

Halofillerin Adaptasyonunda Ekstrasellüler Veziküllerin Rolü

Dilan BARUT

YÜKSEK LİSANS

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Kasım 2022



The Role of Extracellular Vesicles in the Adaptation of Halophiles

Dilan BARUT

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

November 2022

Halofillerin Adaptasyonunda Ekstrasellüler Veziküllerin Rolü

Dilan BARUT

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Pınar AYTAR ÇELİK

İkinci Danışman: Doç. Dr. Burak DERKUŞ

“ESOGÜ-BAP tarafından FYL-2021-1568 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.”

Kasım 2022

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Pınar AYTAR ÇELİK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Halofillerin Adaptasyonunda Ekstrasellüler Veziküllerin Rolü” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 07.11.2022

Dilan BARUT

İmza

ÖZET

Ekstrasellüler veziküller, farklı hücre tiplerinden salgılanan lipit çift katmanlı nanometrik yapılardır. Veziküllerin salgılandıkları bakteri hücrelerinin patogenezi ve çevreye adaptasyonu ile ilgili işlevlerde rolleri olduğu bilinmektedir. Bunun yanında veziküllerin biyoteknolojik kullanımları da hız kazanmıştır. Ekstremofilik mikroorganizmaların ürettikleri metabolitler ve adaptasyon mekanizmaları da biyoteknolojik öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında sunulan araştırma, halofilik bakterilerin vezikül karakterizasyonuna ve adaptasyondaki rolüne odaklanmıştır.

Halomonas caseinilytica farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilip her bir gruptan vezikül izolasyonu yapılmıştır. Aynı zamanda kontrol grubu olarak mezofilik bakteri olan *Escherichia coli*' den de vezikül izolasyonu yapılmıştır. Veziküllerin morfolojik yapıları karakterize edilmiştir ve protein bileşimleri tespit edilip adaptasyon mekanizmasına dair bir farklılık taranmıştır.

Yapılan analizler sonucunda farklı tuz konsantrasyonlarına ait veziküllerde genel olarak benzer protein profilleri olduğu bulunmuştur ancak temel bileşen analizi sonucunda farklı kümelenen protein profilleri olarak OmpA-OmpF porinleri, Uzama faktörü Tu, şaperonin ve TolB tespit edilmiştir. Bu proteinlerin vezikül oluşumu ve adaptasyon mekanizmasında rolleri olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekstrasellüler vezikül, Halofilik mikroorganizma, Adaptasyon

SUMMARY

Extracellular vesicles are nanometric lipid bilayer particles released by several cell types. The vesicles are known to have a function in the pathogenicity and adaptability of the bacterial cells they produce to the environment. Furthermore, the biotechnological use of vesicles has gained traction. Extremophilic bacteria' metabolites and adaption processes are also important in biotechnology. The research presented in this thesis study focused on the vesicle characterisation of halophilic bacteria and its involvement in adaptation.

Halomonas caseinilytica was cultivated at various salt concentrations, and vesicles from each group were isolated. Simultaneously, vesicle isolation from *Escherichia coli*, a mesophilic bacteria, was performed as a control group. The morphological features of the vesicles were studied, their protein composition was identified, and several adaption mechanisms were investigated.

The investigation showed that there were usually comparable protein profiles in the vesicles of different salt concentrations, however the main component analysis revealed that OmpA-OmpF porins, Elongation factor Tu, chaperonin, and TolB were distinct aggregating protein profiles. These proteins are hypothesized to play roles in vesicle production and adaption mechanisms.

Keywords: Extracellular vesicles, Halophilic microorganism, Adaptation

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	2
2.1. Ekstrasellüler Veziküller	2
2.1.1 Gram negatif bakterilerde ekstrasellüler veziküller	2
2.1.2 Gram pozitif bakterilerde ekstrasellüler veziküller	5
2.1.3 Arkelerde ekstrasellüler veziküller	6
2.1.4 Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin üretiminde etkili faktörler	7
2.2. Mikrobiyal Ekstrasellüler Veziküllerin Fonksiyonları	8
2.2.1 Taşıma sistemi olarak mikrobiyal ekstrasellüler veziküller	8
2.2.2 Biyofilm oluşumunda ekstrasellüler veziküller	9
2.2.3 Antibiyotik dirençliliğinde ekstrasellüler veziküller	10
2.2.4 Faj enfeksiyonu engellenmesinde ekstrasellüler veziküller	10

