Lucilia sericata'nın *Lucimycin* Geninin Moleküler Karakterizasyonu

Molecular Characterization of *Lucimycin* Gene of *Lucilia sericata*

Songül ÇETİN¹(ID), Tülay AKSOY²(ID)

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Kayseri, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² Inonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Malatya, Turkey.

Makale Atfı: Çetin S, Aksoy T. *Lucilia sericata*'nın *lucimycin* geninin moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):392-403.

ÖZ

Calliphoridae ailesinin bir üyesi olan *Lucilia sericata*, *Lucilia* cinsindeki en yaygın türlerden birisidir. *L.sericata*'nın tıp açısından önemi, maggot debridman tedavisi (MDT)'nde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. MDT, *L.sericata* larvalarının steril hale getirilerek iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılmasına verilen isimdir. Kronik, iyileşmeyen yaraların (dekübit ülseri, venöz bacak ülseri, diyabetik ayak ülseri vb.) tedavisinde kullanılan *L.sericata* kurtçukları, salgıladıkları proteolitik tripsin ve *lucimycin* benzeri enzimler yardımıyla yaraları temizler. Bu çalışma, MDT'de görev alan *L.sericata* larvalarından moleküler yöntemler kullanılarak elde edilen *lucimycin* geninin moleküler karakterizasyonunu belirlemek ve literatüre katkıda bulunmak amacıyla yapılmıştır. Çalışma, *L.sericata* türüne ait erişkin kolonilerinin sürekli üretimi, ışık, nem ve sıcaklık gibi koşulların oluşturulduğu insektaryum ünitesinde yapılmıştır. *L.sericata* yaşam döngüsü takip edilerek, türüne ait yumurta, larva, pupa, erişkin sineklerin üretimi ve sinek kolonileri oluşturulmuştur. Insektaryum ünitesinde ergin sineklerden elde ettiğimiz üçüncü dönem larvalardan RNA izolasyonu yapılmış ve takiben revers transkripsiyon ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'ların, *L.sericata*'nın *lucimycin* geni için tasarlanan özgül primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmış ve elde edilen ampikonlar pJET1.2/blunt vektörüne klonlanarak plazmit saflaştırılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmitlerin, vektöre özgül primerlerle dizi analizi yapılmış ve hedef gen bölgesi dizileri elde edilmiştir. Nükleotid dizileri saptanan izolatın moleküler karakterizasyonu belirlendikten sonra GenBank veritabanına MF964229 aksesyon numarası ile kaydı sağlanmıştır. Insektaryum ünitesinde üretilen *L.sericata* larvalarından elde edilen cDNA'dan *lucimycin* özgül primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda 288 baz çifti (bp) büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir. Agaroz jelde görüntülenen PCR ürünü, saflaştırılarak transformasyon işlemi yapılmış ve sonrasında oluşan kolonilerin rekombinant plazmit içerip içermedikleri PCR ile gösterilmiştir. Elde edilen kolonilerin üç tanesinin PCR ile *L.sericata lucimycin* geni içeren rekombinant plazmit olduğu tespit edilmiştir. PCR ile pozitifliği doğrulanan üç koloniden miniprep yapılarak *L.sericata lucimycin* geni içeren rekombinant plazmitler saflaştırılmıştır. Toplam 20 µl rekombinant plazmit miniprep ürününe PCR uygulanarak rekombinant plazmit ürünün *L.sericata lucimycin* geni içerdiği doğrulanmıştır. Klonlama sonrası plazmitin doğrulanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi yapılarak 288 bp uzunluğundaki *L.sericata lucimycin* gen dizisi doğrulanmıştır.

