Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. *PLOS ONE*, 15(10), e0229561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229561>

Kolm, C., Martzy, R., Führer, M., et al. (2019). Detection of a microbial source tracking marker by isothermal helicase-dependent amplification and a nucleic acid lateral-flow strip test.

Scientific Reports, 9, 393. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36749-7>

Lau, H. Y., & Botella, J. R. (2017). Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02016>

Lebeda, A., Křístková, E., Mieslerová, B., Dhillon, P. S., & McCreight, J. (2024). Status, gaps and perspectives of powdery mildew resistance research and breeding in cucurbits. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 43(4), 211–290. <https://doi.org/10.1080/07352689.2024.2315710>

Leitao, R., Wan, I.U., Chown, H., Williams T.J., Fisher M. C. et al., (2024). Detection of fungal sequences in human brain: rDNA locus amplification and deep sequencing. *Scientific Reports*, 14, 31790. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82840-7>

Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A. E., & Tzakos, A. G. (2024). DNA barcoding as a plant identification method. *Applied Sciences*, 14(4), 1415. <https://doi.org/10.3390/app14041415>

Liu, J., Deng, S. Y., Chang, W., Yu, D. Z., & Wang, H. (2024). Development of a multiplex PCR assay for the detection of tomato wilt caused by co-infection of *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium oxysporum*, and *Ralstonia solanacearum* based on comparative genomics. *Plant Disease*, 108(5), 1128–1138. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-23-2169-RE>

Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4, 357–362.

Lockhart, S. R., Chowdhary, A., & Gold, J. A. (2023). The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi.

Nature Reviews Microbiology, 21(12), 818–832.
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00848-7>

Löhrer, M., Vogel, L., Petrescu Dita Singer, S., et al. (2022). PCR diagnostics for rapid detection of fungi associated with black root rot of strawberries. *Journal of Plant Disease and Protection*, 129, 1053–1062. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00594-8>

Lucignano, B., Ranno, S., Liesenfeld, O., Pizzorno, B., Putignani, L., Bernaschi, P., Menichella, D. (2011). Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2160–2162.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02460-10>

Luo, Y., Gu, S., Felts, D., Puckett, R. D., Morgan, D. P., & Michailides, T. J. (2017). Development of qPCR systems to quantify shoot infections by canker-causing pathogens in stone fruits and nut crops. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 416–428.
<https://doi.org/10.1111/jam.13339>

Maffert, P., Reverchon, S., Nasser, W., Rozand, C., & Abaibou, H. (2017). New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(10), 1717–1731.
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-2857-3>

Manzoor, S., Mir, A. Z., Wani, T. A., Gulzar, H., Nabi, Z., Parveen, S., Rather, T., & Un Nabi, S. (2024). Recent advances in diagnostic approaches for plant pathogen detection. In *Futuristic Trends in Biotechnology* (Vol. 3, Book 3, Part 1, Chapter 2). IIP Series. <https://doi.org/10.58532/V3BFBT3P1CH2>

Mechanic, L. E., Frankel, B. A., & Matson, S. W. (2000). Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 38337–38346.

Mendonça, A., Santos, H., Franco-Duarte, R., & Sampaio, P. (2022). Fungal infections diagnosis—past, present, and future.

Meyer, W., Irinyi, L., Hoang, M. T. V., Robert, V., Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., Yurayart, C., Tsang, C. C., Lee, C. Y., Woo, P. C. Y., Pchelin, I. M., Uhrlaß, S., Nenoff, P., Chindamporn, A., Chen, S., Hebert, P. D. N., & Sorrell, T. C. (2019). Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1 α (TEF1 α). *Genome*, 62(3), 160–169. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0083>

Mishra, S., Srivastava, A., Singh, A., Pandey, G. C., & Srivastava, G. (2024). An overview of symbiotic and pathogenic interactions at the fungi-plant interface under environmental constraints. *Frontiers in Fungal Biology*, 5, 1363460. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1363460>

Mudiyanselage, A. M. H., Jones, E. E., Jaspers, M. V., Walter, M., & Ridgway, H. J. (2021). A one-step nested PCR method for detection of *Peronospora sparsa*, the downy mildew pathogen, in boysenberry (*Rubus ursinus*). *European Journal of Plant Pathology*, 160, 973–981. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02283-y>

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262, 56–61.

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.

Negahban, H., Zeinab, B., & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. (2024). Development of PCR-based assays for the detection of the evident and latent infection with *Stilbocrea banihashemiana*, the causal agent of fruit tree cankers. *Crop Protection*, 18, 106677. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106677>

Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews*

Microbiology, 17(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

Obande, G. A., & Banga Singh, K. K. (2020). Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections. *Infection and Drug Resistance*, 13, 455–483. <https://doi.org/10.2147/IDR.S217571>

O'Neil, D., Doseeva, V., Rothmann, T., Wolff, J., Nazarenko, I. (2011). Evaluation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* detection in urine, endocervical, and vaginal specimens by a multiplexed isothermal thermophilic helicase-dependent amplification (tHDA) assay. *J Clin Microbiol.* 49(12):4121-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00952-11>

Pagano, L., & Fernández, O. M. (2025). Clinical aspects and recent advances in fungal diseases impacting human health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(Supplement_1), i2–i8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaf004>

Palanisamy, A., Karthikeyan, M., Jaffer, S.B., Dhanabalan, S.P., Shanmugavel, B., Johnson, I., Revathy, N., Boopathi, N.M., Santosh, G.P., Periyannan, S. (2025). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and suction spore trap-based assay for detection of mildew pathogens *Podosphaera xanthii* and *Pseudoperonospora cubensis* in cucurbits. *Crop Protection*, 187,106964. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106964>.

Palka-Santini, M., Cleven, B. E., Eichinger, L., Krönke, M., & Krut, O. (2009). Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiology*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-1>

Pathakumari, B., Liang, G., & Liu, W. (2020). Immune defence to invasive fungal infections: a comprehensive review.

Biomedicine & Pharmacotherapy, 130, 110550.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110550>

Prasannakumar, M. K., Parivallal, P. B., Pramesh, D., Mahesh, H. B., & Raj, E. (2021). LAMP-based foldable microdevice platform for the rapid detection of *Magnaporthe oryzae* and *Sarocladium oryzae* in rice seed. *Scientific Reports*, 11, 178. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82545-y>

Priyashantha, A. H., Dai, D. Q., Bhat, D. J., Stephenson, S. L., Promptutha, I., Kaushik, P., et al. (2023). Plant–fungi interactions: where it goes? *Biology*, 12, 809. <https://doi.org/10.3390/biology12060809>

Raclariu, A. C., Heinrich, M., Ichim, M. C., & de Boer, H. (2018). Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 123–128. <https://doi.org/10.1002/pca.2732>

Rappo, U., Schuetz, A. N., Jenkins, S. G., Calfee, D. P., Walsh, T. J., Wells, M. T., Hollenberg, J. P., Glesby, M. J. (2016). Impact of early detection of respiratory viruses by multiplex PCR assay on clinical outcomes in adult patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 2096–2103.

Robbertse, B., Strobe, P. K., Chaverri, P., et al. (2017). Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying ‘one name one species’ in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. *Database*, 2017, article ID bax072. <https://doi.org/10.1093/database/bax072>

Rosa, L. H., da Silva, T. H., Ogaki, M. B., et al. (2020). DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. *Scientific Reports*, 10, 21986. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78934-7>

Sharma, G., Dwibedi, V., Seth, C. S., Singh, S., Ramamurthy, P. C., Bhadrecha, P., Singh, J. (2024). Direct and indirect technical guide for the early detection and management of

fungal plant diseases. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, 10027. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100276>

Sridapan, T., Jaturapaktrarak, C., Rujirawat, T., Jiaranaikulwanich, A., Yurayart, C., Krajaejun, T. (2024). A colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay (c-LAMP) for rapid detection of *Pythium insidiosum*. *Heliyon*, 10(22): e40478. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40478>.

Qin, L., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Jiang, D., Li, G., & Huang, J. (2011). A nested-PCR method for rapid detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on petals of oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology*, 60, 271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02372.x>

Quintero-Vásquez, G. A., Bazán-Tejeda, M. L., Martínez-Peñañiel, E., Kameyama-Kawabe, L., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2013). Multiplex PCR to detect four different tomato-infecting pathogens. *Folia Microbiologica*, 58(4), 269–276. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0301-3>

Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. (2020). Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Research*, 48, e42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz928>

Romero-Cuadrado, L., López-Herrera, C. J., Aguado, A., & Capote, N. (2023). Duplex Real-Time PCR Assays for the Simultaneous Detection and Quantification of *Botryosphaeriaceae* Species Causing Canker Diseases in Woody Crops. *Plants*, 12(11), 2205. <https://doi.org/10.3390/plants12112205>

Salcedo, A. F., Purayannur, S., Standish, J. R., Miles, T., Thiessen, L., & Quesada-Ocampo, L. M. (2021). Fantastic downy mildew pathogens and how to find them: Advances in detection and diagnostics. *Plants*, 10, 435. <https://doi.org/10.3390/plants10030435>

Salcedo, A., Parada-Rojas, C. H., Guerrero, R., Stahr, M., D’Arcangelo, K. N., McGregor, C., et al. (2023). The NLR family

of disease resistance genes in cultivated watermelon and other cucurbits: opportunities and challenges. *Watermelon Genome*, 37–67.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Shi, N. N., Ruan, H. C., Chen, W. L., Chen, Q. H., Chen, F. R., & Du, Y. X. (2023). Development of species-specific PCR detection for three *Mycogone* species causing wet bubble disease in white button mushroom. *Crop Protection*, 164, 106141. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106141>

Strickland, A. B., & Shi, M. (2021). Mechanisms of fungal dissemination. *Cell and Molecular Life Sciences*, 78, 3219–3238. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03736-z>

Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, 10, 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10071931>

Sun, X., Zhang, L., Meng, C., et al. (2020). Establishment and application of a multiplex PCR assay for detection of *Rhizoctonia cerealis*, *Bipolaris sorokiniana*, and *Fusarium* spp. in winter wheat. *Journal of Plant Pathology*, 102, 19–27. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00365-9>

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>

Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2012). Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*, 53, 81–89.

Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Tennakoon, D. S., Jayatunga, D. P. W., Hongsanan, S., & Xie, N. (2024). Humans vs. Fungi: An Overview of Fungal Pathogens against Humans. *Pathogens*, 13(5), 426. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050426>

Tomlinson, J. A., Dickinson, M. J., & Boonham, N. (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 650–657.

Wang, J., Li, X., Sun, X., Huo, X., Li, M., Han, C., & Liu, A. (2023). Establishment and Application of a Multiplex PCR Assay for Detection of *Sclerotium rolfsii*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Fusarium oxysporum* in Peanut. *Molecular Biotechnology*, 65(8), 1369–1377. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00647-1>

Weaver, D., Novak-Frazer, L., Palmer, M., et al. (2024). Development of a novel mycobiome diagnostic for fungal infection. *BMC Microbiology*, 24, 63. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03197-5>

Wei, S., Sun, Y., Xi, G., Zhang, H., Xiao, M., & Yin, R. (2018). Development of a single-tube nested PCR-lateral flow biosensor assay for rapid and accurate detection of *Alternaria panax* Whetz. *PLoS ONE*, 13(11), e0206462.

Wei, X., Cao, P., Wang, G., & Han, J. (2020). Microbial inoculant and garbage enzyme reduced cadmium (Cd) uptake in *Salvia miltiorrhiza* (Bge.) under Cd stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110311. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110311>

White, P. L., Bretagne, S., Caliendo, A. M., et al. (2021). *Aspergillus* polymerase chain reaction—an update on technical recommendations, clinical applications, and justification for inclusion in the second revision of the EORTC/MSGERC definitions

of invasive fungal disease. *Clinical Infectious Diseases*, 72, S95–S101. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1865>

Wilisiani, F., Tomiyama, A., Katoh, H., Hartono, S., Neriya, Y., Nishigawa, H., & Natsuaki, T. (2019). Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods*, 265, 71–76.

Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. M. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Reports*, 5, 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>

Yu, L. S., Chou, S. Y., Wu, H. Y., Chen, Y. C., & Chen, Y. H. (2021). Rapid and semi-quantitative colorimetric loop-mediated isothermal amplification detection of ASFV via HSV color model transformation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54, 963–970.

Zakaria, L. (2023). Fusarium species associated with diseases of major tropical fruit crops. *Horticulturae*, 9, 322. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030322>

Zang, R., Yin, Z., Ke, X., Wang, X., Li, Z., Kang, Z., & Huang, L. (2012). A nested PCR assay for detecting *Valsa mali* var. *Mali* in different tissues of apple trees. *Plant Disease*, 96(11), 1645–1652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0387-RE>

Zanoli, L. M., & Spoto, G. (2013). Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors*, 3, 18–43.

Zuo, W., Ökmen, B., Depotter, J. R., Ebert, M. K., Redkar, A., Misas Villamil, J., et al. (2019). Molecular interactions between smut fungi and their host plants. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 411–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-0827118-100139>

COVID19 HASTALIĞINA NEDEN OLAN SARS-COV-2 PROTEİNLERİNİN MUTASYONLARININ DERİN MUTASYON TARAMA DENEYLERİ VE ESCOTT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

MUSTAFA TEKPINAR¹

1. Giriş

Covid-19 milyonlarca insanın hayatına malolmuş olan virüs kökenli bir hastalıktır (<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>). Virüsler oldukça hızlı mutasyona uğrayan biyolojik varlıklardır ve bu mutasyonların virüs fonksiyonu ile konak canlı üzerindeki etkilerini anlamak toplum sağlığı açısından hayati öneme sahiptir. Bu nedenden dolayı SARS-CoV-2 virüsü mutasyonlarına dair çeşitli deneysel ve hesaplamalı araştırmalar yapılmıştır (Flynn ve ark., 2022; Iketani ve ark., 2022; Starr ve ark., 2020). Deneysel mutasyon analizlerinde, özellikle büyük ölçekli mutasyonel etkilerin değerlendirilmesine olanak tanıyan yüksek verimli tarama yöntemleri büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemlerle viral proteinlerin mutasyonları ve bu mutasyonların konak canlıdaki proteinlerle etkileşimi ele alınmaktadır. Ancak, bu tür deneysel yaklaşımların uygulanması hem maliyet hem de zaman açısından

¹ Doç. Dr., Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0002-0207-0446, tekpinar@buffalo.edu

oldukça zahmetlidir. Bu nedenle hesaplamalı yöntemler gibi hızlı ve doğru yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Mutasyon etkilerini hesaplamalı yöntemlerle doğru tahmin etmek oldukça aktif bir araştırma konusudur. Bu konuda geliştirilmiş yöntemleri genel olarak iki gruba ayırmak mümkündür. İlk grup makine öğrenmesine dayanan yöntemlerdir. Bu gruptaki yöntemler de denetimli ve denetimsiz makine öğrenmesi yöntemleri olarak iki alt gruba ayrılabilir. Denetimli öğrenme yöntemleri için önceden sınıflandırılmış veya etiketlenmiş veri setlerine ihtiyaç vardır. Derin mutasyon taraması (DMT) verilerinin herkese açık MaveDB ve ProteinGym gibi veri tabanlarında paylaşılması sayesinde denetimli öğrenme alanındaki yapılan araştırmalar hız kazanmıştır (Esposito ve ark., 2019; Notin ve ark., 2023). Ancak, denetimli öğrenmede eğitim (training) ve test için kullanılan verilerin direkt veya dolaylı olarak birbiri ile karışması tahminlerin güvenilirliğine gölge düşüren önemli problemlerden biridir (Grimm ve ark., 2015). Bir başka problem ise insan mutasyonları verileri ile eğitim yapılan bir yöntemin, virüsler veya bakteriler gibi tamamen farklı organizmalardaki mutasyon etkilerini tahmin etmede kullanılmasıdır. Yani, yöntemlerin sonuçlarının başka türlere aktarılabilirliği önemli bir sorun oluşturmaktadır. Denetimli öğrenmede karşılaşılan bu problemlerden dolayı, son yıllarda mutasyon etkileri ve protein tasarımı gibi alanlar için DNA ve protein dil modellerine dayalı pek çok denetimsiz öğrenme yöntemi de geliştirilmiştir (Brandes, Goldman, Wang, Ye, & Ntranos, 2023). Ancak bu kitap bölümün yazımı sırasında mevcut araştırmalar, bu yöntemlerin deneysel verilerle uyumunun -özellikle virüs mutasyonları için- çok yüksek olmadığını göstermektedir.