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.2.5 Mikrobiyota korunmasında ekstrasellüler veziküller	11
2.2.6 Gen aktarımında ekstrasellüler veziküller	12
2.2.7 Hücreler ile etkileşimde ekstrasellüler veziküller	12
2.2.8 Patogenezde ekstrasellüler veziküller	13
2.2.9 İmmün modülasyonunda ekstrasellüler veziküller	14
2.3. Mikrobiyal Ekstrasellüler Veziküllerin Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanımı..	15
2.3.1 Aşı platformu olarak ekstrasellüler veziküllerin kullanımı	15
2.3.2 İlaç taşıyıcı sistem olarak ekstrasellüler veziküllerin kullanımı	17
2.3.3 Kanser terapisinde ekstrasellüler veziküllerin kullanımı	17
2.3.4 Farklı sektörlerde ekstrasellüler veziküllerin kullanımı	18
2.4. Halofilik Mikroorganizmalar	19
2.4.1 Halofilik mikroorganizmaların adaptasyon stratejileri	19
2.4.2 Halofilik mikroorganizmalarda ekstrasellüler vezikül çalışmaları	20
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar.....	21
3.1.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri	22
3.1.3 Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tamponlar	23
3.1.4 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	26
3.2. Yöntem	26
3.2.1 Mikroorganizmaların geliştirilmesi	26

İÇİNDEKİLER

Sayfa

3.2.2 Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin izolasyonu	26
3.2.3 Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin elektron mikroskobu ile belirlenmesi ...	27
3.2.4 Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin proteomik analizi	27
3.2.4.1 <u>Bakterilerden total protein izolasyonu</u>	27
3.2.4.2 <u>Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)</u>	27
3.2.4.3 <u>Kütle spektrometri analizi (LC-MS/MS)</u>	28
3.2.4.4 <u>Biyoinformatik analizler</u>	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1. Mikrobiyal Ekstrasellüler Veziküllerin TEM Görüntüleri	30
4.2. SDS-PAGE sonuçları	31
4.3. Proteomik Analiz Bulguları	33
4.3.1 Proteinlerin hücre altı konum ve ortolog gruplarının belirlenmesi	33
4.3.2 Kantitatif analiz	35
4.3.3 Korelasyon analizi	36
4.3.4 Temel bileşen analizi	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR DİZİNİ	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Vezikül yapısının şematik gösterimi	3
2.2 Vezikül içeriğinin şematik gösterimi	4
2.3 Veziküllerin biyomolekülleri taşımasının şematik gösterimi	9
2.4 Veziküllerin salgılandıkları bakteri hücrelerini antibiyotik ve faj enfeksiyonuna karşı savunmasının şematik gösterimi	11
2.5 Bakteri patogeneğinde veziküllerin kullanımı	14
4.1 Ekstrasellüler veziküllerin TEM görüntüleri	31
4.2 Veziküllerin SDS-poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü	32
4.3 Vezikül proteinlerinin hücre altı konum oranlarının grafiksel gösterimi	34
4.4 LFQ değerlerinin histogram modeli ile gösterimi	35
4.5 Protein verileri arasındaki korelasyon analizi sonuçları	36
4.6 Küme analizi sonuç histogramı	37
4.7 PCA analiz sonuç grafiği	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Gram negatif bakterilere ait veziküllerin protein tanımlama çalışmaları	4
2.2. Veziküllerin kullanıldığı <i>N.meningitidis</i> serogrup B'ye karşı geliştirilmiş aşılar	16
3.1. Çalışma sırasında kullanılan laboratuvar cihazları	21
4.1. BCA testi ile belirlenen vezikül protein miktarları	32
4.2. Veziküllere ait protein sayılarının hücre altı konumlarına göre dağılma oranları	34
4.3. Farklı kümelenen proteinlerin özellikleri	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
NaCl	Sodyum klorür
H ₂ O	Su
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaBr	Sodyum bromür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
KCl	Potasyum klorür
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
pH	power of hydrogen
°C	Santigrat derece
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
g	Gram
µg	Mikrogram