izole ettiğimiz *lucimycin* genine, özgül pJET1.2 ileri ve revers primerler kullanılmak suretiyle çift yönlü dizi analizi uygulanarak sonuçlar Blastn algoritması ile tür ve/veya alt tür düzeyinde doğrulanmıştır. İzolat, MF964229 aksesyon numarası ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. İzole ettiğimiz örneğimize ait DNA dizisi, Pubmed/Blast programı ile GenBank'ta bulunan diğer izolatlarla karşılaştırılmış ve KJ413251.1 GenBank nolu izolatla %99 benzer bulunmuştur. İzolatımıza ait dizide 113. nükleotitin C (sitozin) olduğu görülürken, KJ413251.1 GenBank nolu izolatındaki dizide ise G (guanin) olması iki dizi arasındaki farklılığı ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *L.sericata* larvalarından elde edilen *lucimycin* geninin moleküler karakterizasyonu yapılmış, elde edilen ve antifungal özelliğe sahip bu molekülün ileride gerçekleştirilecek olan özellikle kutanöz enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaları kapsayan çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma, Türkiye'nin biyolojik varlığı olarak GenBank'a kaydı yapılan izolat olması ve dünyada ikinci çalışma özelliği taşıması açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Lucilia sericata*; *lucimycin*; moleküler karakterizasyon.

ABSTRACT

Lucilia sericata, a member of the *Calliphoridae* family, is one of the most common species in the genus *Lucilia*. Medical importance of *L.sericata* stems from its use in maggot debridement therapy (MDT). MDT is the name of *L.sericata* larvae being sterilized and used in the treatment of non-healing wounds. *L.sericata* maggots used in the treatment of chronic and non-healing wounds (decubitus ulcer, venous leg ulcer, diabetic foot ulcer, etc.) clean the wounds with the help of secreted proteolytic trypsin and *lucimycin*-like enzymes. The aim of the study was to determine the molecular characterization of *lucimycin* gene obtained from *L.sericata* larvae in MDT by using molecular methods and to contribute to the literature. In this study, continuous production of adult colonies of *L.sericata* species was carried out in insectarium unit where conditions such as light, humidity and temperature were formed. The life cycle of *L.sericata* was followed and the production of eggs, larvae, pupae, adult flies and fly colonies of the species were formed. In the third stage larvae obtained from adult flies in the insectarium unit, RNA was isolated and subsequently cDNA synthesis was performed by reverse transcription. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of the synthesized cDNAs with the specific primers designed for the *lucimycin* gene of *L.sericata* was performed and the obtained amplicons were cloned into pJET1.2/blunt vector and the plasmid was purified. The recombinant plasmids were sequenced with vector-specific primers and target gene region sequences were obtained. After the molecular characterization of the isolate with nucleotide sequences was determined, it was registered to GenBank database with the accession number MF964229. The PCR product of 288 bp was obtained from the cDNA obtained from the larvae of *L.sericata* produced in the insectarium unit by PCR using *lucimycin* specific primers. The PCR product imaged on the gel was purified by transformation and subsequent colonies were screened to see whether they contained recombinant plasmids. Three of the colonies were identified as recombinant plasmids containing *L.sericata lucimycin* gene by PCR screening. From three colonies confirmed by PCR screening, recombinant plasmids containing *L.sericata lucimycin* gene were purified by miniprep. The recombinant plasmid product was confirmed to contain the *L.sericata lucimycin* gene by PCR from a total of 20 µl of the recombinant plasmid miniprep product. DNA sequencing analysis was performed to confirm the plasmid after cloning. The 288 bp *L.sericata lucimycin* sequence was confirmed by DNA sequence analysis. The *lucimycin* gene isolated was confirmed by specific and pJET1.2 forward and reverse primers using Blastn algorithm as a result of species and/or subspecies using the Blastn algorithm and the related isolate was recorded in GenBank database with the MF964229 accessory number. The DNA sequence of the isolated sample was compared with other isolates found in GenBank by Pubmed/Blast program. KJ413251.1 was found to be 99% similar to the GenBank isolate. The 113th nucleotide was C (cytosine) in the sequence of our isolate, while the existence of G (guanine) in the sequence numbered KJ413251.1 GenBank revealed the difference between the two sequences. In this study the molecular characterization of *lucimycin* gene derived from *L.sericata* larvae were determined for the first time in Turkey, it is assumed that this molecule which has an antifungal property, can be used in the studies that will be carried out in the future, especially in microorganisms causing cutaneous infections. The study is important since the isolate is registered as a biological asset of Turkey in GenBank and also being the second study in the world.

Keywords: *Lucilia sericata*; *lucimycin*; molecular characterization.