Makine öğrenmesine dayanmayan ve ikinci grupta yer alan hesaplamalı yöntemler, literatürde genellikle klasik yöntemler olarak tanımlanmaktadır. Klasik yöntemlerde proteinlerin üç boyutlu yapıları, amino asitlerin fizikokimyasal özellikleri, amino asit korunumu gibi pek çok parametre dikkate alınarak mutasyon etkileri tahmin edilmektedir. SIFT, PROVEAN ve ESCOTT algoritmaları klasik yöntemlere örnek olarak verilebilir (Choi, Sims, Murphy, Miller, & Chan, 2012; Ng & Henikoff, 2003; Tekpinar,

David, Henry, & Carbone, 2025). ESCOTT yönteminin virüsler için tahminlerinin doğruluğu daha önceki araştırmalarda ortaya konmuştur (Ozaktas, Dizkirici, Carbone, & Tekpınar, 2024).

Bu kitap bölümünde, öncelikle deneysel yöntemlerle incelenen SARS-CoV-2 proteinleri ele alınacaktır. Hesaplamalı yöntem olarak ise, son zamanlarda geliştirilmiş olan ve virüs proteinleri üzerinde yüksek doğrulukta tahminler yapabildiği gösterilen ESCOTT yöntemi ele alınacaktır. Öncelikle bu iki yöntemin iki SARS-CoV-2 proteini üzerinden deneysel verilerle uyumu gösterilecektir. Ardından, hakkında deneysel veri olmayan SARS-CoV-2 proteinleri için ESCOTT ile tüm mutasyon tahminleri yapılacak ve bunların analizleri sunulacaktır.

2. Materyal ve Yöntemler

2.1 Derin mutasyon taraması (DMT)

DMT, genetik mutasyonlar ve onların fenotipik etkileri arasındaki ilişkiyi sistematik olarak incelemek için tasarlanmış deneysel bir tekniktir. DMT, bir gen veya protein dizisine paralel biçimde binlerce mutasyon ekleyerek, araştırmacıların bu mutasyonların fonksiyonel etkilerini kayda değer bir verimlilik ve hassasiyetle değerlendirmelerini sağlar. Bu yaklaşım, mutasyonların protein fonksiyonu, stabilitesi veya etkileşimleri üzerindeki etkileri hakkında ayrıntılı bilgiler sağlayarak, onu genotip-fenotip ilişkileri, protein mühendisliği ve hastalıkla ilişkili genetik varyantları incelemek için güçlü bir araç haline getirir (Fowler & Fields, 2014; Wei & Li, 2023).

Bu çalışmada, iki SARS-CoV-2 proteini için gerçekleştirilmiş dört DMT deneyi kullanılmıştır. Deneylerin iki tanesi SPIKE proteini için (Starr vd., 2020), öteki iki tanesi ise main-proteaz proteini için gerçekleştirilmiştir (Flynn vd., 2022; Iketani vd., 2022).

2.2 ESCOTT mutasyon etkisi tahmin yöntemi

ESCOTT, mutasyon etkilerini tahmin etmek için geliştirilmiş genel bir algoritmadır. ESCOTT yöntemi proteinlerin sekans, fizikokimya ve yapı bilgilerini kullanarak bir mutasyonun protein yapısında herhangi bir etkisi olup olmayacağına dair bilgi vermektedir. Bu yöntemde, mutasyon etkileri iki bileşen kullanılarak hesaplanır. İlk bileşen, ‘bağımsız bileşen’ olarak adlandırılan ve bir çoklu sekans hizalama dosyasında amino asit frekanslarına dayanan bileşendir. Burada amino asitlerin sadece belirli bir sütundaki frekansları dikkate alınır ve öteki amino asitlerle etkileşimleri göz önünde bulundurulmaz. İkinci bileşen ise ‘epistatik bileşen’ olarak adlandırılır ve bir proteindeki amino asitlerin birbiri ile etkileşimi dolaylı olarak dikkate alınır. Bu etkileşim ‘evrimsel mesafe’ adı verilen bir metrik ile sayısallaştırılır. Evrimsel mesafe, herhangi bir çoklu hizalama dosyasında bir referans sekansa en yakın sekansın bulunması ve referans sekanstan farklı her amino asit için belirlenen skorların toplamının alınması ile ortaya çıkar. ESCOTT yönteminin öncülü olan GEMME (Laine, Karami, & Carbone, 2019) yönteminde bu skor JET skoru (Engelen, Trojan, Sacquin-Mora, Lavery, & Carbone, 2009) adı verilen bir amino asit korunum skoruna dayanarak hesaplanmaktaydı. ESCOTT programında ise JET skoruna ek olarak, amino asitlerin fizikokimyasal ve CV (circular variance) gibi yapısal özellikleri de dikkate alınmaktadır (Ceres, Pasi, & Lavery, 2012; Mezei, 2003). Bu üç özelliğin ikili lineer kombinasyonları arasından en baskın olan bileşen seçilerek analizde kullanılmaktadır. Nihai sonuç için bağımsız bileşene 0,40, epistatik bileşene ise 0,60 ağırlık verilmekte; böylece kombine etki bu iki bileşenin ağırlıklı toplamından oluşmaktadır.

Bu çalışmada ESCOTT v1.6.0 versiyonu kullanılmıştır. ESCOTT hesaplamaları için iki temel veri gerekmektedir. İlk veri referans proteinin ilk sırada yer aldığı bir çoklu sekans hizalama (MSA) dosyasıdır. İkinci veri ise referans proteinin PDB formatındaki üç boyutlu yapı dosyasıdır. Bu çalışmadaki hesaplamalarda tüm proteinlerin monomerik yapıları kullanılmıştır. Dolayısıyla, proteinlerin oligomerik durumları dikkate alınmamıştır. Hem monomerik protein yapıları hem de MSA dosyaları Colabfold

kullanılarak elde edilmiştir (Jumper ve ark., 2021; Mirdita ve ark., 2022).

2.3 Referans SARS-CoV2 genomu ve proteinleri

Referans SARS-CoV2 genomu olarak NCBI veri tabanında yer alan NC_045512.2 numaralı genom kullanılmıştır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_045512.2) (Wu ve ark., 2020). Referans genomun içerdiği proteinler Tablo 1’de verilmiştir. Tabloda ilk sırada yer alan YP_009724389.1 kodlu protein bir poliproteindir ve yapısal olmayan (non-structural) 16 protein içermektedir. Diğer proteinler ise virüs yapısında yer alan yapısal proteinlerdir. Yapısal olmayan proteinlerin poliprotein içindeki konumları ve bilinen işlevleri ise Tablo 2’de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 1: SARS-CoV2 genomunda yer alan proteinler. Kırmızı font ile yazılmış proteinler için hesaplama yapılamamıştır.

Protein_ID	Ürün	Gen
YP_009724389.1	<i>ORF1ab polyprotein (NSPs)</i>	<i>ORF1ab</i>
YP_009725295.1	<i>ORF1a polyprotein</i>	<i>ORF1ab</i>
YP_009724390.1	<i>Surface glycoprotein</i>	<i>S</i>
YP_009724391.1	<i>ORF3a protein</i>	<i>ORF3a</i>
YP_009724392.1	<i>Envelope protein</i>	<i>E</i>
YP_009724393.1	<i>Membrane glycoprotein</i>	<i>M</i>
YP_009724394.1	<i>ORF6 protein</i>	<i>ORF6</i>
YP_009724395.1	<i>ORF7a protein</i>	<i>ORF7a</i>
YP_009725318.1	<i>ORF7b</i>	<i>ORF7b</i>
YP_009724396.1	<i>ORF8 protein</i>	<i>ORF8</i>
YP_009724397.2	<i>Nucleocapsid phosphoprotein</i>	<i>N</i>
YP_009725255.1	<i>ORF10 protein</i>	<i>ORF10</i>

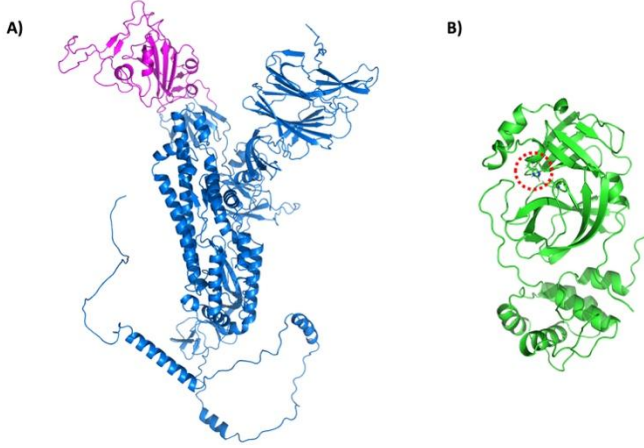
Tablo 2: SARS-CoV2 genomundaki YP_009724389.1 poliproteininde yer alan yapısal olmayan proteinler, gendeki lokasyonları ve bilinen fonksiyonları. Kırmızı font ile yazılmış proteinler için hesaplama yapılmamıştır.

NSP	AA Baş	AA Son	Uzunluk	Fonksiyon
NSP1	1	180	180	Host translation inhibition
NSP2	181	818	638	Scaffold protein
NSP3	819	2763	1945	Papain-like protease
NSP4	2764	3263	500	Membrane rearrangement
NSP5	3264	3569	306	Main protease
NSP6	3570	3859	290	Autophagosome inhibition
NSP7	3860	3942	83	Replicase cofactor
NSP8	3943	4140	198	Primase-like activity
NSP9	4141	4253	113	RNA-binding protein
NSP10	4254	4392	139	Cofactor for NSP14/16
NSP11	4393	4405	13	(Overlaps with NSP12)
NSP12	4393	5324	932	RNA dependent RNA polymerase (RdRp)
NSP13	5325	5925	601	Helicase
NSP14	5926	6452	527	Exonuclease (Proofreading)
NSP15	6453	6798	346	Endonuclease
NSP16	6799	7096	298	2'-O-methyltransferase (Cap formation)

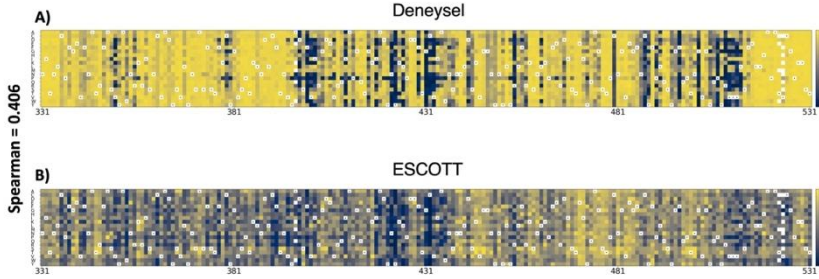
3. Sonuçlar

3.1 SPIKE proteini deneyleri

SPIKE proteini, SARS-CoV-2 virüsü dış çeperinde yer alan ve üç özdeş amino asit zincirinden oluşan bir proteindir (Zhang, Xiao, Cai, & Chen, 2021). Her zincirde 1273 amino asit bulunur. SPIKE proteininin her bir zincirinin S1 ve S2 adında iki ana domaini bulunmaktadır. RBD (Reseptör Bağlanma Domaini), S1 ana domaininin içinde yer alır ve yaklaşık olarak 331-531 amino asitleri arasındaki bölgeyi kapsar (Şekil 1 A). Bu domain, bükülmüş beş parçalı bir antiparalel β tabakası tarafından oluşturulan bir çekirdek yapı ve insan ACE2 reseptörü ile doğrudan temas eden reseptör bağlama motifi (RBM) olarak bilinen bir bölge içermektedir. ACE2'ye bağlanmaya aracılık eden RBD içindeki anahtar amino asitler arasında Tyr449, Tyr453, Asn487, Tyr489, Gly496, Thr500, Gly502 ve Tyr505 yer almaktadır. RBM, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV'a kıyasla gelişmiş bağlanma afinitesine katkıda bulunan Leu455, Phe456, Phe486, Gln493 ve Asn501 gibi ek önemli amino asitleri içermektedir. Özellikle Cys480 ve Cys488 arasındaki disülfid bağları, ACE2 ile etkileşime giren RBM içindeki ikincil yapısı olmayan amino asitleri daha kararlı hale getirir. Genel olarak, RBD'nin amino asitleri, ACE2'nin N-terminal heliksini barındıran, viral bağlanmayı ve girişi kolaylaştıran içbükey bir yüzey oluşturur. Bu bölge aynı zamanda reseptör tanımadaki temel rolü nedeniyle nötralize edici antikorlar ve aşı tasarımı için önemli bir hedef olmuştur (Huang, Yang, Xu, Xu, & Liu, 2020; Shin ve ark., 2021). Literatürde SPIKE proteininin insandaki ACE2 reseptörleri ile etkileşimleri ve mutasyonların bu etkileşimleri nasıl etkilediğine dair iki derin mutasyon taraması çalışması mevcuttur ve her iki deney de SPIKE proteininin RBD domaini için gerçekleştirilmiştir (Starr vd., 2020). Bunlardan ilki SPIKE_SARS2_Starr_2020_binding deneyidir (Şekil 2). Bu deney ile ESCOTT verileri arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0,406'dır.

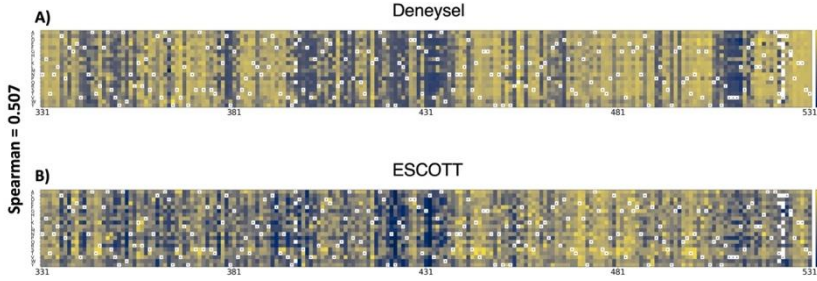


Şekil 1: SPIKE ve main-proteaz proteinlerinin Pymol ile hazırlanmış görselleri (Schrodinger, 2010). A) SPIKE proteininin monomeric yapısının açık mavi renkli cartoon temsili ile gösterimi. RBD domaini magenta renkli cartoon temsili ile gösterilmiştir. B) Main-Proteaz proteininin açık yeşil renkli cartoon temsili ile gösterimi. Aktif site amino asitleri H41 ve C145 kırmızı kesikli çemberin içinde licorice temsili ile gösterilmiştir.