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Simgeler****Açıklama**

M	Molar
mM	Milimolar
V	Volt
rpm	Dakika/devir sayısı
xg	İvme katsayısı
dk	Dakika

Kısaltmalar**Açıklama**

ACN	Asetonitril
BCA	Bikinkoninik asit testi
BFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
CXCL-2	Kemokin ligand-2
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiotretiol
EF-Tu	Uzama faktörü-1s1l kararsız
EV	Ekstrasellüler Vezikül
FA	Formik asit
GTP	Guanozin trifosfat
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
IAA	İyodoasetamid

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

IFN- γ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometrisi
Kısaltmalar	Açıklama
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon uçuş süresi
MGM	Modifiye Büyüme Ortamı
MS	Kütle Spektrometrisi
MudPIT-MS	Çok Boyutlu Protein Tanımlama Teknolojisi-Kütle spektrometrisi
MV	Membran Vezikül
Nano-LC-ESI-MS/MS	Nano Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi
OmpA	Dış membrana protein A
OmpF	Dış membrana protein F
OMV	Dış Membran Vezikül
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCA	Temel bileşen analizi
PD1	Programlanmış hücre ölümü proteini
PPAD	Peptidil arginin deiminaz
PQS	Pseudomonas kinolon sinyali
SDS-PAGE	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

sRNA	küçük ribonükleik asit
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TNF	Tümör nekroz faktör
TolB	Periplazmik protein B
Tol-Pal	Peptidoglikanla ilişkili lipoprotein
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ekstrasellüler veziküllerin keşfi ilk olarak ökaryotik hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise prokaryot, arke ve bitki türlerinde de vezikül salınımı tanımlanmıştır. Her bir organizma sınıfında farklı isimlendirilmiş vezikül yapıları mevcuttur. Ekstrasellüler veziküller bir hücre tarafından, hücre dışı ortama salınan lipit çift tabakalı, genellikle de 20-300 nm aralığında değişen nano boyutlu parçacıklardır. Ekstrasellüler veziküller protein, nükleik asit ve lipitler gibi birçok bileşik içermektedirler. İçerdikleri bileşikler sayesinde birden fazla fonksiyonel işlevlere sahiptirler. Böylece biyoteknolojide kullanımı açısından da yüksek potansiyele sahiptirler. Şimdiye kadar birçok bakteride ekstrasellüler vezikül salınımı gösterilmiştir ancak ekstremofilik mikroorganizmalarda ekstrasellüler vezikül salınımına dair çalışmalar sınırlıdır.

Ekstremofiller, asidik, tuzcul ve yüksek sıcaklık gibi farklı ekstrem ortamlarda büyüeyebilen mikroorganizmalardır. Ekstremofiller arasında yer alan birçok grubun ürettikleri enzim ve metabolitlerin kullanımı biyoteknolojide önemlidir. Halofiller de biyoteknolojik öneme sahip olup enzim ve metabolit üreten gruplardandır. Halofiller farklı tuz konsantrasyonlarda büyüeyebilen mikroorganizmalardır. Tuzcul ortamlara adaptasyonları ise iki strateji ile açıklanmaktadır; yüksek tuz stratejisi ve düşük tuz, uyumlu organik çözünen stratejisi. Ekstrasellüler veziküllerin, mikroorganizmaların çevreye uyum sağlamalarında, biyofilm oluşumu ve konakçı etkileşimi gibi işlevlerde yer aldıkları gösterilmiştir ancak ekstremofil mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmalarında herhangi bir işleve sahip olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır..

Bu çalışmada halofilik bir bakteri olan *Halomonas caseinilytica* suşundan ekstrasellüler vezikül izole edilip karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda halofil mikroorganizmaların tuzcul ortamlara adaptasyonunda ekstrasellüler veziküllerin işlevine dair bir bulgunun bulunması amaçlanmıştır. Bu kapsamda *H.caseinilytica* farklı tuz konsantrasyonlarında %6-%12-%18 oranlarında tuz içeren MGM ortamlarında büyütülüp ekstrasellüler vezikülleri izole edilmiştir. Fiziksel karakterizasyonu ile beraber veziküllerin proteomik analizleri de yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