GİRİŞ

Calliphoridae ailesinin bir üyesi olan *Lucilia sericata*, *Lucilia* cinsindeki en yaygın türlerden birisidir. Eskiden *Phaenicia sericata* olarak bilinen *L.sericata* yaygın olarak leş, çöp ve dışkı üzerinde bulunmaktadır¹. *L.sericata*'nın tıp açısından önemi, maggot debridman tedavisi (MDT)'nde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. MDT, *L.sericata* larvalarının steril hale getirilerek iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılmasına verilen isimdir². Tıbbi tedavi amacıyla kullanılan kurtçuklar, yaralardaki enfeksiyonları ve nekrotik dokuları yok ederek yaraların iyileşmesine yardımcı olmaktadır³. MDT'nin etki mekanizması; nekrotik dokunun çıkarılması (debridman), yara iyileşmesinin hızlanması ve yara dezenfeksiyonu olmak üzere üç şekildedir⁴. Yara dezenfeksiyonunda, defensin benzeri lucifensin, kimotripsin gibi antibakteriyel aktiviteye sahip küçük moleküller ve antimikrobiyal peptitler (AMP) rol oynamaktadır. Bu önemli AMP'lerden biri de son zamanlarda tespit edilen ve aynı zamanda antifungal aktivite gösteren "*lucimycin*" dir.

Bu çalışmada, ergin *L.sericata* sineklerinin üçüncü dönem larvalarından elde edilen materyallerin moleküler yöntemlerle incelenerek, maggot tedavisinde yer alan *L.sericata lucimycin* gen bölgesine göre tasarlanmış özgül primerler ile moleküler olarak nitelendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

L.sericata'nın Laboratuvarında Üretilmesi

Bu çalışma, laboratuvarımızda bulunan insektaryum ünitesinde gerçekleştirildi. *L.sericata* türü sineklerin üretimi, 27-30°C sıcaklığa ve %42-44 bağıl neme sahip laboratuvarında %20'lik şeker ve karaciğer parçaları verilerek yapıldı.

Larvadan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu yapmak amacıyla larvalar, bistüri yardımıyla parçalandı ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. RNA izolasyonunu "Trigent RNA isolation reagent kit (Biomatik/KS161, ABD)" prosedürü optimize edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi, "transkriptor high fidelity cDNA synthesis kit (Merck, Almanya)" prosedürü optimize edilerek uygulandı ve elde edilen cDNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Lucimycin Geninin Elde Edilmesi

Çalışmada, *lucimycin* gen bölgesine ait özgül primerler tasarlandı ve PCR için *Lucimycin* F ve *Lucimycin* R primerleri kullanıldı (Tablo I).

PCR için toplam 25 µl hacimde; 12.5 µl master karışımı (SolisBioDyneFIREPol, Estonya), 3 µl *L.sericata* cDNA'sı, 1 µl *Lucimycin* F ve *Lucimycin* R primerleri ve 7.5 µl steril distile su içerecek şekilde karışım hazırlandı. 95°C'de 1 dakika ön ısıtma, 95°C'de 30 saniye de-

Tablo I. *Lucimycin Gen Bölgesinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primerler*

Primer adı	Nükleotit dizisi	TM (°C)
<i>Lucimycin F primer</i>	(5'-CAC CAT GGC AAA ATT ATT TAT TAT TGT TCT TTT C-3')	65.7
<i>Lucimycin R primer</i>	(5'-TAA TAA CCA TGA CTT TTA TAG CCA TGA CC-3')	64.8

natürasyon, 62°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 30 saniye amplifikasyondan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 15 dakikalık son uzama işlemi yapıldı. PCR ürünü %0.8 etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde yürütüldü ve agaroz jeldeki bantlar chemiDoc MP system görüntüleme (Bio-Rad, ABD) cihazıyla görüntüledi.

Elde edilen PCR ürününün saflaştırılması için "Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, ABD)" protokolü optimize edilerek uygulandı. Saflaştırılmış PCR ürünü klonlama işlemine kadar -20°C'de saklandı.