Şekil 2: Deneyisel ve teorik ESCOTT yöntemleri ile elde edilen verilerin SARS-CoV-2 SPIKE proteini için karşılaştırılması. Mutasyon haritalarında renk körleri için de uygun olan cividis renk paleti seçilmiştir. A) Derin mutasyon analizi ile elde edilmiş bağlanma deneyi mutasyon haritası. B) ESCOTT yöntemi ile elde edilmiş mutasyon haritası.

SPIKE proteini için gerçekleştirilen ikinci deney ise SPIKE_SARS2_Starr_2020_expression deneyidir (Şekil 3). Bu deney ile ESCOTT verileri arasındaki Spearman korelasyon katsayısı ise 0,507'dir.

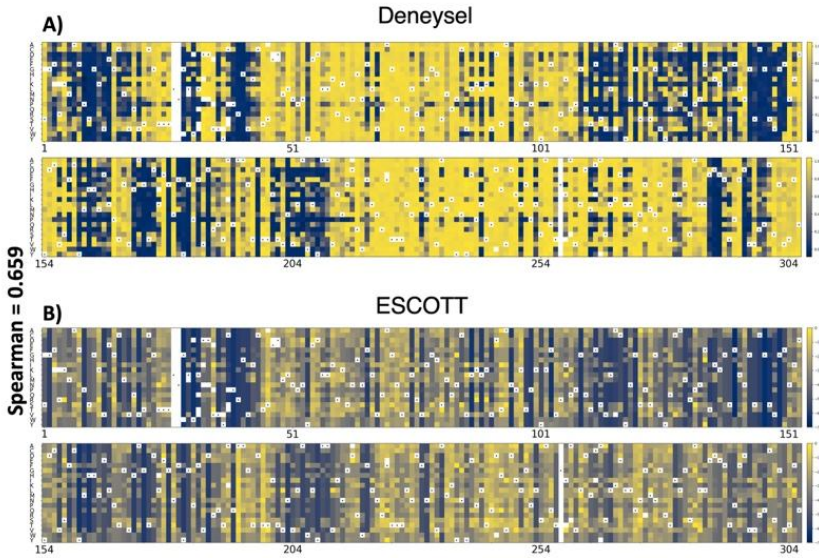


Şekil 3: Deneyisel ve teorik ESCOTT yöntemleri ile elde edilen verilerin SARS-CoV-2 SPIKE proteini için karşılaştırılması. Mutasyon haritalarında renk körleri için de uygun olan cividis renk paleti seçilmiştir. A) Derin mutasyon analizi ile elde edilmiş gen ifadesi (expression) deneyi mutasyon haritası. B) ESCOTT yöntemi ile elde edilmiş mutasyon haritası.

3.2 Main-Proteaz proteini deneyleri

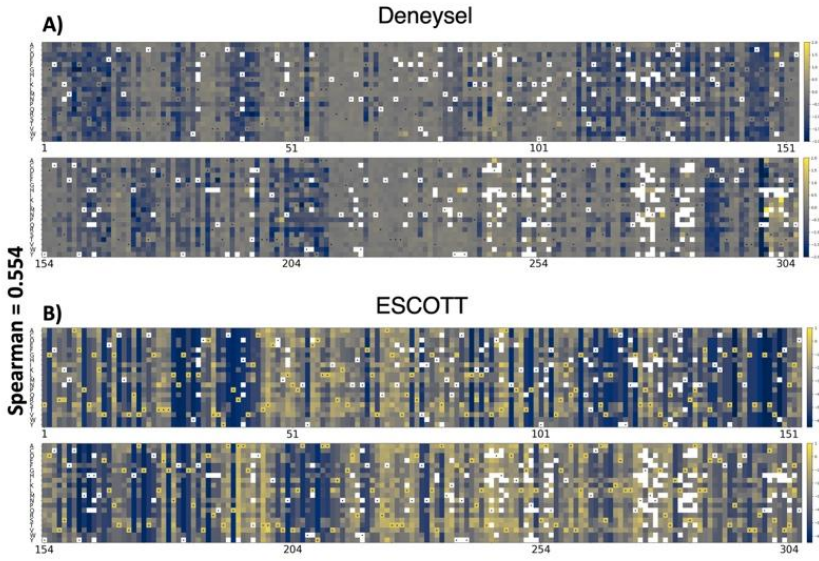
Main-proteaz, SARS-CoV-2 virüsünün poliproteinin kesilmesinde makas görevi gören bir proteindir. Bu protein birbirine özdeş iki amino asit zincirinden oluşmaktadır. Her zincirde bir aktif site bulunur ve bu aktif sitedeki iki amino asit (H41 ve C145) kimyasal bir makas görevi görür (Şekil 1 B). Yapılan çalışmalar zincirdeki iki aktif sitenin aynı anda işlev görmediğini göstermektedir (Tekpınar & Yildirim, 2021). İnsan genomunda SARS-CoV-2 main proteazın en yakın homoloğu A6NP17_HUMAN proteindir ve bunlar arasındaki sekans özdeşliği (sequence identity), EMBOSS Needle algoritması ile sekans hizalaması sonucu, sadece %16,3'tür. İnsanlarda yakın homoloğu olmaması nedeniyle main-proteaz önemli bir ilaç hedefi olarak belirlenmiştir (Narayanan ve ark., 2022) ve main-proteazı hedefleyen oral yoldan alınabilen bazı ilaçlar piyasaya sürülmüştür (Allerton ve ark., 2024; Westberg ve ark., 2024). Mutasyonlar,

geliştirilmiş bazı ilaçları çok kısa sürede etkisiz hale getirebilir (Ragland ve ark., 2014). Bu nedenle, main-proteazdaki mutasyonların etkisinin sistematik olarak incelenmesi ve anlaşılması oldukça önemlidir. Main-proteaz mutasyonları üzerine yapılan iki adet derin mutasyon taraması deneyi mevcuttur. Bu deneylerden Şekil 4'te verilmiş olan R1AB_SARS2_Flynn_2022 deneyidir (Flynn vd., 2022). Bu deney ile ESCOTT verileri arasındaki Spearman korelasyon katsayısı oldukça yüksektir (0,659). Ayrıca hem deneysel hem de ESCOTT sonuçları aktif sitedeki H41 ve C145 amino asitlerinin mutasyonlara karşı oldukça hassas olduğunu göstermektedir.



Şekil 4: Deneysel ve teorik ESCOTT yöntemleri ile elde edilen verilerin SARS-CoV-2 main-proteaz proteini için karşılaştırılması. Mutasyon haritalarında renk körleri için de uygun olan cividis renk paleti seçilmiştir. A) Derin mutasyon analizi ile elde edilmiş deneysel mutasyon haritası. B) ESCOTT yöntemi ile elde edilmiş mutasyon haritası.

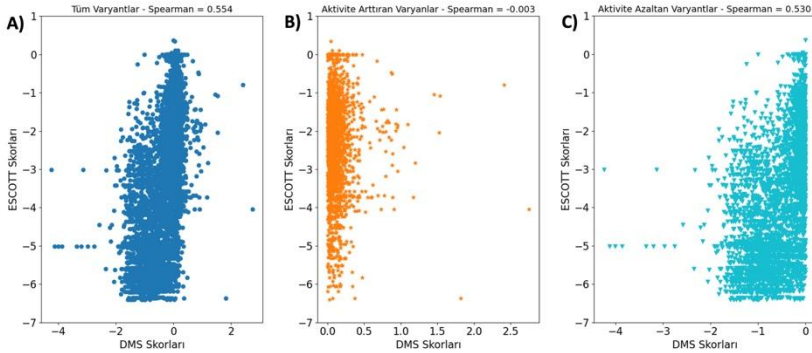
İkinci main-proteaz deneyinde mutasyonların protein aktivitesi üzerine etkisi ölçülmüştür (İketani vd., 2022). Bu nedenle, sadece proteini işlevsiz bırakan mutasyonları değil, onun aktivitesini arttıran mutasyonları da görmek mümkündür (Şekil 5). Deneysel ve teorik veriler arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0,554'tür. Hem deneysel hem de teorik ESCOTT verileri H41 ve C145 gibi kilit amino asitlerin mutasyonlara karşı oldukça hassas olduğunu göstermektedir.



Şekil 5: Deneysel ve teorik ESCOTT yöntemleri ile elde edilen verilerin SARS-CoV-2 main-proteaz proteini için karşılaştırılması. Mutasyon haritalarında renk körleri için de uygun olan cividis renk paleti seçilmiştir. A) Derin mutasyon analizi ile elde edilmiş aktivite deneyi mutasyon haritası. B) ESCOTT yöntemi ile elde edilmiş mutasyon haritası.

Bu deneyin en önemli sonuçlarından birisi aktiviteyi arttıran ve azaltan mutasyonların ayrılabilmesidir. Bu nedenle, ESCOTT yönteminin bu iki farklı tip mutasyonu ayırt edemeyeceği dağılım grafikleri ve Spearman korelasyonu ile incelenmiştir (Şekil 6). Daha önce de belirtildiği üzere, tüm varyantlar göz önüne

alındığında Spearman korelasyonu 0,554'tür (Şekil 6 A). Ancak, sadece aktiviteyi arttıran varyantlar ele alındığında Spearman korelasyonu neredeyse sıfırlanmaktadır (Şekil 6 B). Aktiviteyi azaltan varyantlar gözönüne alındığında ise Spearman korelasyonunun 0,530 olduğu görülmektedir (Şekil 6 C). Elde ettiğimiz sonuçlar ESCOTT yönteminin proteinlerde aktiviteyi azaltan mutasyonları oldukça iyi belirlediğini, ancak aktivite arttıran mutasyonlar için durumun böyle olmadığını göstermektedir.



Şekil 6: SARS-CoV-2 Main-proteaz Iketani et al 2022 deneyinin ESCOTT yöntemi sonuçları ve Spearman korelasyonları. A) Tüm varyantlar (mavi daireler), B) Aktivite arttıran varyantlar (turuncu yıldızlar), C) Aktivite azaltan varyantlar (turkuaz ters üçgenler).

3.3 Tüm SARS-CoV-2 proteinlerinin mutasyonları

Bu noktaya kadarki çalışmalarda ESCOTT sonuçları ile DMT deneyleri arasındaki uyum incelenmiştir. Spearman korelasyonları ve görsel analizler, ESCOTT tahminlerinin deneysel verilerle oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan aldığımız güvenle, hakkında deneysel veri olmayan diğer SARS-CoV-2 proteinleri için de ESCOTT yöntemiyle kapsamlı mutasyon haritaları oluşturulmuştur. Elde edilen tüm veriler Zenodo veri tabanında depolanmış olup <https://doi.org/10.5281/zenodo.15262790> linkinden erişilebilmektedir. İlgili veri seti, her protein için bir yapı dosyası, bir MSA dosyası ve JET skorlarını da içeren çeşitli çıktıları içermektedir. Tüm proteinlerin ESCOTT mutasyon verilerinin

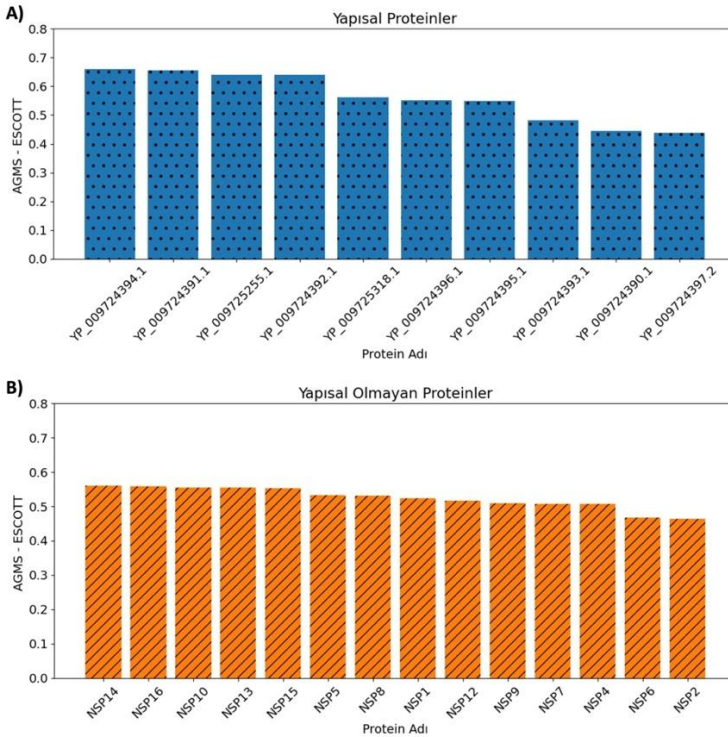
(genellikle 101_normPred_evolCombi.txt adında bir dosya) yanısıra mutasyon haritaları da png formatında ilgili proteine ait klasörde bulunmaktadır. Ayrıca, her protein klasöründeki tüm mutasyon etkilerini içeren 101_normPred_evolCombi.txt dosyası <http://prescott.lcqb.upmc.fr/visualisation.php> web sitesine yüklenerek mutasyon haritaları interaktif olarak da görüntülenebilir.

Maymunçiçeği virüsü üzerine gerçekleştirdiğimiz daha önceki bir çalışmada, virüs genomundaki her bir gen için Ortalama Gen Mutasyon Hassasiyeti (İngilizce kısaltmasıyla AGMS) adında bir parametre hesaplamıştık (Ozaktas vd., 2024). AGMS sıfır ile bir arasında bir değerdir ve yüksek değerler genin mutasyonlara çok hassas olduğunu ifade eder. Eğer insanlarda yakın homologları yoksa, yüksek AGMS değerine sahip proteinlerin iyi bir ilaç hedefi olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada, 10 yapısal ve 14 yapısal olmayan SARS-CoV-2 proteini için AGMS değerleri hesaplanmıştır (Şekil 7).

En yüksek AGMS değerine sahip protein olan ORF6 (YP_009724394.1), çekirdek porlarında Nup98-Rae1 kompleksine bağlanan küçük bir proteindir. Bu proteinin sitoplazma ve çekirdek arasındaki transport işlemlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Addetia ve ark., 2021). Yüksek AGMS değerine sahip bir diğer protein olan ORF3a (YP_009724391.1), viral bir iyon kanalıdır. Bu kanalın potansiyel bir ilaç hedefi olabileceği, Covid19 pandemisinin başlangıcında incelenmiştir (Kern ve ark., 2021). YP_009725255.1 (SARS-CoV-2 ORF10), konak hücredeki ubiquitin ligaz kompleksleri ile potansiyel etkileşimlerde rol oynayan, yapısını ve immünojenitesini etkileyebilecek mutasyonel değişkenlikler gösteren küçük bir proteindir (Hassan ve ark., 2022). YP_009724392.1 ise SARS-CoV-2'nin virüs zarf proteinlerinden biri olan E proteindir ve virüs zarfında homopentamerik bir yapı oluşturur (Mandala ve ark., 2020). Bu protein de yüksek bir AGMS değerine sahiptir (Şekil 7 A).