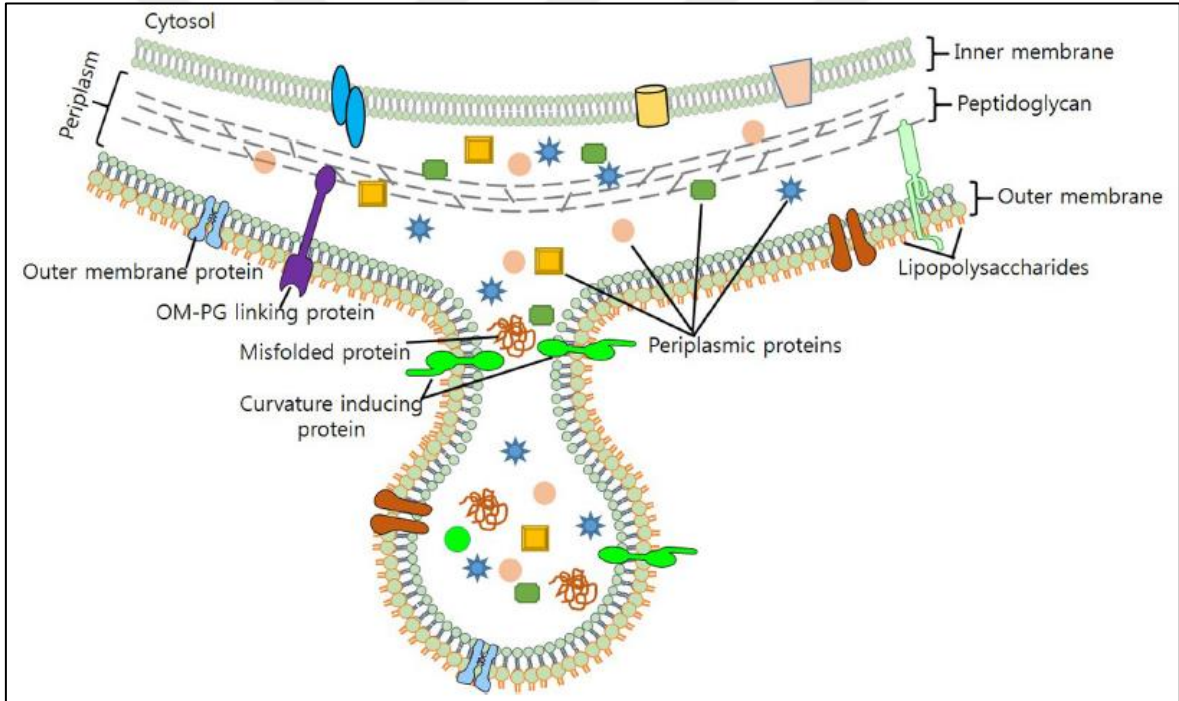
2.1. Ekstrasellüler Veziküller

Ekstrasellüler veziküller (EV) birçok hücre tarafından hücre dışı ortama salınan lipid çift tabakalı nano boyutlu parçacıklardır ve çapları genellikle 20-400 nm aralığındadırlar. (Derkuş vd., 2017). EV'lerin hücre büyümesi ile beraber hücreler tarafından hücre zarından salgılanması yaşamın üç domaininde de çeşitli türler arasında yaygın bir süreçtir. İlk olarak ökaryotlarda tespit edilen bu süreç prokaryot ve bitkilerde de bildirilmiştir. Ökaryot hücrelerinden salgılanan EV'lere eksozom, prokaryot hücrelerinden salgılanan EV'lere ise genellikle membran vezikül denilmektedir. EV'ler nükleik asit ve protein gibi farklı moleküller içermektedirler ve bu şekilde birçok fonksiyonel işlevlerde yer almaktadırlar. Sahip oldukları fonksiyonel işlevler sayesinde biyoteknolojik uygulamalarda önemli potansiyelleri mevcuttur (Cao ve Lin, 2021).