***Lucimycin* Geninin Klonlanması**

PCR ürününün klonlama işlemi, "CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific, ABD)" prosedürüne göre gerçekleştirildi ve sonrasında *lucimycin* geni pJET vektörüne klonlandı. Bu karışımdan 5 µl alınarak buz üzerinde bekletilen mikrosantrifüj tüpündeki 100 µl kompetan OneShot® TOP10 *Escherichia coli* (Invitrogen, ABD) hücrelerine eklendi. Ardından mikrosantrifüj tüpü, 42°C'de 1 dakika bekletilerek buz üzerine alındı ve üzerine 250 µl SOC (Super Optimal broth with Catabolit repression) besiyeri eklendi. Daha sonra ampisilinli katı Luria Bertani (LB) agar üzerine bu karışım ekildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. LB besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediğini tespit etmek amacıyla PCR taraması yapıldı. PCR taraması ile transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediği tespit edildi. Her bir koloni için 25 µl'lik karışım (master karışım 12.5 µl; *Lucimycin F* primeri 1 µl, *Lucimycin R* primeri 1 µl ve steril distile su 10.5 µl) hazırlandı. Kolonilerden, steril pipet ucuyla alınan örnekler, tüplerdeki karışımlara eklendi. PCR protokolü uygulanarak elde edilen PCR ürünü, %0.8 etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde yürütüldü ve jel üzerindeki PCR ürünü "ChemiDoc MP system (Bio-Rad, ABD)" görüntüleme cihazıyla görüntüledi.

PCR taraması ile pozitif olduğu belirlenen kolonilerden, "EZ-10 spin column plasmid DNA miniprep kit (Bio basic, Kanada)" protokolü uygulanarak miniprep hazırlandı ve *L.sericata lucimycin* genini içeren rekombinant plazmitler saflaştırıldı. Rekombinant plazmitler, kalıp olarak kullanılarak PCR yapıldı ve agaroz jelde görüntülenen *L.sericata lucimycin* geninin varlığı doğrulandı. Ayrıca, DNA dizi analizi yapılarak klonlamanın doğruluğu kesinleştirildi. DNA dizi analizi için pJET1.2 ileri sequencing primer (5'-CAC CAT GGC AAA ATT ATT TAT TAT TGT TCT TTT C-3') pJET 1.2 revers sequencing primer (5'-TAA TAA CCA TGA CTT TTA TAG CCA TGA CC-3') kullanıldı. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazı (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD)'nda analiz edildi. DNA dizi analizi sonuçları, Chromas v.1.45 programı ile <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki BLAST (Basic Lo-

cal Alignment Search Tool) programıyla veri tabanında mevcut olan *L.sericata* dizileri ile karşılaştırılarak incelendi.

BULGULAR

İnsektaryum ünitesinde üretilen *L.sericata* larvalarından elde edilen cDNA'dan *lucimycin* özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 288 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Resim 1).

Agaroz jelde görüntülenen PCR ürünü bistüri ile kesilerek 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve jelden Wizard® SV Gel and PCR Clean-UpSystem (Promega, ABD) kit prosedürüne göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 288 bp büyüklüğündeki PCR ürünü %0.8 etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Resim 2).

Saflaştırılmış *L.sericata lucimycin* PCR ürünün 5 µl'si klonlamada kullanılmıştır. CloneJET PCR kit (Thermo Scientific, ABD) prosedürü optimize edilerek yapılan klonlamada, ligasyon sonucu elde edilen rekombinant plazmitin 3 µl'si One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E.coli* (Thermo Fisher Scientific, ABD) hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 3A). Transformasyon sonucu oluşan kolonilerin başka bir antibiyotikli LB besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır (Resim 3B).

Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin rekombinant plazmit içerip içermedikleri PCR taraması ile gösterilmiştir. Elde edilen kolonilerin üç tanesinin PCR taraması ile *L.sericata lucimycin* genini içeren rekombinant plazmit olduğu tespit edilmiştir (Resim 4).

Resim 1. *Lucilia sericata*'nın 288 bp'lik *lucimycin* geninin %1.5'lik etidyum bromür ile boyanmış agaroz jeldeki görüntüsü. 1: *L.sericata* örneği, M: Moleküler ağırlık belirteci (50 bp).

Resim 2. *Lucilia sericata* *lucimycin* geni clean-up sonrası PCR görüntüsü. 1: Clean-up sonrası *lucimycin* geni, 2: Negatif kontrol, M: Moleküler ağırlık belirteci (100 bp).