Yapısal olmayan proteinlerde AGMS değerleri en yüksek çıkan ilk üç protein oldukça ilginçtir. NSP10 proteini hem NSP14'ün hem de NSP16'nın kofaktörüdür. NSP14 çok fonksiyonlu bir

proteindir ve viral enfeksiyondaki rolü önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Li ve ark., 2022; Zaffagni ve ark., 2022). NSP13 proteini RNA çift sarmalını açan bir helikazdır ve Covid19’a karşı önemli bir ilaç hedefi olarak değerlendirilmiştir (Newman ve ark., 2021; Perez-Lemus, Menendez, Alvarado, Bylehn, & de Pablo, 2022). Yapısal olmayan proteinlerden biri olan ve çalışmamızın önceki bölümlerinde değindiğimiz main-proteaz (NSP5) AGMS değeri bakımından altıncı sırada yer almaktadır (Şekil 7 B). Sonuç olarak, tüm bu çalışmalar, yüksek AGMS değerine sahip proteinlerin önemli antiviral ilaç hedefleri olabileceği fikrini desteklemektedir.



Şekil 7: SARS-CoV-2 genleri için hesaplanan Ortalama Gen Mutasyon Hassasiyeti (Average Gene Mutation Sensitivity - AGMS). A) Yapısal Proteinler (siyah noktalı mavi dikey sütunlar), B) Yapısal Olmayan Proteinler (Siyah şeritli turuncu dikey sütunlar).

4. Değerlendirme

Bu alışmada, 24 SARS-CoV-2 proteininin tüm olası nokta mutasyon etkileri, bu konudaki en iyi açık kaynak kodlu program olan ESCOTT algoritması kullanılarak tahmin edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar, Zenodo veri tabanında herkese açık şekilde paylaşılmış ve araştırma topluluklarının erişimine sunulmuştur. ESCOTT tahminlerinin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla, iki protein için mevcut dört derin mutasyon taraması verisiyle karşılaştırma yapılmıştır ve sonuçlar ESCOTT'un yüksek düzeyde doğruluk sağladığını göstermiştir. Özellikle, algoritmanın protein aktivitesini arttıran mutasyonlarda değil aktiviteyi düşüren mutasyonları öngörmede daha isabetli tahminler ürettiği gözlemlenmiştir. Son olarak, çalışmada 24 SARS-CoV2 proteini için AGMS değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin ilgili proteinlerin fonksiyonel özellikleriyle ilişkisi tartışılmıştır.

Kaynakça

Addetia, A., Lieberman Nicole, A. P., Phung, Q., Hsiang, T.-Y., Xie, H., Roychoudhury, P., . . . Greninger Alexander, L. (2021). SARS-CoV-2 ORF6 Disrupts Bidirectional Nucleocytoplasmic Transport through Interactions with Rae1 and Nup98. *mBio*, 12(2), 10.1128/mbio.00065-00021. doi:10.1128/mbio.00065-21

Allerton, C. M. N., Arcari, J. T., Aschenbrenner, L. M., Avery, M., Bechle, B. M., Behzadi, M. A., . . . Zhu, Y. (2024). A Second-Generation Oral SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(16), 13550-13571. doi:10.1021/acs.jmedchem.3c02469

Brandes, N., Goldman, G., Wang, C. H., Ye, C. J., & Ntranos, V. (2023). Genome-wide prediction of disease variant effects with a deep protein language model. *Nat Genet*, 55(9), 1512-1522. doi:10.1038/s41588-023-01465-0

Ceres, N., Pasi, M., & Lavery, R. (2012). A Protein Solvation Model Based on Residue Burial. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(6), 2141-2144. doi:10.1021/ct3001552

Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*, 7(10), e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688

Engelen, S., Trojan, L. A., Sacquin-Mora, S., Lavery, R., & Carbone, A. (2009). Joint evolutionary trees: a large-scale method to predict protein interfaces based on sequence sampling. *PLoS Comput Biol*, 5(1), e1000267. doi:10.1371/journal.pcbi.1000267

Esposito, D., Weile, J., Shendure, J., Starita, L. M., Papenfuss, A. T., Roth, F. P., . . . Rubin, A. F. (2019). MaveDB: an open-source platform to distribute and interpret data from multiplexed assays of variant effect. *Genome Biol*, 20(1), 223. doi:10.1186/s13059-019-1845-6

Flynn, J. M., Samant, N., Schneider-Nachum, G., Barkan, D. T., Yilmaz, N. K., Schiffer, C. A., . . . Bolon, D. N. A. (2022). Comprehensive fitness landscape of SARS-CoV-2 Mpro reveals insights into viral resistance mechanisms. *Elife*, *11*, e77433. doi:10.7554/eLife.77433

Fowler, D. M., & Fields, S. (2014). Deep mutational scanning: a new style of protein science. *Nat Methods*, *11*(8), 801-807. doi:10.1038/nmeth.3027

Grimm, D. G., Azencott, C. A., Aicheler, F., Gieraths, U., MacArthur, D. G., Samocha, K. E., . . . Borgwardt, K. M. (2015). The evaluation of tools used to predict the impact of missense variants is hindered by two types of circularity. *Human Mutation*, *36*(5), 513-523. doi:10.1002/humu.22768

Hassan, S. S., Lundstrom, K., Serrano-Aroca, A., Adadi, P., Aljabali, A. A. A., Redwan, E. M., . . . Uversky, V. N. (2022). Emergence of unique SARS-CoV-2 ORF10 variants and their impact on protein structure and function. *International Journal of Biological Macromolecules*, *194*, 128-143. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.151

Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(9), 1141-1149. doi:10.1038/s41401-020-0485-4

Iketani, S., Hong, S. J., Sheng, J., Bahari, F., Culbertson, B., Atanaki, F. F., . . . Chavez, A. (2022). Functional map of SARS-CoV-2 3CL protease reveals tolerant and immutable sites. *Cell Host Microbe*, *30*(10), 1354-1362 e1356. doi:10.1016/j.chom.2022.08.003

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. doi:10.1038/s41586-021-03819-2

Kern, D. M., Sorum, B., Mali, S. S., Hoel, C. M., Sridharan, S., Remis, J. P., . . . Brohawn, S. G. (2021). Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(7), 573-582. doi:10.1038/s41594-021-00619-0

Laine, E., Karami, Y., & Carbone, A. (2019). GEMME: a simple and fast global epistatic model predicting mutational effects. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msz179

Li, T. W., Kenney, A. D., Park, J. G., Fiches, G. N., Liu, H., Zhou, D., . . . Zhu, J. (2022). SARS-CoV-2 Nsp14 protein associates with IMPDH2 and activates NF-kappaB signaling. *Front Immunol*, 13, 1007089. doi:10.3389/fimmu.2022.1007089

Mandala, V. S., McKay, M. J., Shcherbakov, A. A., Dregni, A. J., Kolocouris, A., & Hong, M. (2020). Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), 1202-1208. doi:10.1038/s41594-020-00536-8

Mezei, M. (2003). A new method for mapping macromolecular topography. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 21(5), 463-472. doi:Pii S1093-3263(02)00203-6

Doi 10.1016/S1093-3263(02)00203-6

Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679-682. doi:10.1038/s41592-022-01488-1

Narayanan, A., Narwal, M., Majowicz, S. A., Varricchio, C., Toner, S. A., Ballatore, C., . . . Jose, J. (2022). Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. *Commun Biol*, 5(1), 169. doi:10.1038/s42003-022-03090-9

Newman, J. A., Douangamath, A., Yadzani, S., Yosaatmadja, Y., Aimon, A., Brandao-Neto, J., . . . Gileadi, O. (2021). Structure, mechanism and crystallographic fragment

screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase. *Nature Communications*, 12(1), 4848. doi:10.1038/s41467-021-25166-6

Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3812-3814. doi:10.1093/nar/gkg509

Notin, P., Kollasch, A. W., Ritter, D., van Niekerk, L., Paul, S., Spinner, H., . . . Marks, D. S. (2023). ProteinGym: Large-Scale Benchmarks for Protein Design and Fitness Prediction. *bioRxiv*, 2023.2012.2007.570727. doi:10.1101/2023.12.07.570727

Ozaktas, T., Dizkirici, A., Carbone, A., & Tekpinar, M. (2024). Comprehensive Mutational Landscape Analysis of Monkeypox Virus Proteome. *bioRxiv*, 2024.2009.2019.613877. doi:10.1101/2024.09.19.613877

Perez-Lemus, G. R., Menendez, C. A., Alvarado, W., Bylehn, F., & de Pablo, J. J. (2022). Toward wide-spectrum antivirals against coronaviruses: Molecular characterization of SARS-CoV-2 NSP13 helicase inhibitors. *Sci Adv*, 8(1), eabj4526. doi:10.1126/sciadv.abj4526

Ragland, D. A., Nalivaika, E. A., Nalam, M. N. L., Prachanronarong, K. L., Cao, H., Bandaranayake, R. M., . . . Schiffer, C. A. (2014). Drug Resistance Conferred by Mutations Outside the Active Site through Alterations in the Dynamic and Structural Ensemble of HIV-1 Protease. *Journal of the American Chemical Society*, 136(34), 11956-11963. doi:10.1021/ja504096m

Schrodinger, LLC. (2010). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*.

Shin, H. J., Ku, K. B., Kim, H. S., Moon, H. W., Jeong, G. U., Hwang, I., . . . Kim, C. (2021). Receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein efficiently inhibits SARS-CoV-2 infection and attachment to mouse lung. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 3786-3794. doi:10.7150/ijbs.61320

Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K., Ellis, D., Crawford, K. H. D., Dingens, A. S., . . . Bloom, J. D. (2020). Deep Mutational

Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*, 182(5), 1295-1310 e1220. doi:10.1016/j.cell.2020.08.012

Tekpinar, M., David, L., Henry, T., & Carbone, A. (2025). PRESCOTT: a population aware, epistatic, and structural model accurately predicts missense effects. *Genome Biology*, 26(1), 113. doi:10.1186/s13059-025-03581-y

Tekpinar, M., & Yildirim, A. (2021). Impact of dimerization and N3 binding on molecular dynamics of SARS-CoV and SARS-CoV-2 main proteases. *J Biomol Struct Dyn*, 1-12. doi:10.1080/07391102.2021.1880481

Wei, H., & Li, X. (2023). Deep mutational scanning: A versatile tool in systematically mapping genotypes to phenotypes. *Front Genet*, 14, 1087267. doi:10.3389/fgene.2023.1087267

Westberg, M., Su, Y. C., Zou, X. Z., Huang, P. H., Rustagi, A., Garhyan, J., . . . Lin, M. Z. (2024). An orally bioavailable SARS-CoV-2 main protease inhibitor exhibits improved affinity and reduced sensitivity to mutations. *Science translational medicine*, 16(738). doi:ARTN eadi0979 10.1126/scitranslmed.adi0979

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., . . . Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3

Zaffagni, M., Harris, J. M., Patop, I. L., Pamudurti, N. R., Nguyen, S., & Kadener, S. (2022). SARS-CoV-2 Nsp14 mediates the effects of viral infection on the host cell transcriptome. *Elife*, 11. doi:10.7554/eLife.71945

Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol*, 50, 173-182. doi:10.1016/j.coviro.2021.08.010

BİYOFLM İLİŖKİLİ ENFEKSİYONLARDA BİYOFLM OLUŖUMU, DİRENCİ VE KONTROLÜ

TUĞBA ÖZAKTAŞ¹

1. Giriş

Biyofilm, mikroorganizmaların koloni oluşturmak için bir yüzeyde biraraya gelerek oluşturdukları, hareketsiz üç boyutlu bir matrisdir (Sharma & ark., 2019). Organizmalar salgıladıkları yapışkan protein ve hücre dışı matris sayesinde hücrelerin yüzeyde sabitlenmesini sağlarlar. Böylece koloni besin azlığı, dehidrasyon, pH değişimleri, viral saldırılar veya avcılar gibi birçok çevresel faktörden korunmuş olur (Costerton & ark., 1995; Jacqueline & Caillon, 2014). Eğer biyofilm oluşturan mikroorganizma bir patojen ise bu faktörlerin arasına konakçının bağışıklık sisteminden ve antimikrobiyal bileşiklerin etkisinden kaçınma da dahil olur.

Biyofilm oluşumu hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojen türler için, birincil virulans mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (Damyanova & ark., 2024). Antibiyotiklerin etki değeri, serbest hücrelere oranla biyofilm oluşturanlar için 100 ila 800 kat artabilir (Jacqueline & Caillon, 2014). Ayrıca, biyofilm içindeki tek bir bakteri hücresi bile yüksek konsantrasyondaki antibiyotiklere

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0001-8091-0909, tugbaozaktas@yvu.edu.tr

dayanabilirse tekrar ama daha dirençli bir biyofilm oluşturabilir, bu duruma inatçılık (recalcitrant) adı verilir (Ciofu & ark., 2022).

Biyofilmler bakteriyel enfeksiyonların %65'inden sorumludur (Jamal & ark., 2018). Sadece Amerika'da yılda 500.000'den fazla kişinin biyofilm etkisi nedeni ile öldüğü bildirilmiştir (Charani & Holmes, 2019). Biyofilmler genellikle antibiyotiklere karşı direnç sergileyerek iyileşme sürecinin gecikmesine neden olurlar (Metcalf & Bowler, 2013). Biyofilm ilişkili enfeksiyonlara örnek olarak kistik fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kulak iltihabı, enfeksiyöz yaralar, diyabet, sinüzit, kemik iltihabı (osteomyelit), endokardit, kronik prostat iltihabı (prostatit) verilebilir (Vyas & ark., 2021; Assefa & Amare, 2022; Garg & ark., 2023; Ribeiro & ark., 2023; Maitz & ark., 2023). Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar ayrıca birçok medikal cihazda da meydana gelebilir; hatta tedaviye dirençli enfeksiyonlar nedeni ile bazı implantların çıkarılması gerekebilir. Örneğin, kalp pilleri, kalp kapakçıkları, protez eklemler, venöz ve idrar kateterleri, endotrakeal tüpler, meme implantları, kontakt lensler, rahim içi cihazlar, safra stentleri, ortodontik protezler sıklıkla biyofilm ilişkili enfeksiyonların geliştiği cihazlardandır (Stickler, 2008; Tande & Patel, 2014; Wu & ark., 2015; Gominet & ark., 2017; Diaconu & ark., 2018; Ciofu & ark., 2022; Ali & ark., 2023).

Biyofilmlerin insan hayatı üzerinde bu kadar etkili olması nedeni ile kontrol edilebilmeleri için yeni yöntemlerin geliştirilmesi elzem hale gelmiştir. Son yıllarda, biyofilm oluşumunu engelleyecek yeni bileşiklerin keşfine yönelik artan bir ilgi vardır. Bu bölümde biyofilmlerin oluşması, direnç mekanizmaları ve biyofilm kontrolü moleküler yaklaşım ile ele alınacaktır.