2.1.1. Gram negatif bakterilerde ekstrasellüler veziküller

Gram negatif bakteriler tarafından salgılanan ekstrasellüler veziküller, dış membran vezikül (OMV) olarak adlandırılmaktadır. Dış membran veziküller 30 - 250 nm çap aralığındadır (YashRoy, 2017). OMV'lerin ilk keşfi *Vibrio cholerae*'nin hücre dışı filtratının tavşanlarda bağışıklık tepkisini oluşturmasıyla gözlenmiştir ancak bu tepkinin gram negatif bakteri dış zarlarındaki bileşenlerin immünolojik etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür (De, 1959). Sonrasında yapılan bir çalışmada lizin kısıtlayıcı ortamda üretilen *Escherichia coli* hücrelerinin küresel LPS içerikli salgılar ürettiği gösterilmiştir (Bishop ve Work, 1965) ve bu çalışma ilk vezikül tanımlaması olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın ardından farklı bir çalışmayla da *V. cholerae*'nin dış zarın bükülmesi ile dış zara bağlı veziküller ürettiği bildirilmiştir (Chatterjee ve Das, 1967)

OMV'ler hücrelerin dış zarından türetildiğinden içerdikleri protein, lipid gibi bileşenleri dış zar ile benzerdir. OMV'lerin MS tabanlı proteomik analizler ile farklı işlevlere sahip 3500'den fazla protein tanımlanmıştır (Jan, 2017). OMV'lerde dış zar proteinlerinin dışında sitozolik ve iç zar proteinleri de bulunmuştur. OMV'lerin izolasyonunda yoğunluk gradientli santrifüjleme tekniği kullanılarak bu proteinlerin uzaklaştırılması hedeflenmiştir ancak bu izolasyon adımından sonra dahi sitozolik ve iç zar proteinlerin varlığı giderilememiştir (Kulkarni ve Jagannadham, 2014). Bunun dışında farklı büyüme koşulları ve sürelerinde üretilen OMV'lerin protein profillerinin de farklı olduğu bulunmuştur. OMV'lerdeki protein tür ve sayısının belirlenmesine dair pek çok çalışma olmasına rağmen OMV'lerin protein içeriğinin hangi mekanizmaya bağlı olarak belirlendiği henüz tanımlanamamıştır.

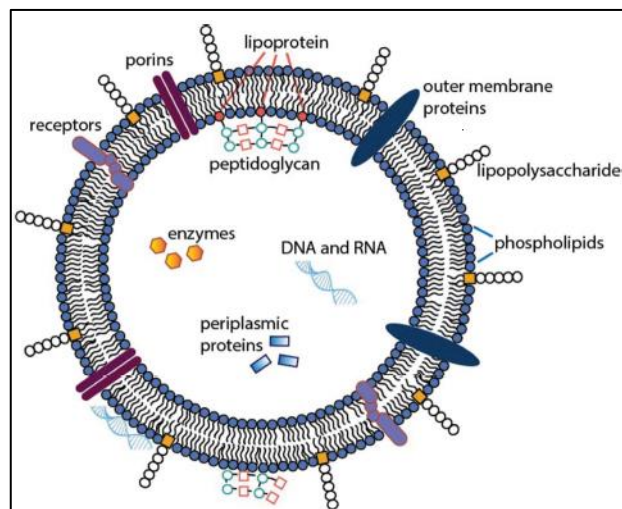


Şekil 2.1. Vezikül yapısının şematik gösterimi (Jan, 2017)

Çizelge 2.1. Gram negatif bakterilere ait veziküllerin protein tanımlama çalışmaları

Kullanılan bakteri	Analiz yöntemi	Referans
<i>Neisseria meningitidis</i>	MALDI-TOF	Ferrari vd., 2006
<i>Pseudomonas syringae</i>	LC-MS/MS	Chowdhury ve Jagannadham, 2013
<i>Acinetobacter baumannii</i>	MALDI-TOF	Mendez vd., 2012
<i>Francisella novicida</i>	MudPIT-MS LC-MS/MS	McCaig vd., 2013 Pierson vd., 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LC-MS/MS	Toyofuku vd., 2012
<i>Myxococcus xanthus</i>	MALDI-MS/MS	Kahnt vd., 2010
<i>Escherichia coli</i>	Nano-LC-ESI-MS/MS	Lee vd., 2007
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1-DE-LC-MS/MS	Lee vd., 2012
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	LC-MS/MS	Nieves vd., 2011
<i>Helicobacter pylori</i>	LC-MS/MS	Mullaney vd., 2009

Protein içeriğinin yanı sıra OMV'lerde nükleik asit varlığı da tespit edilmiştir. İlk olarak parçalanmış hücrelerden gelen DNA fragmentlerinin OMV yüzeyine bağlanabileceği düşünülmüştür fakat OMV'lerin DNAaz ile muamelesi sonucu DNA fragmentlerinin OMV lümeninde yer aldığı kanıtlanmıştır (Kulkarni ve Jagannadham, 2014).