Resim 3. A. Transformasyon sonrası oluşan koloniler, B. Transformasyon basamağında ikinci inkübasyon sonucu oluşan koloniler.

PCR taraması ile pozitifliği doğrulanan üç koloniden miniprep (EZ-10 spin column plasmid DNA minipreps) kitine göre yapılarak *L.sericata lucimycin* geni içeren rekombinant plazmitler saflaştırılmıştır. Rekombinant plazmit miniprep ürününden toplam 20 µl olacak şekilde PCR yapılarak rekombinant plazmit ürünün *L.sericata lucimycin* geni içerdiği doğrulanmıştır (Resim 5).

Resim 4. İnkübasyon sonucu çoğalan kolonilerden oluşturulan PCR yöntemi ile pozitif çıkan örneklerin agaroz jelde görüntüsü. **M:** Moleküler ağırlık belirteci (100 bp Promega, ABD), 1, 2, 3: Pozitif koloniler, 4: Pozitif kontrol.

Resim 5. *Lucilia sericata* lucimycin miniprep PCR sonrası görüntüsü. 1: Pozitif kontrol, 2, 3, 4: Miniprep sonrası 288 bp'lik *L.sericata* lucimycin geni PCR ürünü, 5: Negatif kontrol, **M:** Moleküler ağırlık belirteci (100 bp Promega, ABD).

Klonlama sonrası plazmidin doğrulanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) (National Center for Biotechnology Information, ABD) programına girilmiştir. DNA dizi analizi yapılan 288 bp uzunluğundaki *L.sericata* lucimycin dizisi doğrulanmıştır (Şekil 1). Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *L.sericata* DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 1. DNA dizi analizi yapılan *Lucilia sericata* lucimycin gen dizisi.

İzole ettiğimiz *lucimycin* genini, spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekans analizleri sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür ve/veya alt tür bazında konfirmasyonları sağlanmış olup ilgili izolat MF964229 aksesyon numarası ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

İzole ettiğimiz örneğimize ait DNA dizisi Pubmed/Blast programı ile GenBank'ta bulunan diğer izolatlarla karşılaştırılmıştır. KJ413251.1 GenBank nolu izolatla %99 benzer olduğu görülmüştür. İzolatımıza ait dizide 113. nükleotitin C (sitozin) olduğu görülürken, KJ413251.1 GenBank nolu izolatındaki dizide ise G (guanin) olması iki dizi arasındaki farklılığı ortaya koymuştur (Şekil 2).

KJ413251.1	1	ATGGCAAATAATTTATTATTGTTCTTTTCGCTTTAATCGCCGTTGTTTGGCTCAACAC	60
MF964229	1	ATGGCAAATAATTTATTATTGTTCTTTTCGCTTTAATCGCCGTTGTTTGGCTCAACAC	60
KJ413251.1	61	GGCTATGGTGCCGGTGGCCATGGCCAACAAGGCTATGGTAGCCAACATAGCACTCATGCT	120
MF964229	61	GGCTATGGTGCCGGTGGCCATGGCCAACAAGGCTATGGTAGCCAACATAGCACTCATGCT	120
KJ413251.1	121	CCCCAAGGTGGACATGTTGTCGTTGAACAAGGTTTATAGTGGTCATGTTTCATGAACAACAG	180
MF964229	121	CCCCAAGGTGGACATGTTGTCGTTGAACAAGGTTTATAGTGGTCATGTTTCATGAACAACAG	180
KJ413251.1	181	GCTGGGCATCATCATGAAGCTGGCCATCATGAGCAAGCTGGTCATCATGAACAATCTGGT	240
MF964229	181	GCTGGGCATCATCATGAAGCTGGCCATCATGAGCAAGCTGGTCATCATGAACAATCTGGT	240
KJ413251.1	241	CAACAAGTTCATGGTCAAGGTCATGGCTATAAAGTCATGGTTATTAA	288
MF964229	241	CAACAAGTTCATGGTCAAGGTCATGGCTATAAAGTCATGGTTATTAA	288

Şekil 2. Elde edilen *Lucimycin* geninin KJ413251.1 Genbank nolu izolatı ile karşılaştırılması.