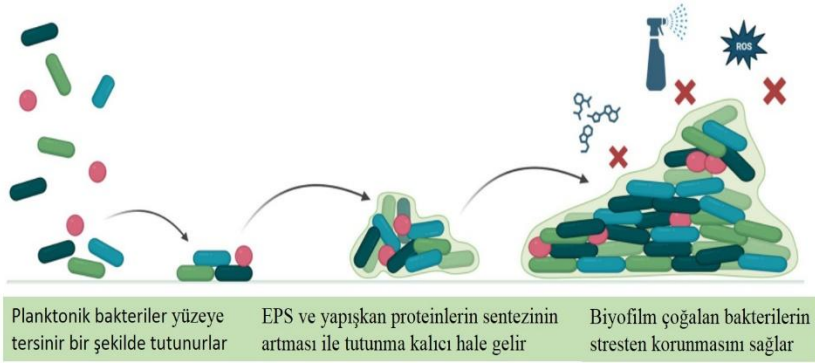
2. Bakteriyel Biyofilmlerin Oluşumu

Bakteriler iki büyüme biçimi sergilerler: tek başına, serbest yaşayan planktonik yaşam biçimi ya da biyofilm içinde sabit, yüzeye tutunmuş organize yaşam biçimi (Geesey & ark., 1977; Costerton & ark., 1999; Flemming & ark., 2016). Biyofilm oluşturma kabiliyeti bakterilerin doğadaki baskın yaşam biçimi olarak kabul görmekle

birlikte, maya gibi tek hücreli ökaryotlar da dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların ortak özelliğidir (Geesey & ark., 1977; Costerton & ark., 1999). Biyofilm oluşumu, başlıca strese yanıt olarak, bir dizi çevresel ve genetik tetiklenmeler sonucu başlar. Sıcaklık, pH, besin erişimi ve çevresel tehlikeler gibi dış faktörler planktonik hücrelerin sabit forma geçişinde rol oynarlar (Rather & ark., 2021). Alarmonlar olan guanozin tetrafosfat ve guanozin pentafosfatlar [(p)ppGpp] ile sinyalizasyon edilen ve hücredeki tüm genlerin üçte birinin transkripsiyonunu düzenleyen katı bir cevabın aktive edilmesi ile de biyofilm oluşumu tetiklenir (Nguyen & ark., 2011).

İlk aşama tersinirdir. Planktonik hücreler fimbriya, pilus ve kamçı gibi tutunma yapılarını kullanarak uygun bir yüzeye kendilerini sabitlerler. Bu aşamada mikroorganizmalar ya tutundukları yüzeyi bırakarak tekrar planktonik yaşama dönerler ya da tutunmalarını kalıcı hale getirirler (Toyofuku & ark., 2016). Kalıcı tutunma süresince mikroorganizmalar farklı yapışma moleküllerinin ve glikoproteinlerin sentezini artırır. Aynı zamanda hücreler de bölünerek mikrokoloni oluşturur. Biyofilmin gelişmesi ile içindeki mikroorganizmalar da bir komünite haline gelir (Şekil 1) (Prakash & ark., 2003).

Biyofilmi oluşturan kolonideki bakteriler birden fazla türden oluşabilir. Biyofilm oluşumu çoğunluğu algılama (quorum sensing-QS) ile düzenlenir. Bakteri hücreleri arasındaki bir iletişim şekli olan QS, kimyasal sinyaller aracılığı ile birçok hücrenin faaliyetini düzenlenmesini sağlar. Böylece hücre bölünmesi ve hücre dışı polimerik maddenin (extracellular polymeric substance-EPS) üretimi artar (Asma & ark., 2022; Cavallo & ark., 2024).



Şekil 1: Biyofilm oluşumunun mekanizması Grooters & ark., (2024)'dan Türkçe'ye çevrilmiştir.

EPS biyofilmlerin kuru ağırlığının %90'ından fazlasını oluşturur (Toyofuku & ark., 2016). Tipik olarak EPS matrisi proteinler, polisakkaritler, hücre dışı DNA (extracellular DNA-eDNA) ve lipitlerden oluşur ve çevresel zorluklara karşı dayanıklılık sağlar (Grooters & ark., 2024). Bu koruyucu etki sadece yapısal destekle kalmaz, ayrıca çevredeki besinlerin ve hidrojen bağı etkileşimleri ile suyun tutulmasını da sağlar (Flemming & ark., 2016). Hücre dışı enzimlerin bulunması, çözünmüş ve parçacık halindeki besinlerin sulu fazda saklanmasına ve böylece besin ve enerji kaynakları olarak kullanılabilen esnek bir dış sindirim sisteminin oluşumuna neden olur (Mishra & ark., 2023). EPS içindeki ekzopolisakkaritler yapışma ve tutunma etkileşimleri için alan sağlarken, proteinler karbon ve enerji kaynağı olarak görev yapar. EPS ayrıca, direnç genlerinin ve EPS'nin ana bileşenlerinin iletimini sağlar, bu da biyofilm yapısının genel olarak kurulmasına katkıda bulunur (Limoli, Jones, & Wozniak, 2015).

Biyofilmlerindeki eDNA'nın kaynağı muhtemelen genomik DNA'nın kendisidir. Şaşırtıcı bir şekilde, eDNA farklı desenlerde düzenlenmiştir, örneğin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinde olduğu gibi ızgara benzeri yapılar oluşturabilir, bu da eDNA'nın yapısal bir rol olduğunu göstermektedir (Allesen-Holm & ark., 2006). eDNA ile genomik DNA arasında belirgin benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. Çok sayıda araştırmacı, e-DNA'nın

biyofilm matrisi içindeki işlevinin stabilize etmek olduğu fikrini desteklemiştir (Yang & ark., 2007). Ayrıca QS sistemleri ve demir etkisinin *P. aeruginosa*'da eDNA'nın salınımını düzenlediği bildirilmiştir (Allesen-Holm & ark., 2006; Yang & ark., 2007). *Staphylococcus aureus* biyofilmlerinde önemli bir yapısal bileşeni olan genomik DNA'nın salınımı, yine *S. aureus* biyofilmlerinin gelişiminde kritik bir faktör olan cidA kontrollü hücre yıkımının bir sonucu olarak meydana gelir (Rice & ark., 2007).

3. Biyofilm Direnci

Biyofilmler antibiyotiğin ve bağışıklık sisteminin bakteri hücrelerine erişimine engel olan mekanik bir bariyer gibi davranarak antimikrobiyal tedavinin etkinliğini azaltır. Bu nedenle biyofilmler genellikle topikal ve sistemik antibiyotiklere karşı dirençlidir (Cavallo & ark., 2024). Bununla birlikte biyofilmlerde yaşayan bakterilerin, planktonik durumlarına göre ilaç dirençleri artar (Mah, 2012). Örneğin, planktonik olarak incelendiğinde tüm *Staphylococcus epidermidis* biyofilm izolatlarının vankomisine duyarlı olduğu ancak aynı suşun biyofilmden izole edilmiş formunun yaklaşık %75'inin aynı antibiyotiklere dirençli bulunduğu rapor edilmiştir (Pinheiro & ark., 2014). Benzer bulgular *Klebsiella pneumoniae* için de bildirilmiştir (Dan & ark., 2023).

Biyofilm komünitelerindeki antimikrobiyal ajanlara karşı olan dayanıklılığın farklı mekanizmaların birleşik sonucu olduğu düşünülmektedir (Rumbaugh & Sauer, 2020). Biyofilmlerin antibiyotik toleransı ve direncine katkısının altında yatan mekanizmaları anlamak, bu enfeksiyonlarla mücadele için yenilikçi stratejiler geliştirmek açısından çok önemlidir (Grooters & ark., 2024).

Antimikrobiyal ajanların biyofilmden hapsolmaları ve hücrelere erişimlerinin kısıtlanmasının, antimikrobiyal direncin gelişmesiyle ilişkili olduğuna dair pek çok çalışma mevcuttur (Anderl, Franklin, & Stewart, 2000; Picioreanu, van Loosdrecht, & Heijnen, 2001; Campanac & ark., 2002; Drenkard, 2003; Thormann & ark., 2006; Reichhardt & Parsek, 2019). Biyofilm tedavisinin

etkinliği, antimikrobiyal ajanın biyofilme nüfuz etme kabiliyetine bağlıdır. Bu da biyofilm yapısı ve kalınlığı, bakteri cinsi/suşu, uygulanan antimikrobiyalın konsantrasyonu ve süresi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Singh & ark., 2016; Hall & Mah, 2017; Grooters & ark., 2024; Behzadnia, Moosavi-Nasab & Oliyaei, 2024). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, *P. aeruginosa* biyofilmlerine antimikrobiyal ajanların nüfuz etme süresinin 40 ila 21 dakika arasında gecikebildiği ve *S. epidermidis*'in biyofilm içinde tobramisine karşı duyarlılığında azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Duguid & ark., 1992; Suci & ark., 1994).

Biyofilmlerde gözlemlenen heterojen bakteri popölasyonu metabolik olarak farklı mikrokolonilerin oluşmasına ve aynı biyofilm içinde çeşitli fizyolojik durumlara yol açar (Kirketerp-Møller, Stewart, & Bjarnsholt, 2020). Örneğin; biyofilmlerin en derin katmanları, biyofilmlerin üst katmanlarına kıyasla besin eksikliğine maruz kalır, bu durum da açlığa bağlı yavaş büyüme ile metabolik hızın düşmesini, ribozom hibernasyon faktörlerinin ifade edilmesini ve antimikrobiyallere direnç gösteren uyku halindeki (dormant) inatçı hücrelerin ortaya çıkmasını teşvik eder (Anwar & ark.,1992; Sternberg & ark.,1999; Anderl & ark., 2003; Fux & ark., 2004; Nguyen & ark., 2011; Williamson & ark., 2012; Liu & ark., 2015; Olsen, 2015; Miyaue & ark., 2018). Çeşitli fizyolojik özelliğe sahip bölgelerin varlığı, aynı ortamda bir arada bulunan çok sayıda genotip ve fenotip ile sonuçlanır. Bu olgu, ilaç direncine katkıda bulunan benzersiz metabolik yolların ortaya çıkmasını açıklar (Grooters & ark., 2024).

Biyofilm içindeki mikrobiyal hücre popölasyonu 10^4 - 10^8 hücre/cm² arasındadır (Behzadnia, Moosavi-Nasab & Oliyaei, 2024). Ancak bu popölasyon farklı türleri içerebilir. Bu tarz bakteriyel komplekslik içeren biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlar, tedavi sürecini daha da karmaşık hale getirebilirler (Cavallo & ark., 2024). Çalışmalar, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* arasındaki sinerjik etkileşimler sayesinde bakterilerin kolonizasyonu, virölansı veya kalıcılıklarının artabildiğini göstermiştir. Özellikle, *P. aeruginosa* tarafından üretilen birçok

madde *S. aureus* için koruyucu bir rol oynayabilir (Fazli & ark., 2009).

Biyofilm toplulukları, dışa atım (efflux) pompaları ve farklı dışarı gönderme sistemleri sayesinde antimikrobiyaller dahil olmak üzere çeşitli ksenobiyotiklere karşı çoklu ilaç direnci sergileyebilir (Liao, Schurr, & Sauer, 2013; Chua & ark., 2014; Chambers, Cherny, & Sauer, 2017; Nishino & ark., 2021). Ancak biyofilm içindeki hücrelerde bu sistemleri kodlayan genlerin ifadesinin aynı olmadığı belirlenmiştir. Örneğin, biyofilmlerin üst katmanlarında belirli antibiyotik direnç pompalarının artışına yönelik bir genetik düzenleme olurken, orta katmanlarda aynı genlerin ifadesi azalabilir ya da değişimenebilir (Babin & ark., 2017).

Bakterilerin biyofilm içinde iletişimlerini ve hayatta kalma başarısını artırmak için sinyal moleküllerini kullandıkları bir mekanizma olan QS'nin, antibiyotiklere karşı biyofilm direncinin düzenlenmesini doğrudan etkilediği gösterilmiştir. Bu düzenlenmeye çeşitli dışa atım pompalarının gen ifadesinin kontrolü ve biyofilm oluşumunun kontrolü dahildir (Wang & ark., 2019). Serbest yaşayan bakteri hücreleri belirli bir yoğunluğa ulaşırlarsa, küçük sinyallem moleküllerinin üretimi ile hücreden hücreye bağlantılar oluşturularak, QS mekanizmaları aracılığıyla çok hücreli organizmalar olarak hayatta kalabilirler (Kalia, 2013). Sinyalleme molekülleri alıcı mikrobiyal hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak bu moleküllerin üretiminden sorumlu olanlar da dahil olmak üzere birkaç genin aktive olmasına neden olur ve QS bu şekilde çalışır (Rutherford & Bassler, 2012). Gram negatif bakteriler sinyal molekülü olarak N-açıl-homoserin laktonları kullanırken, Gram pozitif bakteriler daha büyük oligopeptitleri kullanırlar. Her iki molekül de biyofilm oluşumuna katkıda bulunarak antimikrobiyal madde geçişini kısıtlar (An & ark., 2019; Gimza & ark., 2019).

Çok sayıda patojenik mikroorganizmada bulunan ökaryot benzeri Ser/Thr kinaz genleri, sinyal moleküllerinin biyosentezini düzenlemede ve biyofilm yaşam modunu düzenlemede rol alırlar (Cluzel & ark., 2010). Ser/Thr kinaz enzim sistemi aracılığıyla *Bacillus subtilis* ve *S. aureus*, biyofilm oluşumunu kontrol eder.

Biyofilmlerin gelişimi patojenik *Mycobacterium* ve *Streptococcus*'ta GroEL şaperonunun fosforilasyonu ile iken *Bacillus anthracis*'te PrkC tarafından kontrol edilir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, *Vibrio harveyi*'de bulunan AI-2 otoindüktör tabanlı bir QS yoluna sahiptir ve türler arası iletişime dalmışlardır (Kalia, 2013). QS, bakterilerin yanısıra ökaryotik mikroorganizmalar olan *Candida* ve *Histoplasma*'da ve ayrıca virüslerde de bulunmuştur (Whiteley, Diggle & Greenberg, 2017).

Biyofilm içindeki dirençli hücreler, direnç genlerini yatay gen transferi aracılığı ile birbirlerine aktarırlar. Bu süreç, biyofilmleri oluşturan hücrelerin evrimine yardımcı olur (Keren & ark., 2004; Shah & ark., 2006; Zhu & ark., 2020). Biyofilm hücreleri arasındaki bu yatay iletim, önemli ölçüde QS kontrolündedir (Donlan, 2001). *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin biyofilm kültürlerinde mutasyon sıklıklarının arttığı belirlenmiştir; bu da biyofilm matrisinin antimikrobiyallere karşı mutasyonel direnci teşvik etmek için uygun bir ortam olduğunu göstermektedir (Ryder, Chopra & O'Neill, 2012). Başka bir çalışmada *P. aeruginosa* biyofilmlerinde imipenem ve piperasilin sonrasında beta-laktamaz ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Kronik enfeksiyonlarda biyofilm kalıcılığının birincil nedeni, gelişmiş beta-laktamaz ekspresyonu ve biyofilm büyüme modunun diğer koruyucu özelliklerinin birleşimidir (Mah, 2012).