Şekil 2.2. Vezikül içeriğinin şematik gösterimi (Cecil vd., 2019)

OMV biyogenezi gram negatif bakterilerin stres yanıtı olarak kabul edilmektedir. Biyogenez dış zarın dışa doğru eğilmesiyle başlamaktadır. Membranın eğrilğine ve vezikül biyogenezine sebep olan üç strateji sunulmaktadır; (1) Dış zar ile peptidoglikan tabaka arasındaki bağlantı kaybı, (2) Periplazmik boşlukta turgor basıncı oluşması, (3) Membran eğrilği.

İlk strateji periplazmik boşlukta dış zar proteinlerinin birikmesiyle dış zar ve peptidoglikan boşluğunda yer alarak ikisinin bağlantısının kaybolmasına neden olur (Anand ve Chaudhuri, 2016; Kim vd., 2015; M. Li vd., 2020). Bu stratejiye vezikül üreten bakterilerde dış zar proteinlerinin azalması kanıt olarak gösterilmektedir (YashRoy, 2017). Diğer strateji de periplazmik proteinler ve peptidoglikan fragmanlarının periplazmik boşlukta birikmesiyle oluşan turgor basıncının vezikül oluşumuna neden olabileceği varsayılmıştır (J. H. Kim vd., 2015; Li vd., 2020a). Kısa peptidoglikan fragmanlarının sebebi tamamlanamamış biyosentezlerinden kaynaklanmaktadır (Toyofuku vd., 2019). Son olarak fosfolipitlerin biraraya gelmesinin OMV oluşumuna sebep olabileceği varsayılmıştır. Bu varsayımda fosfolipitlerin hidrodobik hacminin hidrofobik zincir uzunluğuna oranı olan paketleme parametresi ile moleküllerin optimal yüzey alanının hesaplanması yer almaktadır. Paketleme parametre değeri yaklaşık 1 ise fosfolipitlerin zardaki yerleşimleri silindirik, 0,5 ila 1 değeri arasında ise konik bir yerleşim olmaktadır. Parametre değerinin 0,5 ila 1 arasında olmasıyla fosfolipitlerin konik yerleşimi membrana eğrilğine sebebiyet vererek vezikül oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Toyofuku vd., 2015).

2.1.2. Gram pozitif bakterilerde ekstrasellüler veziküller

Gram pozitif bakterilerin, gram negatiflerden farklı olarak kalın bir peptidoglikan yapısına sahiptir bu sebeple uzun bir süre gram pozitif bakterilerden vezikül salgılanmasının mümkün olamayacağı düşünülmüştür. Ancak son yıllarda, farklı birçok gram pozitif bakteri türünde vezikül salgılanması gözlenmiştir. Gram pozitif bakterilerin EV'leri membran vezikül olarak (MV) olarak adlandırılmaktadır. Hem gram pozitif bakteri MV'leri hemde gram negatif bakteri OMV'leri mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin alt sınıflarıdır (Cao ve Lin, 2021).

Gram pozitif bakteri üzerinde yapılan çalışmalar ile MV'lerin ortalama çaplarının 10-500 nm aralığında değiştiği bulunmuştur (Bose vd., 2020). Gram pozitif bakterilerden vezikül salgılanması ilk olarak 1990'da Dorward ve Garon tarafından kanıtlanmıştır (Dorward ve Garon, 1990). OMV'ler gibi gram pozitif bakteri MV'leri de protein ve nükleik asitler gibi bileşenler içermektedirler. MV'lerin protein içerikleri salgılandıkları bakterilerin proteinleri ile benzerlik göstermektedir ancak patojenik gram pozitif bakterilerden salgılanan veziküllerde virülans faktörleri çoğunlukta patojenik olmayan gram pozitif bakterilerden salgılanan veziküllerde ise metabolizma ilişkili proteinler çoğunlukta bulunmuştur (Briaud ve Carroll, 2020). Ayrıca MV'lerin fosfolipitler, DNA ve sRNA'ları da içerdiği bildirilmiştir (Yu vd., 2018). OMV'lerde olduğu gibi MV'lerde de vezikül içeriğindeki protein ve nükleik asit bileşenlerinin seçim mekanizması belirlenmemiştir.