TARTIŞMA

İyileşmeyen kronik yaralara uygulanan en eski tedavi yöntemi MDT'dir. Tedavi ile ilgili yapılan laboratuvar ve klinik çalışmalarda, yaralar üzerine konulan kurtçukların nekrotik dokuyu ortadan kaldırdığı, granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırdığı ve enfeksiyondan arındırıp yeni bir enfeksiyon oluşumunu engellediği gösterilmiştir⁵. Önemli bir sağlık problemi olan inatçı kronik yaralarda, polimikrobiyal flora kolonize olmakta ve bu kolonizasyon yara iyileşmesini geciktirmektedir. Ayrıca, son yıllarda yapılan araştırmalarda, kronik yaraların antibiyotiklere karşı direnç oluşturduğu ve antibiyotiklerin mikrobiyal ajanlar üzerine olan etkisinin giderek azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle, antibiyotiklere yanıt vermeyen kronik yaralarda yeni ve etkili alternatif stratejilerin desteklenmesine gereksinim duyulmaktadır. MDT'de *L.sericata*'nın ikinci dönem larvaları kullanılmaktadır⁶. Çok uzun yıllardan beri kronik yaralara uygulanan *L.sericata* larvalarının etkin bir şekilde ölü dokuyu debride ettikleri ve yaralarda dezenfeksiyon sağladıkları kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, tedavide kullanılan bu kurtçukların iyileşmeyi de hızlandırdıkları bilinmektedir⁷. MDT'de kullanılan larvalar canlı dokuyu etkilemeden, sadece nekrotik dokuları besin olarak kullanılmaktadır. Bu larvalar yara üzerinde beslenmeleri sırasında ölü dokuları ayrıştırarak besin olarak kullanılırlar. Bunun yanı sıra, yaradaki bakteri ve mantarları da besin olarak kullanabilmektedirler. Ayrıca, beslenme sırasında salgıladıkları enzimler sayesinde yaradaki mikroorganizmaları da ortadan kaldırmaktadırlar⁸.

Yara dezenfeksiyonunda, defensin benzeri lucifensin, kimotripsin gibi antibakteriyel aktiviteye sahip küçük moleküller ve antimikrobiyal peptitler (AMP) rol oynamaktadır. Bu önemli AMP'lerden biri de aynı zamanda antifungal aktivite gösteren lucimycindir⁹. Bu çalışmada, *L.sericata*'nın üçüncü dönem larvalarından *lucimycin* genine özgül primerlerle PCR ile elde edilen izolatin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Larval sekresyonlardaki antimikrobiyal aktiviteye sahip olan moleküller, defensin benzeri bir molekül olan lucifensin ve kimotripsindir. Lucifensinin, *L.sericata* larvalarının salgı ürünlerinde bulunduğu ve yara patojenlerinin ortadan kaldırılmasında önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. İlk defa larvaların bağırsağından izole edilen lucifensin daha sonra vücut yağlarında, tükürük bezinde ve hemolenfte de saptanmıştır⁵. Bir diğer antimikrobiyal ajan olan kimotripsin, larvaların debridman mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda önemli bir noktayı aydınlatmaktadır. Kimotripsinin yara kabuklarını etkin bir şekilde azalttığı ve biyofilm tabakasının bozulmasında etkili olduğu görülmüştür. Biyofilm tabakasının bozulması ile birlikte bakteriler antibiyotiklere, immün sistem faaliyetlerine ve larva eylemlerine daha duyarlı hale gelmektedir^{6,9}. *L.sericata* AMP'leri sadece lucifensin, kimotripsin ve *lucimycin* değil aynı zamanda attasin, sekropin, dipterin, prolin açısından zengin peptitleri ve sarkotoksinleri de içermektedir¹⁰. Buna karşın, antifungal bir molekül olan *lucimycin* son yıllarda keşfedilmiş olup gelecekteki bilimsel çalışmalara da ışık tutacağı öngörülmektedir. Yapılan çalışmalarda yeni keşfedilen bu, sadece antifungal özelliğe sahip olduğu ve Oomycete, Ascomycota, Basidiomycota ve Zygomycota şubelerinin temsilcileri de dahil olmak üzere çeşitli mantar patojenlerine karşı etkinlik gösterdiği ortaya konmuştur. *Lucimycin*'in antifungal mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, muhtemelen bakte-