Her biri belirli bir ajana karşı direnç kodlayan genin plazmidler veya transpozonlar üzerinde birikmesi çoklu ilaç direncinin bakterilerde ortaya çıkmasının nedenlerinden biridir. Diğer ana neden ise birden fazla ilacı salgılayabilen çoklu ilaç dışı atım pompalarıdır. Çoklu ilaca direnç olgusu, birçok patojenik suşun antiseptik ve dezenfeksiyon kimyasalları da dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyallere ve kemoterapötik ilaçlara direnç geliştirmesine yol açmıştır. Çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkması hastanelerde tedavi edilemeyen salgınlara yol açmaktadır. Bu nedenle biyofilmlerle mücadele etmek için bu sistemleri hedef alan yenilikçi yaklaşımlar gereklidir (Mishra & ark., 2023).

4. Biyofilm Kontrolü

Biyofilm ilişkili kronik enfeksiyonlarda çok sayıda patojen rol oynar; bunlar arasında kronikleşen yaralarda *P. aeruginosa* ve *S. aureus*, kronik orta kulak iltihabına sebep olan *S. pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*, kistik fibrozis zatürresine neden olan *P. aeruginosa* ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarında enteropatojenik *Escherichia coli* bulunur (Costerton Montanaro, & Arciola, 2005; Burmölle & ark., 2010; Kalan & ark., 2019). Klinik biyomalzemeler ve protez eklemler ile ilişkili enfeksiyonlarda *Mycobacterium tuberculosis* ve *S. epidermidis* öne çıkar (Berbari & ark., 1998; Ha, Chung, & Ryoo, 2005).

Biyofilm kontrolü, çözülmesi zor bir problemdir. Enfeksiyonların sıklığı ve şiddeti artabilir ve biyofilmlerle uygun şekilde mücadele edilmezse enfeksiyonla ilişkili hastalık ve ölüm oranları artabilir (Algburi & ark., 2017). Biyofilm ilişkili enfeksiyonların kontrolünde temel yaklaşım; oluşumun önlenmesi ve tedavidir. Önleyici stratejiler, biyofilm oluşum sürecini kesintiye uğratmaya odaklanırken; tedavi stratejilerinin hedefi halihazırda oluşmuş ve gelişmiş biyofilmlerdir (Damyanova & ark., 2024). Önleyici stratejilerin amacı biyofilm oluşumunu en başından engellemektir. Bunun için yapılacakların arasında bakteri hücrelerinin bir yere tutunmasını önlemek, biyofilm matrisinin sentezlenme aşamalarını bloke etmek, QS sinyal kaskadını inhibe ederek bakteri hücrelerinin birbirleri ile olan iletişimini bozmak gelmektedir (Damyanova & ark., 2024). Tedavide ise biyofilmi ortadan kaldırmak için yaygın olarak geleneksel antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin sık kullanılması sonucunda, virülans etkisi daha yüksek, antibiyotik dirençli bakterilerin sayısı hızla artmaktadır. Artan antibiyotik direnci bilim dünyasını antibiyofilm etkisi olan yeni maddelerin arayışına ve yeni teknolojilerin kullanılmasına yönlendirmiştir.

4.1 Nanomalzemeler

ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişimine göre en az bir boyutu 1-100 nm ($1\text{ nm}=10^{-9}\text{ m}$) aralığında olan yapılar nanoparçacık olarak

tanımlanır. Nanomalzemelerin küçük boyutları, benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikleri ile birleştğinde hücrelere kolayca girmelerini ve hücre içi bileşenlerle etkileşime geçmelerini sağlar. Bu yenilikçi yapılar başta kanser ve bulaşıcı olmayan hastalıklarla mücadele gibi farklı biyomedikal uygulamalarda dikkat çekmiştir (Mishra & ark., 2023; Damyanova & ark., 2024). Ancak nanomalzemelerin çoğunlukla direnç oluşumuna sebebiyet vermeyecek şekilde tasarlanmaları araştırmacıları bunları antibakteriyel ajan olarak da kullanmaya yönlendirmiştir.

Nanomalzemeler bakteri membranı ile temas ettiğinde farklı mekanizmalar aracılığı ile hücrenin ölümüne neden olabilirler: Bunlar ya membrandaki fosfolipidler arasına yerleşerek ya da DNA, ribozom ve enzimler gibi hücre içi moleküllerle etkileşime geçerek oksidatif strese, elektrolit dengesizliğine ve enzim inhibisyonuna yol açarlar (Gupta & ark., 2019). Tablo 1’de bakteriyel biyofilmlerin tedavisi ve önlenmesi için kullanılan nanomalzemelerin ve tıbbi cihazların yapımında kullanılan nanomalzemelerin özeti, mekanizmaları ve çeşitli bakteri suşları üzerindeki etkileriyle birlikte verilmiştir (Damyanova & ark., 2024).

Çoğu nanomalzemenin diğer bir avantajı da ilaç taşıyıcıları olarak başarılı bir şekilde kullanılabilmeleridir (Gupta & ark., 2019). Antibakteriyel maddelerin kapsüllenebilmesi, doğru hedefe ulaşabilmelerini sağlar. Ayrıca ilaç iletimini gerçekleştiren nanosistemler, taşıdıkları maddelerin kontrollü veya uzun süreli bir şekilde salınmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımla, çok düşük konsantrasyonlarda bile antibakteriyel maddelerin etki etmesi sağlanabilir (Damyanova & ark., 2024). Eritromisin, klindamisin, amoksisilin ve vankomisinin antibiyotikleri gümüş nanoparçaçıklar ile birleştirildiğinde *E. coli* ve *S. aureus*’a karşı gelişmiş etki göstermişlerdir (Mishra & ark., 2023). Ayrıca bPEI kaplı poliakrilik kopolimer nanojeller, katyonik antibiyotikler olan tetrasiklin ve linkomisinini belirli yerlere iletmek için kullanılmıştır (Weldrick & ark., 2019).

Tablo 1: Bakteriyel biyofilmlere karşı geliştirilen nanomalzemeler ve etki mekanizmaları

Nanomalzeme	Mekanizma ve Etki	Bakteri	Kaynak
Klaritromisin yüklü lipit polimer *NPlar	EPS'nin yıkımı; Biyofilm bakterileri üzerinde antibakteriyel etki; bakteri tutunmasının ve biyofilm oluşmasının engellenmesi	<i>Helicobacter pylori</i>	Li & ark., 2019
Berberin yüklü kitosan NPlar (BBR-CSNPS)	Biyofilm oluşumunun konsantrasyona bağlı olarak engellenmesi; hücre duvarı ve membran bütünlüğünün bozulması	<i>Candida albicans</i>	Lin & ark., 2023
Biguanid türevi polimerik NPlar (PMET)	Biyofilmin dağılması; hücre yüzey bozunumu	<i>Metisiline dirençli S. aureus</i> (MRSA)	Li & ark., 2020
Tarçın yağı yüklü nanolipozomlar	Biyofilm oluşumunun engellenmesi; hücre yüzey emilimi, nüfuz etme ve hücre tahribatı	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Ellboudy & ark., 2023
Çinko oksit (zno) ve çinko sülfür (zns) NPları	Planktonik bakteri hücrelerinin ölmesi; biyofilm oluşumunun engellenmesi	<i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Bianchini & ark., 2023
Kitosan kaplı demir oksit NPlar	Elektrostatik etkileşimler yoluyla bakteri membranına bağlanarak bakteri hücrelerinin rahatsız edilmesi	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Saravanakumar & ark., 2022

Tablo 1'in devamı;

Hausmannite NPları	Biyofilm oluşumunun engellenmesi	<i>P. aeruginosa</i>	Brindhad evi & ark., 2024
Bitkisel uçucu yağlarla yüklenen kitosan NPları	EPS sentezinin durdurulması; düzensiz hücre şekli; hücre virülansının kaybı	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Govindan & ark., 2022
Niozom yüklü selenyum NPları	Biyofilm oluşumunun engellenmesi	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Haddad n & ark., 2022
Tıbbi cihazlar için nanomalzemeler			
Jellian zamk içeren titanyum dioksit NPları	Biyofilm oluşumunun engellenmesi	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Ismail & ark., 2019
Akrilik reçine içeren Ag NPları	Biyofilm oluşumunun engellenmesi	<i>C. albicans</i>	Takamiya & ark., 2021
Kurkumin-grafen oksit (GO/Cu) yüzey kaplaması	Hücre tutunmasının engellenmesi; reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin indüklenmesi	<i>Candida parapsilosis</i>	Cacaci & ark., 2023
Grafen oksit (GO)/polidimetils iloksan (PDMS) kompozitleri	Membran geçirgenliğinin, metabolik aktivitenin ve endojen ROS sentezinin artması	<i>S. aureus</i>	Belo & ark., 2023

*NP: Nanoparçacık

Kaynak: Damyanova & ark., 2024

4.2 Doğal bileşikler

Doğal ürünler her zaman ilaç gelişimi için değerli bir kaynak olmuştur. Günümüzde kullanımda olan farmasötiklerin %80'inden fazlası ya doğrudan doğal kaynaklardan elde edilmiştir ya da doğal bileşiklerden esinlenenerek geliştirilmiştir (Ravichandran & ark., 2018; Machado & ark., 2020). Bitkiler, deniz canlıları ve mikroorganizmalar biyofilm oluşumunu engelleyen veya doğrudan biyofilme zarar veren, ya da QS mekanizmasını baskılayan çeşitli metabolitleri içeren doğal kaynaklardır (Behzadnia, Moosavi-Nasab & Oliyaei, 2024; Damyanova & ark., 2024). Bitkilerin tedavi edici etkileri temel olarak sekonder metabolitlere dayanır. Sekonder metabolitlerin türü ve miktarı bitkiden bitkiye değişmekle birlikte biyolojik aktiviteleri de geniş kapsamlıdır (Doğan & ark., 2019; Melander, Basak & Melander, 2020). Fitokimyasal olarak adlandırılan bu metabolitler nispeten toksik olmamaları, biyoyumlulukları ve kolay erişilebilir olmaları nedeniyle antibiyofilm ve antimikrobiyal ajanlar olarak tercih edilirler (Ghosh & ark., 2022). Fitokimyasalların *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı hem planktonik hem de biyofilm formlarında etkili olabildiği gösterilmiştir (Hrynshyn, Simões & Borges, 2022). Birçok fitokimyasal, sinyal moleküllerinin antagonistleri olarak reseptörlerle rekabetçi inhibisyona girer ve QS kaskadını inhibe eder. QS sinyal mekanizmasına müdahale etmek, adhezinlerin salgılanmasını ve EPS'lerin sentezini inhibe ederek, biyofilm oluşumunun baskılanmasına neden olabilir (Uddin Mahamud & ark., 2024). Dahası, fitokimyasallar; mikrobiyal istilası, konak dokunun hasarı ve konak bağışıklığından kaçınma için önemli olan bakteriyel virülans faktörlerini de azaltma kabiliyetindedirler (Ali & Neelakantan, 2022). Yapılan çalışmalar sonunda altı ana fitokimyasal grup önemli antibiyofilm özellikleriyle öne çıkmıştır: fenoller, alkaloidler, terpenoidler, poliasetilenler, lektinler ve polipeptitler (Uddin Mahamud & ark., 2024).

Deniz algleri de antibiyofilm aktivitesine sahip geniş çaplı yeni bileşiklerin kaynağı olarak umut vaatetmektedir. Alg özütleri ve metabolitleri hücre tutunmasını engelleyebilir, hücre büyümesini azaltabilir, QS metabolizmasına müdahale edebilir ya da EPS'yi

bozabilir. Bu metabolitlere örnek olarak sülfatlanmış polisakkaritler (fukoidan), karotenoidler (zeaksantin ve lutein), lipid ve yağ asitleri (γ -linolenik asit ve linoleik asit) ve florotaninler verilebilir (Behzadnia, Moosavi-Nasab & Oliyaei, 2024).

4.3 Parçalayıcı enzimler ve QS inhibitörleri

Bir diğer etkili antibiyofilim stratejisi, biyofilim matrisini parçalayan enzimlerin kullanılmasıdır. Biyofilimlerin yapısal bir bileşeni parçalandığında, daha fazla antibiyotik nüfuz ederek etkinliklerini artıracaktır. Örneğin; Dispersin B ekzopolisakkaritleri, DNazI eDNA'yı, alfa-amilaz ise biyofilim matrisini parçalar (Tetz & ark., 2009; Sun & ark., 2013).

QS inhibitörleri ökaryotlar ve/veya prokaryotlar tarafından üretilen ve QS sistemlerini engelleyebilen bileşiklerdir (Hemmati & ark., 2020) ve biyofilim enfeksiyonunu önlemek ve biyofilim yayılmasını engellemek için kullanılırlar (Taylor, Yeung, & Hancock, 2014). Doğal kimyasallar, sentetik maddeler ve antibiyotiklerin QS inhibitör potansiyeli vardır. Örneğin, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlardan aspirin, meloksikam ve piroksikam, *P. aeruginosa*'nın QS sinyal moleküllerini inhibe etmek ve biyofilim büyümesini azaltmak için kullanılabilir (Almeida & ark., 2018). Antibiyotiklerden azitromisin, eritromisin, siprofloksasin, seftazidim, gentamisin, tikarsilin, spektinomisin ve streptomisin yüksek QS inhibitör aktivitesine sahiptirler (Sofer & ark., 1999). Aminoglikozit antibiyotikler ve resveratrol kombinasyonunun biyolojik sıvıların oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Zhou & ark., 2018). Kurkuminin; siprofloksasin, gentamisin, seftazidim ve azitromisin ile birlikte *P. aeruginosa* üzerindeki sinerjik etkinliği de rapor edilmiştir (Sofer & ark., 1999). Bunların dışında gentamisin ve çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ile kitosan ve kitosan-ZnO nanokompozitinin birlikte *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın biyofilim oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bir diğer çalışma ile gösterilmiştir (Hemmati & ark., 2020).

Ayrıca, dışa atım pompası inhibitörlerinin de biyofilimlerin antibiyotik toleransını bloke ettiği ve biyofilim oluşumunu tamamen

ortadan kaldırdığı görülmüştür (Kvist, Hancock, & Klemm, 2008; Zimmermann & ark., 2019).

4.4 Gen düzenleme

Genetik değişiklik/düzenleme tekniklerinin uygulanması, patojenik bakterilerin virölansını azaltmanın yeni bir yoludur. CRISPR gibi gen düzenleme teknolojilerinden yararlanılarak, biyofilm patojenlerinin genetik yapısını değiştirmek mümkün olabilir ve bu da zamanla virölansını azaltabilir (Gholizadeh & ark., 2017; Yao & ark., 2018). Doğru genlere odaklanılarak CRISPR-Cas, bakterilerin genetik yapısını değiştirmek ve antibiyotik direncini tersine çevirmek için kullanılmıştır (Jiang & ark., 2013; Goren, Yosef, & Qimron, 2017). Çalışmalar, antibiyotik direncine neden olan bakteri genlerinin CRISPR-Cas sistemi kullanılarak nötralize edilebileceğini göstermiştir (Hale & ark., 2012; Vercoe & ark., 2013). Antibiyofilm amaçlı gen düzenleme yaklaşımları üzerine son araştırmalar arasında *E. coli*, *S. mutans* biyofilmlerinin büyümesini önlemek ve *S. aureus* biyofilmlerini canlı organizmada yok etmek için yapılanlar yer almaktadır (Zuberi, Misba, & Khan, 2017; Gong & ark., 2018; Garrido & ark., 2021).