MV'lere ait biyogenez modelinde ilk aşama sitoplazmik zarın tomurcuklanmasıdır. Tomurcuklanma sürecinde yer alan faktör olarak lipit farklılıkları gösterilmektedir. Vezikül salınımındaki son adım hücre duvarından geçiştir. Hücre duvarı yapısındaki peptidoglikan tabakası transpeptidazlar ve otolizinler tarafından düzenlenmektedir bu kapsamda MV'lerde yapılan çalışmalarla veziküllerin transpeptidazlar ve otolizinler içerdiği gözlemlenmiştir (Jeon vd., 2017).

2.1.3. Arkelerde ekstrasellüler veziküller

Arkelerde ait ekstrasellüler veziküller genellikle 90-230 nm aralığındadır ve ökaryot eksozomlarına benzer şekilde salgılanmaktadır (Marguet vd., 2013). Arkelerde ekstrasellüler veziküllerin varlığı ilk kez termoasidofilik bir arke olan *Sulfolobus islandicus*'ta bildirilmiştir (Prangishvili vd., 2000). Sonraki çalışmalarla *Thermococcus*, *Sulfolobus* ve *Pyrococcus* sınıfına ait türlerin EV ürettiği tespit edilmiştir (Ellen vd., 2008; Soler vd., 2008; Gaudin vd., 2013). *Thermococcus* suşlarından üretilen EV içeriğindeki DNA'nın, ısı ve enzimsel denatürasyona karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (Soler vd., 2008). Farklı bir çalışmada ise arke EV'lerinin plazmit transferinde rol oynayabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda arke hücresinden üretilen EV'ler ile hücre zarlarındaki protein ve lipit içeriklerinin benzer olduğu görülmüştür bu da EV'lerin hücre zarından kaynaklandığını doğrulamaktadır (Gaudin vd., 2013).

2.1.4. Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin üretiminde etkili faktörler

Ekstrasellüler veziküllerin biyogenez modellerine ek olarak bakterilerin büyüme koşullarındaki faktörler ile EV üretimi arasındaki ilişki de araştırılmış ve belirli stres faktörlerinin vezikül üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu faktörler arasında çevresel faktörler olarak büyüme ortamı, oksidatif stres, pH, sıcaklık ve antibiyotik tedavisi yer almaktadır. Büyüme ortamı önemli faktörlerden biridir. Yapılan bir çalışmada büyüme ortamının karbon ve azot açısından zenginleştirilmesiyle *N. meningitidis*'de EV üretiminin arttığı görülmüştür (Santos vd., 2012). Benzer şekilde gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes* bakterisinin asidik ve tuzlu ortamda vezikül üretimini, normal şartlara göre, arttırdığı tespit edilmiştir (Jun vd., 2019).

Oksidatif stres etkisinin tespiti için *Pseudomonas aeruginosa* üzerine öldürücü olmayan hidrojen peroksit uygulanmasıyla serbest radikale bağlı oksidatif stres oluşturulmuş ve sonucunda EV üretiminde bir artış gözlemlenmiştir (MacDonald ve Kuehn, 2013). Çevresel pH değişikliklerine karşı vezikül üretimi, bakterinin membrana bütünlüğünü korumak için gösterdiği bir strateji olabilir (Mozaheb ve Mingeot-Leclercq, 2020). Bu kapsamda yapılan bir çalışmada *Francisella tularensis*, pH'ı 4 ile 7 aralığında değişen ortamlarda geliştirilmiş ve vezikül üretimleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak pH 4.8'in altında bakteri gelişimi dahi görülmemiş, en yüksek vezikül üretiminin ise pH 5.3' te gözlemlenmiştir (Klimentova vd., 2019). Vezikül biyogenezinde yer alan modellerden biri yanlış katlanmış protein ve peptidoglikan parçalarının uzaklaştırılması için vezikül salınımı olduğudur. Vezikül üretiminde sıcaklık etkisine bakıldığında ısı şoku, proteinlerin denatürasyonuna ve bu proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla da vezikül oluşumunun tetiklenmesine yol açar (Klimentová ve Stulík, 2015). Örnek olarak *Bordetella* türlerinde yapılan çalışmada ısı şoku uygulandıktan sonra EV üretiminde artış gözlemlenmiştir (De Jonge vd., 2021). Veziküllerin, bakterileri antibiyotiklere karşı koruduğu ve antibiyotik direncinde rol oynadıkları bilinmektedir (Uddin vd., 2020). Gentamisine duyarlı bir *E. coli* suşunun artan antibiyotik konsantrasyonu ile vezikül üretimini de arttırdığı gözlemlenmiştir (Chan vd., 2017). Aynı şekilde trimetoprim ve streptomisine duyarlı *L. monocytogenes* suşlarının antibiyotikli ortamda geliştirilmesi sonucu vezikül üretimlerinde artış gözlemlenmiştir (Karthikeyan vd., 2020).