riyel hücre zarlarının dış kısmında bulunan negatif yüklü fosfolipitleri bağlayan defensinler ve sekropinler gibi klasik katyonik peptitlerin antibakteriyel mekanizmalarından büyük ölçüde farklıdır. Bu peptitler bir amfipatik konformasyon benimseyerek bakteri membranında gözenek açabilmekte veya membranı bozabilmektedir. Lucimycinin hafif asidik olan pH'sı negatif yüklü olan membranlarla etkileşime girmedikini ve antibakteriyel aktivite eksikliği olduğunu açıklamaktadır¹¹.

Pöppel ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada¹², antifungal bir peptit olan *lucimycin* transkriptinin tanımlanması, rekombinant ve sentetik üretimi, antibakteriyel ve antifungal etkinlik testleri yapılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmalarında, *lucimycin* çoğu antimikrobiyal peptidin aksine disülfid bağlarına sahip olmadığını, prolin açısından zengin ve hidrofilik olduğunu fakat katyonik olmadığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, tiyoredoksin ve His6 ile bir füzyon proteini olarak *lucimycin* üretmişlerdir. Daha sonra elde edilen rekombinant peptit saflaştırılarak in vitro ortamda antimikrobiyal etkinliklerini gözlemlemişlerdir. İlk olarak gram-negatif bakteriler olan *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve gram-pozitif bakteriler olan *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı test etmişlerdir. Ancak *lucimycin*in bu bakterilere karşı test edilen en yüksek konsantrasyonda (100 µM) bile aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir. Daha sonra ekonomik açıdan önemli tarımsal patojenler olan *Fusarium raminearum* ve *Phytophthora parasitica*'ya karşı in vitro ortamda 0.3-200 Mm *lucimycin* peptidinin varlığında çimlendirilen sporların sayısını belirleyerek antifungal etkinliğini test etmişlerdir. Test sonucunda *lucimycin*in çimlenme oranını düşürdüğü, hatta yüksek konsantrasyonlarda çimlenmeyi tamamen ortadan kaldırdığını gözlemlemişler ve *lucimycin*in antibakteriyel değil antifungal bir peptit olduğunu tanımlamışlardır.

Baumann ve arkadaşları "immün yanıt sırasında *L.sericata* dokularındaki özgül referans genlerin seçimi ve değerlendirilmesi" başlıklı çalışmalarında¹³ farklı patojen sınıflarını hedefleyen (18S rRNA, 28S rRNA, actin, β-tübülin, RPS3, RPLP0, EF1α, PKA, GAPDH ve GST1) 10 aday referans geni ve üç bağışık geninin (*lucimycin*, *defensin-1* ve *attacin-2*), dokuya spesifik ekspresyon stabilitesini araştırmış ve *P.aeruginosa* ile *L.sericata* larvalarını enfekte edilerek immün yanıtın önce ve sonra farklı *L.sericata* dokularında bu üç bağışıklık geninin ekspresyonunu izlemişlerdir. Gram-negatif bakterileri hedefleyen *attacin-2*'nin larval dokularda azami düzeye ulaşan (50.000 kat üzerinde) güçlü etkisi görülmüştür. Ayrıca, gram-negatif bakterilere karşı hiçbir etkiye sahip olmadığı bilinen ve antifungal bir peptit olan *lucimycin*in beklenildiği gibi diferansiyel bir etkisine rastlanılmamıştır. Gram-pozitif bakterileri hedefleyen *defensin-1*'in ise şaşırtıcı şekilde larval dokularda yükseldiği gözlemlenmiştir.