5. Sonuç

Biyofilmler, başta bakteriler olmak üzere mantarlar, virüsler, protozoalar ve diğer mikroorganizmaların oluşturduğu karmaşık yapılar olarak enfeksiyon hastalıklarının seyrini önemli ölçüde etkilemektedir. Mikroorganizmaların birarada kalmasını sağlayan EPS matrisi, besin ve su geçişini kolaylaştırmakta, çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlayarak mikroorganizmalara yüksek düzeyde direnç kazandırmaktadır. Bu direnç, sadece antibiyotiklere karşı değil, aynı zamanda dezenfektanlara ve konak savunma mekanizmalarına karşı da etkilidir. Ayrıca QS yoluyla metabolik süreçler ve virölans faktörlerinin genetik ifadelerinin düzenlenmesi sağlanmaktadır (Flemming & ark., 2016; Karatan & Watnick, 2009; Rumbaugh & ark., 2009).

Antibiyotiklerin keşfinden önce, biyofilm enfeksiyonları insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktaydı. Fleming'in 1928'de penisilini keşfetmesi bu alanda bir dönüm noktası olmuş ve o tarihten itibaren geliştirilen antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonları tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır (Crofts, Gasparrini, & Dantas, 2017). Ancak antibiyotiklerin sağlık dışı alanlar da dahil olmak üzere yaygın ve hatalı kullanımı, doğal direnç mekanizmalarının mutasyonlar ve genetik elementlerin yatay transferi yoluyla yayılmasına yol açmış, bu da bakteriyel direnç ve hatta çoklu ilaç direncini yaratmıştır. Günümüzde neredeyse tüm mevcut antibiyotiklere karşı dirençli bakteri türleri ve suşları bulunmaktadır (Alanis, 2005; Cox & Wright, 2013; Blair & ark., 2015; Mishra & ark., 2023).

Biyofilmler, enfeksiyon süreçlerinde sadece koruyucu bir kalkan görevi görmekle kalmayıp, aynı zamanda yeni direnç mekanizmalarının gelişmesini de tetiklemektedir. Bu durum, biyofilm ilişkili enfeksiyonların yüksek ölüm oranları ile sonuçlanmasına ve halk sağlığı ile ekonomik sistemler üzerinde uzun vadeli olumsuz etkiler yaratmasına yol açmaktadır (Jamal & ark., 2018). Tüm bu nedenler araştırmacıları güçlü antibakteriyel ajanlar oluşturmak için kullanılan çeşitli antimikrobiyal tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir (Mishra & ark., 2023). Özellikle, biyofilmlerin oluşumunu engelleyen veya önceden var olan biyofilmleri yok edebilen yaklaşımlar umut vadetmektedir. Sonuç olarak, gelecekteki antibiyofilm stratejileri oldukça iyi görünse de bu yeni yaklaşımların gerçek potansiyelinin anlaşılabilmesi için laboratuvar düzeyindeki bulguların ötesine geçilerek, kapsamlı in vivo çalışmalar ile etkinlik, güvenlik ve uygulanabilirliklerinin doğrulanması gerekmektedir.

Kaynakça

Alanis, A.J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36, 697-705. doi:[10.1016/j.arcmed.2005.06.009](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009).

Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017). Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Applied & Environmental Microbiology*, 83, e02508-16. doi:[10.1128/AEM.02508-16](https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16).

Ali, A., Zahra, A., Kamthan, M., Husain, F. M., Albalawi, T., Zubair, M., Alatawy, R., Abid, M., & Noorani, M. S. (2023). Microbial Biofilms: Applications, Clinical Consequences, and Alternative Therapies. *Microorganisms*, 11 (8), 1934. doi:[10.3390/microorganisms11081934](https://doi.org/10.3390/microorganisms11081934).

Ali, I. A., & Neelakantan, P. (2022). Antibiofilm activity of phytochemicals against *Enterococcus faecalis*: A literature review. *Phytotherapy Research*, 36 (7), 2824-2838. doi:[10.1002/ptr.7488](https://doi.org/10.1002/ptr.7488).

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59, 1114-1128. doi:[10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x).

Almeida, F. A., Vargas, E. L. G., Carneiro, D. G., Pinto, U. M., & Vanetti, M. C. D. (2018). Virtual screening of plant compounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs for inhibition of quorum sensing and biofilm formation in *Salmonella*. *Microbial Pathogenesis*, 121, 369-388. doi:[10.1016/j.micpath.2018.05.014](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.014).

An, S. Q., Murtagh, J., Twomey, K. B., Gupta, M. K., O'Sullivan, T. P., Ingram, R., ... & Tang, J. L. (2019). Modulation of antibiotic sensitivity and biofilm formation in *Pseudomonas*

aeruginosa by interspecies signal analogues. *Nature Communications*, 10 (1), 2334. doi:10.1038/s41467-019-10271-4.

Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (7), 1818-1824. doi:[10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000](https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000).

Anderl, J. N., Zahller, J., Roe, F., & Stewart, P. S. (2003). Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (4), 1251-1256. doi:[10.1128/aac.47.4.1251-1256.2003](https://doi.org/10.1128/aac.47.4.1251-1256.2003).

Anwar, H., Strap, J. L., Chen, K. & Costerton, J. W. (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36, 1208-1214. doi:[10.1128/aac.36.6.1208](https://doi.org/10.1128/aac.36.6.1208).

Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Acaroz, U., Mukhtar, H., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., & Gerlach, R. (2022). An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents. *Life*, 12 (8), 1110. doi:[10.3390/life12081110](https://doi.org/10.3390/life12081110).

Assefa, M., & Amare, A. (2022). Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infection & Drug Resistance*, 15, 5061-5068. doi:[10.2147/IDR.S379502](https://doi.org/10.2147/IDR.S379502).

Babin, B. M., Atangcho, L., van Eldijk, M. B., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., ... & Tirrell, D. A. (2017). Selective proteomic analysis of antibiotic-tolerant cellular subpopulations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *MBio*, 8 (5), 10-1128. doi: [10.1128/mBio.01593-17](https://doi.org/10.1128/mBio.01593-17).

Behzadnia, A., Moosavi-Nasab, M., & Oliyai, N. (2024). Antibiofilm activity of marine algae-derived bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*. 15, 1270174. doi: [10.3389/fmicb.2024.1270174](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1270174).

Belo, S., Sousa-Cardoso, F., Teixeira-Santos, R., Gomes, L. C., Vieira, R., Sjollem, J., Soares, O. S. G. P., & Mergulhão, F. J. (2023). Production and characterization of graphene oxide surfaces against uropathogens. *Coatings*, 13 (8), 1324. doi:[10.3390/coatings13081324](https://doi.org/10.3390/coatings13081324).

Berbari, E. F., Hanssen, A. D., Duffy, M. C., Steckelberg, J. M., & Osmon, D. R. (1998). Prosthetic joint infection due to *Mycobacterium tuberculosis*: a case series and review of the literature. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, NJ)*, 27 (3), 219-227. PMID: 9544364.

Bianchini Fulindi, R., Domingues Rodrigues, J., Lemos Barbosa, T. W., Goncalves Garcia, A. D., De Almeida La Porta, F., Pratavieira, S., ... & Martinez, L. R. (2023). Zinc-based nanoparticles reduce bacterial biofilm formation. *Microbiology Spectrum*, 11 (2), e04831-22. doi:[10.1128/spectrum.04831-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.04831-22).

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (1), 42-51. doi:[10.1038/nrmicro3380](https://doi.org/10.1038/nrmicro3380).

Brindhadevi, K., Kim, P. T., AlSalhi, M. S., Abd Elkader, O. H., Lee, J., & Bharathi, D. (2024). Deciphering the photocatalytic degradation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using hausmannite (Mn₃O₄) nanoparticles and their efficacy against bacterial biofilm. *Chemosphere*, 349, 140961. doi:[10.1016/j.chemosphere.2023.140961](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140961).

Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., ... & Bjarnsholt, T. (2010). Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59 (3), 324-336. doi:[10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x).

Cacaci, M., Squitieri, D., Palmieri, V., Torelli, R., Perini, G., Campolo, M., Di Vito, M., Papi, M., Posteraro, B., Sanguinetti, M.,

& Bugli, F. (2023). Curcumin-functionalized graphene oxide strongly prevents *Candida parapsilosis* adhesion and biofilm formation. *Pharmaceuticals*, 16 (2), 275. doi:[10.3390/ph16020275](https://doi.org/10.3390/ph16020275).

Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G. & Roques, C. (2002). Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1469-1474. doi: [10.1128/aac.46.5.1469-1474.2002](https://doi.org/10.1128/aac.46.5.1469-1474.2002).

Cavallo, I., Sivori, F., Mastrofrancesco, A., Abril, E., Pontone, M., Di Domenico, E. G., Pimpinelli, F. (2024). Bacterial Biofilm in Chronic Wounds and Possible Therapeutic Approaches. *Biology*, 13 (2), 109. doi:[10.3390/biology13020109](https://doi.org/10.3390/biology13020109).

Chambers, J. R., Cherny, K. E. & Sauer, K. (2017). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61 (12), e00846-17. doi:[10.1128/aac.00846-17](https://doi.org/10.1128/aac.00846-17).

Charani, E., & Holmes, A. (2019). Antibiotic stewardship- Twenty years in the making. *Antibiotics*, 8 (1), 7. doi: [10.3390/antibiotics8010007](https://doi.org/10.3390/antibiotics8010007).

Chua, S., Liu, Y., Yam, J., ... & Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature Communications*, 5, 4462. doi:[10.1038/ncomms5462](https://doi.org/10.1038/ncomms5462).

Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20 (10), 621-635. doi:[10.1038/s41579-022-00682-4](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4).

Cluzel M, Zanella-Cléon I, Cozzzone AJ, Fütterer K, Duclos B, Molle V. (2010). The *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 synthase LuxS is regulated by Ser/Thr phosphorylation. *Journal of Bacteriology*, 192, 6295-6301. doi:[10.1128/jb.00853-10](https://doi.org/10.1128/jb.00853-10).

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual*

Review of Microbiology, 49, 711-745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

Costerton, J. W., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2005). Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *The International Journal of Artificial Organs*, 28 (11), 1062-1068. doi:10.1177/039139880502801103.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322. doi: [10.1126/science.284.5418.1318](https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318).

Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303 (6-7), 287-292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009.

Crofts, T., Gasparrini, A. & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 422-434. doi:[10.1038/nrmicro.2017.28](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28).

Damyanova, T., Dimitrova, P. D., Borisova, D., Topouzova-Hristova, T., Haladjova, E., & Paunova-Krasteva, T. (2024). An overview of biofilm-associated infections and the role of phytochemicals and nanomaterials in their control and prevention. *Pharmaceutics*, 16, 162. doi:10.3390/pharmaceutics16020162.

Dan, B., Dai, H., Zhou, D., Tong, H., & Zhu, M. (2023). Relationship between drug resistance characteristics and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Infection and Drug Resistance*, 16, 985-998. doi:10.2147/IDR.S396609.

Diaconu, O., Sîrîopol, I., Poloşanu, L. I., & Grigoras, I. (2018). Endotracheal tube biofilm and its impact on the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *The Journal of Critical Care Medicine*, 4, 50-55. doi: 10.2478/jccm-2018-0011.

Doğan, Ş., Gökalsın, B., Şenkardeş, İ., Doğan, A., & Sesal, N. C. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas*

aeruginosa. *Journal of Ethnopharmacology*, 235, 293-300. doi:[10.1016/j.jep.2019.02.020](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.020).

Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (2), 277-281. doi:[10.3201/eid0702.700277](https://doi.org/10.3201/eid0702.700277).

Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5, 1213-1219. doi:[10.1016/j.micinf.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009).

Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R., & Gilbert, P. (1992). Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30, 803-810. doi:[10.1093/jac/30.6.803](https://doi.org/10.1093/jac/30.6.803).

Ellboudy, N. M., Elwakil, B. H., Shaaban, M. M., & Olama, Z. A. (2023). Cinnamon oil-loaded nanoliposomes with potent antibacterial and antibiofilm activities. *Molecules*, 28 (11), 4492. doi:[10.3390/molecules28114492](https://doi.org/10.3390/molecules28114492).

Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A. S., Krogfelt, K. A., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2009). Nonrandom Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 4084-4089. doi:[10.1128/jcm.01395-09](https://doi.org/10.1128/jcm.01395-09).

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 563. doi:[10.1038/nrmicro.2016.94](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94).

Fux, C. A., Wilson, S., & Stoodley, P. (2004). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *Journal of Bacteriology*, 186, 4486-4491. doi:[10.1128/jb.186.14.4486-4491.2004](https://doi.org/10.1128/jb.186.14.4486-4491.2004).

Garg, S.S., Dubey, R., Sharma, S., Vyas, A., & Gupta, J. (2023). Biological Macromolecules-Based Nanoformulation in Improving Wound Healing and Bacterial Biofilm-Associated

Infection: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 247, 125636. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125636.

Garrido, V., Piñero-Lambea, C., Rodriguez-Arce, I., Paetzold, B., Ferrar, T., Weber, M., ... & Lluch-Senar, M. (2021). Engineering a genome-reduced bacterium to eliminate *Staphylococcus aureus* biofilms in vivo. *Molecular Systems Biology*, 17 (10), e10145. doi:[10.15252/msb.202010145](https://doi.org/10.15252/msb.202010145).

Geesey, G. G., Richardson, W. T., Yeomans, H. G., Irvin, R. T. & Costerton, J. W. (1977). Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 1733-1736. doi:[10.1139/m77-249](https://doi.org/10.1139/m77-249).

Gholizadeh, P., Aghazadeh, M., Asgharzadeh, M. & Kafil, H. S. (2017). Suppressing the CRISPR/Cas adaptive immune system in bacterial infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, 2043-2051. doi:[10.1007/s10096-017-3036-2](https://doi.org/10.1007/s10096-017-3036-2).

Ghosh, S., Lahiri, D., Nag, M., Dey, A., Pandit, S., Sarkar, T., Pati, S., Abdul Kari, Z., Ishak, A. R., Edinur, H. A., & Ray, R. R. (2022). Phytocompound mediated blockage of quorum sensing cascade in ESKAPE pathogens. *Antibiotics*, 11 (1), 61. doi:[10.3390/antibiotics11010061](https://doi.org/10.3390/antibiotics11010061).

Gimza, B. D., Larias, M. I., Budny, B. G., & Shaw, L. N. (2019). Mapping the global network of extracellular protease regulation in *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 4 (5). doi:10.1128/mSphere.00676-19.

Gominet, M., Compain, F., Beloin, C., & Lebeaux, D. (2017). Central venous catheters and biofilms: where do we stand in. *APMIS*, 125 (4), 365-375. doi: 10.1111/apm.12665.

Gong, T., Tang, B., Zhou, X., Zeng, J., Lu, M., Guo, X., ... & Li, Y. (2018). Genome editing in *Streptococcus mutans* through self-targeting CRISPR arrays. *Molecular Oral Microbiology*, 33 (6), 440-449. doi: [10.1111/omi.12247](https://doi.org/10.1111/omi.12247).