DNA dizi analizi mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Karşılaştırılan çok sayıda karakterin çözünürlük gücünü önemli derecede artırabileceği için filogenetik analizlerde DNA dizilerinin kullanılmasının yararlı olduğu bilinmektedir. Bu yöntem; dizide ortaya çıkan varyasyon şeklinin gözlenebilmesi yani bir mutasyonun transversiyon ya da transisyon tipinde veya sessiz (silent) ya

da seçilmiş (selected) olup olmadığını anlamada aydınlatıcıdır. Ayrıca, nükleotit sapma derecesinin ölçülebilmesi, farklı laboratuvar sonuçlarının doğrudan karşılaştırılabilmesi, dizilerin yayımlanması ve elektronik veri tabanlarında saklanması (GenBank, EMBL ve DDBJ), sonuçların doğrulanması ve bu uygulamaların diğer taksonlara suş ya da klon elde etmeye gerek kalmaksızın uygulanabilmesi veya deneylerin tekrarlanabilmesine izin verecek özellikte olması DNA dizi analizinin önemli faydaları arasında yer almaktadır^{14,15}.

Bu çalışma, dünyada GenBank'a kayıtlı ikinci, ülkemizde ise ilk kez *L.sericata lucimycin* DNA dizi bilgisini sunan bir çalışma olması açısından önemlidir. *L.sericata* larvalarından elde ettiğimiz izolatin *lucimycin* genine ait dizide 113. nükleotiti C iken, KJ413251.1 GenBank numaralı izolattaki dizi ile karşılaştırıldığında aynı pozisyondaki nükleotitin G olduğu görülmektedir. İki dizi arasındaki tek nükleotitik fark çalışmamızda treonin (ACT) aminoasidine, Pöppel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada¹² ise serin (AGT) aminoasidine denk gelmektedir. Yapılan analizler sonucunda coğrafyamızdaki *L.sericata* izolatinın GenBank'a kayıtlı izolata %99 oranında benzer olduğu görülmüştür. Bu çalışmada klonlanan genin ekspresyonu, proteinin saflaştırılması ve fonksiyonel olup olmadığı yönünde araştırma yapılmamış olması çalışmanın kısıtlılıklarını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bu gen bölgesinin protein olarak ifade edilen bir bölge olması nedeniyle oluşan nokta mutasyonun fonksiyonel analizlerinin yapılması ileride yapılacak çalışmalara ön veri sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile *L.sericata lucimycin* genine ait rekombinant DNA dizisi elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen ve antifungal özelliğe sahip bu molekülün ileride gerçekleştirilecek olan çalışmalarda özellikle kutanöz enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bazalinski D, Kozka M, Karnas M, Wiech P. Effectiveness of chronic wound debridement with the use of larvae of *Lucilia sericata*. J Clin Med 2019; 8(11): 1845.
2. Choudhary V, Choudhary M, Pandey S, Chauhan VD, Hasnani JJ. Maggot debridement therapy as primary tool to treat chronic wound of animals. Vet World 2016; 9(4): 403-9.
3. Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, et al. Cost of illness of chronic leg ulcers in Germany. Int Wound J 2010; 7(2): 97-102.
4. Zarchi K, Jemec GB. The efficacy of maggot debridement therapy a review of comparative clinical trials. Int Wound J 2012; 9(5): 469-77.
5. Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. J Med Microbiol 2008; 57(5): 617-25.
6. Bonn D. Maggot therapy: an alternative for wound infection. The Lancet 2000; 356(9236): 1174.

7. Pöppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agent Chemother* 2015; 59(5): 2508-14.
8. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y, Galun R. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 2007; 21(2): 127-31.
9. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010; 1(5): 440-64.
10. Thomas S, Jones M. Wound debridement: evaluating the costs. *Nursing Standard* 2001; 15(22): 59-61.
11. Ratcliffe NA, Mello, CB, Garci, ES, Butt TM, Azambuja P. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochem Mol Biol* 2011; 41(10): 747-69.
12. Pöppel AK, Koch A, Kogel KH, Vogel H, Kollewe C, Wiesner J, et al. *Lucimycin*, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Bio Chem* 2014; 395(6): 649-56.
13. Baumann A, Lehmann R, Beckert A, Vilcinskas A, Franta Z. Selection and evaluation of tissue specific reference genes in *Lucilia sericata* during an immune challenge. *PLoS One* 2015; 10(8): 1-16.
14. Kılıçoğlu M, Ozkoç I. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *Omü Zir Fak Der* 2008; 23(1): 65-72.
15. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Moleküler Biyoloji. *Nobel Akademik Yay* 2012; 2: 482-6.