Goren, M., Yosef, I., & Qimron, U. (2017). Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. *Drug Resistance Updates*, 30, 1-6. doi:10.1016/j.drug.2016.11.001.

Govindan, R., Chackaravarthi, G., Ramachandran, G., Chelliah, C. K., Muthuchamy, M., Quero, F., ... & Li, W. J. (2022). Effective removal of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* using chitosan nanoparticles loaded plant essential oils. *Journal of King Saud University-Science*, 34 (3), 101845. doi:10.1016/j.jksus.2022.101845.

Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1352273. doi:10.3389/fcimb.2024.1352273.

Gupta, P., Singh, H. S., Shukla, V. K., Nath, G., & Bhartiya, S. K. (2019). Bacteriophage therapy of chronic nonhealing wound: clinical study. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 18 (2), 171-175. doi:10.1177/1534734619835115.

Ha, K. Y., Chung, Y. G., & Ryoo, S. J. (2005). Adherence and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* and *Mycobacterium tuberculosis* on various spinal implants. *Spine*, 30, 38-43. doi: 10.1097/01.brs.0000147801.63304.8a.

Haddadian, A., Robattorki, F. F., Dibah, H., Soheili, A., Ghanbarzadeh, E., Sartipnia, N., ... & Mirzaie, A. (2022). Niosomes-loaded selenium nanoparticles as a new approach for enhanced antibacterial, anti-biofilm, and anticancer activities. *Scientific reports*, 12 (1), 21938. doi:10.1038/s41598-022-26400-x.

Hale, C. R., Majumdar, S., Elmore, J., Pfister, N., Compton, M., Olson, S., ... & Terns, M. P. (2012). Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Molecular Cell*, 45 (3), 292-302. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.023.

Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (3), 276-301. doi:10.1093/femsre/fux010.

Hemmati, F., Salehi, R., Ghotaslou, R., Samadi Kafil, H., Hasani, A., Gholizadeh, P., ... & Ahangarzadeh Rezaee, M. (2020). Quorum quenching: A potential target for antipseudomonal therapy. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2989-3005. doi:10.2147/IDR.S263196.

Hrynishyn, A., Simões, M., & Borges, A. (2022). Biofilms in surgical site infections: Recent advances and novel prevention and eradication strategies. *Antibiotics*, 11 (1), 69. doi:10.3390/antibiotics11010069.

Ismail, N. A., Amin, K. A. M., Majid, F. A. A., & Razali, M. H. (2019). Gellan gum incorporating titanium dioxide nanoparticles biofilm as wound dressing: Physicochemical, mechanical, antibacterial properties and wound healing studies. *Materials Science and Engineering:C*, 103, 109770. doi:10.1016/j.msec.2019.109770.

Jacqueline, C., & Caillon, J. (2014). Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, i37-i40. doi: 10.1093/jac/dku254.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7-11. doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31, 233-239. doi:10.1038/nbt.2508.

Kalan, L. R., Meisel, J. S., Loesche, M. A., Horwinski, J., Soaita, I., Chen, X., Uberoi, A., Gardner, S. E., & Grice, E. A. (2019). Strain- and species-level variation in the microbiome of

diabetic wounds is associated with clinical outcomes and therapeutic efficacy. *Cell Host & Microbe*, 25, 641-655.e5. doi:[10.1016/j.chom.2019.03.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.006).

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31 (2), 224-245. doi:[10.1016/j.biotechadv.2012.10.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004).

Karatan E., & Watnick P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 310-347. doi:[10.1128/mmbr.00041-08](https://doi.org/10.1128/mmbr.00041-08).

Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., & Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (1), 13-18. doi:[10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5).

Kirketerp-Møller, K., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2020). The zone model: A conceptual model for understanding the microenvironment of chronic wound infection. *Wound Repair and Regeneration*, 28 (5), 593-599. doi: [10.1111/wrr.12841](https://doi.org/10.1111/wrr.12841).

Kvist, M., Hancock, V., & Klemm, P. (2008). Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (23), 7376-7382. doi:[10.1128/AEM.01310-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08).

Li, J., Zhong, W., Zhang, K., Wang, D., Hu, J., & Chan-Park, M. B. (2020). Biguanide-derived polymeric nanoparticles kill MRSA biofilm and suppress infection in vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12 (19), 21231-21241. doi:[10.1021/acsami.9b17747](https://doi.org/10.1021/acsami.9b17747).

Li, P., Chen, X., Shen, Y., Li, H., Zou, Y., Yuan, G., ... & Hu, H. (2019). Mucus penetration enhanced lipid polymer nanoparticles improve the eradication rate of *Helicobacter pylori* biofilm. *Journal of Controlled Release*, 300, 52-63. doi:[10.1016/j.jconrel.2019.02.039](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.039).

Liao, J., Schurr, M. J. & Sauer, K. (2013). The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug-efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195, 3352-3363. doi:[10.1128/jb.00318-13](https://doi.org/10.1128/jb.00318-13).

Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3, 3. doi:[10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014).

Lin, Q., Li, Y., Sheng, M., Xu, J., Xu, X., Lee, J., & Tan, Y. (2023). Antibiofilm effects of berberine-loaded chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. *LWT*, 173, 114237. doi:[10.1016/j.lwt.2022.114237](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114237).

Liu, J., Prindle, A., Humphries, J., Gabalda-Sagarra, M., Asally, M., Lee, D. Y. D., ... & Süel, G. M. (2015). Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature*, 523 (7562), 550-554. doi: [10.1038/nature14660](https://doi.org/10.1038/nature14660).

Machado, I., Silva, L. R., Giaouris, E. D., Melo, L. F., & Simões, M. (2020). Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Food Research International*, 127, 108754. doi:[10.1016/j.foodres.2019.108754](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108754).

Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7 (9), 1061-1072. doi:[10.2217/fmb.12.76](https://doi.org/10.2217/fmb.12.76).

Maitz, J., Merlino, J., Rizzo, S., McKew, G., & Maitz, P. (2023). Burn Wound Infections Microbiome and Novel Approaches Using Therapeutic Microorganisms in Burn Wound Infection Control. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 196, 114769. doi:[10.1016/j.addr.2023.114769](https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114769).

Melander, R. J., Basak, A. K., & Melander, C. (2020). Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural Product Reports*, 37 (11), 1454-1477. doi:[10.1039/D0NP00022A](https://doi.org/10.1039/D0NP00022A).

Metcalf, D., & Bowler, P. (2013). Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns & Trauma*, 1, 5. doi: 10.4103/2321-3868.113329.

Mishra, S., Gupta, A., Upadhye, V., Singh, S. C., Sinha, R. P., Häder, D. P. (2023). Therapeutic Strategies against Biofilm Infections. *Life*, 13 (1), 172. doi: [10.3390/life13010172](https://doi.org/10.3390/life13010172).

Miyaue, S., Suzuki, E., Komiyama, Y., Kondo, Y., Morikawa, M., & Maeda, S. (2018). Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony–biofilm culture. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01396.

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., ... & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334 (6058), 982-986. doi:[10.1126/science.1211037](https://doi.org/10.1126/science.1211037).

Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.737288.

Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 877-886. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C. M. & Heijnen, J. J. (2001). Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 205-218. doi:10.1002/1097-0290(20000120)72:2<205::AID-BIT9>3.0.CO;2-L.

Pinheiro, L., Brito, C. I., Pereira, V. C., Oliveira, A., Camargo, C. H., & Cunha M. L. (2014). Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Memorias*

do Instituto. Oswaldo Cruz, 109, 871-878. doi:10.1590/0074-0276140120.

Prakash, B., Veeregowda, B. M., & Krishnappa, G. (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Current Science*, 85 (9), 1299-1307. doi:www.jstor.org/stable/24108133.

Rather, M.A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1701-1718. doi:10.1007/s42770-021-00624-x.

Ravichandran, V., Zhong, L., Wang, H., Yu, G., Zhang, Y., & Li, A. (2018). Virtual screening and biomolecular interactions of CviR-based quorum sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 292. doi:10.3389/fcimb.2018.00292.

Reichhardt, C. & Parsek, M. R. (2019). Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in Microbiology*, 10, 677. doi:10.3389/fmicb.2019.00677.

Ribeiro, C. M. P., Higgs, M. G., Muhlebach, M. S., Wolfgang, M. C., Borgatti, M., Lampronti, I., & Cabrini, G. (2023). Revisiting Host-Pathogen Interactions in Cystic Fibrosis Lungs in the Era of CFTR Modulators. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 5010. doi:10.3390/ijms24055010.

Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., & Bayles, K. W. (2007). The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, 104, 8113-8118. doi:10.1073/pnas.0610226104.

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (10), 571-586. doi:10.1038/s41579-020-0385-0.

Rumbaugh, K.P.; Diggle, S.P.; Watters, C.M.; Ross-Gillespie, A.; Grin, A.S.; & West, S.A. (2009). Quorum sensing and

the social evolution of bacterial virulence. *Current Biology*, 19, 341-345. doi:[10.1016/j.cub.2009.01.050](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.050).

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (11), a012427. doi:[10.1101/cshperspect.a012427](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427).

Ryder, V. J., Chopra, I., O'Neill, A. J. (2012). Increased mutability of Staphylococci in biofilms as a consequence of oxidative stress. *Plos One*, 7 (10), e47695. doi:[10.1371/journal.pone.0047695](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047695).

Saravanakumar, K., Sathiyaseelan, A., Manivasagan, P., Jeong, M. S., Choi, M., Jang, E. S., ... & Wang, M. H. (2022). Photothermally responsive chitosan-coated iron oxide nanoparticles for enhanced eradication of bacterial biofilms. *Biomaterials Advances*, 141, 213129. doi:[10.1016/j.bioadv.2022.213129](https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213129).

Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A. B., Kaldalu, N., Kurg, K., & Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology*, 6 (53), 1-9. doi:[10.1186/1471-2180-6-53](https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-53).

Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8 (76), 1-10. doi:[10.1186/s13756-019-0533-3](https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3).

Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A., & Ray, P. (2016). Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *FEMS Pathogens and Disease*, 74 (6), ftw056. doi: [10.1093/femspd/ftw056](https://doi.org/10.1093/femspd/ftw056).

Sofer, D., Gilboa-Garber, N., Belz, A., & Garber, N. C. (1999). 'Subinhibitory' erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. *Chemotherapy*, 45 (5), 335-341. doi: [10.1159/000007224](https://doi.org/10.1159/000007224).

Sternberg, C., Christensen, B. B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J. B., Givskov, M., & Molin, S. (1999). Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9), 4108-4117. doi:[10.1128/AEM.65.9.4108-4117.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4108-4117.1999).

Stickler, D. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Reviews Urology*, 5, 598-608. doi:[10.1038/ncpuro1231](https://doi.org/10.1038/ncpuro1231).

Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., & Geesey, G. G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 2125-2133. doi:[10.1128/aac.38.9.2125](https://doi.org/10.1128/aac.38.9.2125).

Sun, F., Qu, F., Ling, Y., Mao, P., Xia, P., Chen, H., & Zhou, D. (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 8 (7), 877-886. doi:[10.2217/fmb.13.58](https://doi.org/10.2217/fmb.13.58).

Takamiya, A. S., Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Silva, E. A., de Camargo, E. R., Gomes-Filho, J. E., ... & Barbosa, D. B. (2021). Biocompatible silver nanoparticles incorporated in acrylic resin for dental application inhibit *Candida albicans* biofilm. *Materials Science and Engineering:C*, 118, 111341. doi:[10.1016/j.msec.2020.111341](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111341).

Tande, A. J., & Patel, R. (2014). Prosthetic joint infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 302-345. doi:[10.1128/CMR.00111-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00111-13).

Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, 191, 121-130. doi:[10.1016/j.jbiotec.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003).

Tetz, G.V., Artemenko, N.K., & Tetz, V.V. (2009). Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 1204-1209. doi:[10.1128/aac.00471-08](https://doi.org/10.1128/aac.00471-08).

Thormann, K. M., Duttler, S., Saville, R. M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., & Spormann, A. M. (2006). Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 188, 2681-2691. doi:10.1128/jb.188.7.2681-2691.2006.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, 80, 7-12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701.

Uddin Mahamud, A. G. M. S., Nahar, S., Ashrafudoulla, Md., Park, S. H., & Ha, S. D. (2024). Insights into antibiofilm mechanisms of phytochemicals: Prospects in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64 (6), 1736-1763. doi:10.1080/10408398.2022.2119201.

Vercoe, R. B., Chang, J. T., Dy, R. L., Taylor, C., Gristwood, T., Clulow, J. S., ... & Fineran, P. C. (2013). Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS Genetics*, 9 (4), e1003454. doi:10.1371/journal.pgen.1003454.

Vyas, T., Rapalli, V.K., Chellappan, D.K., Dua, K., Dubey, S. K., & Singhvi, G. (2021). Bacterial Biofilms Associated Skin Disorders: Pathogenesis, Advanced Pharmacotherapy and Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems as a Treatment Approach. *Life Sciences*, 287, 120148. doi:10.1016/j.lfs.2021.120148.

Wang, Y., Liu, B., Grenier, D., & Yi, L. (2019). Regulatory mechanisms of the luxS/AI-2 system and bacterial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63. doi:10.1128/AAC.01186-19.

Weldrick, P. J., Iveson, S., Hardman, M. J., & Paunov, V. N. (2019). Breathing new life into old antibiotics: Overcoming antibacterial resistance by antibiotic-loaded nanogel carriers with cationic surface functionality. *Nanoscale*, 11 (21), 10472-10485. doi:10.1039/C8NR10022E.

Whiteley, M., Diggle, S. & Greenberg, E. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551, 313-320. doi:[10.1038/nature24624](https://doi.org/10.1038/nature24624).

Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2012). Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population. *Journal of Bacteriology*, 194 (8). doi:[10.1128/jb.00022-12](https://doi.org/10.1128/jb.00022-12).

Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Hoiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7, 1-7. doi:[10.1038/ijos.2014.65](https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65).

Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 1318–1328. doi:[10.1099/mic.0.2006/004911-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004911-0).

Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3 (3), 135-149. doi:[10.1016/j.synbio.2018.09.004](https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.004).

Zhou, J. W., Chen, T. T., Tan, J. X., Sheng J. Y., & Jia, Q. A. (2018). Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 35-41. doi:[10.1016/j.ijantimicag.2018.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.002).

Zhu, L., Chen, T., Xu, L., Zhou, Z., Feng, W., Liu, Y., & Chen, H. (2020). Effect and mechanism of quorum sensing on horizontal transfer of multidrug plasmid RP4 in BAC biofilm. *Science of the Total Environment*, 698, 134236. doi:[10.1016/j.scitotenv.2019.134236](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134236).

Zimmermann, S., Klinger-Strobel, M., Bohnert, J. A., Wendler, S., Rödel, J., Pletz, M. W., ... & Tuchscher, L. (2019). Clinically approved drugs inhibit the *Staphylococcus aureus* multidrug NorA efflux pump and reduce biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2762. doi:10.3389/fmicb.2019.02762.

Zuberi, A., Misba, L., & Khan, A. U. (2017). CRISPR interference (CRISPRi) inhibition of luxS gene expression in *E. coli*: an approach to inhibit biofilm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 214. doi:[10.3389/fcimb.2017.00214](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00214).

ÇEŞİTLİ HASTALIKLAR VE MOLEKÜLER KÖKENLERİ