Çevresel faktörler dışında genetik modifikasyonların da EV üretimindeki etkileri araştırılmıştır. Genetik modifikasyonlar uygulanarak elde edilen veziküller, membrana antijenleri için genelleştirilmiş modülleri olarak isimlendirilirler (Micoli vd., 2020). Bunlar aşılı üretiminde veziküllerin kullanım verimliliğini artırmak için bir strateji olabilir (Zhu vd., 2021). Vezikül biyogenez modeli kapsamında dış ve iç zar arasındaki bağlantısının zayıflatılmasıyla vezikül miktarı artırabilir. Bu model üzerine yapılan bir çalışmada hücre zarları bağlantısında yer alan *rmpM* geninin, *N.meningitidis* hücrelerinde silinmesiyle vezikül üretiminde artış olduğu bildirilmiştir (van de Waterbeemd vd., 2010). Benzer şekilde gram pozitif bakterilerin peptidoglikan yapılarının bozunması vezikül salınımında önemlidir. *Staphylococcus aureus*'da, peptidoglikan yapısında çapraz bağlayıcı olarak görev alan penisilin bağlayıcı protein üzerinde yapılan mutasyon sonucunda vezikül üretiminde artış olduğu gözlemlenmiştir (Wang vd., 2018).

2.2. Mikrobiyal Ekstrasellüler Veziküllerin Fonksiyonları

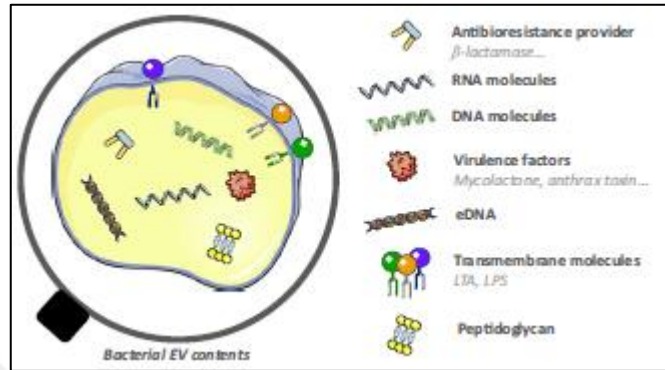
Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin içerdikleri biyomoleküllerin seçim mekanizması henüz belirlenmemiş olsa da içerdikleri biyomoleküller ile salgılandıkları bakteri hücrelerinin çevreye uyum, enfekte etme gibi birçok fonksiyonel işlevinde yer almaktadırlar. Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin yer aldığı gösterilmiş olan fonksiyonlar alt başlıklarda özetlenmiştir.

2.2.1. Taşıma sistemi olarak mikrobiyal ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin taşıdıkları biyomoleküller ile bakterilerin ilişkilerinde yer almaktadırlar (Rueter ve Bielaszewska, 2020). Mikrobiyal EV'lerin taşıma sistemi olarak kullanılmasının var olan taşıma sistemlerine göre avantajları mevcuttur (Guerrero-Mandujano vd., 2017).

EV'ler yapısal özellikleri sayesinde taşıdıkları biyomolekülleri litik enzimlerden korurlar böylece EV'ler diğer taşıma sistemlerine göre molekülleri daha uzun mesafelere ulaşabilmektedirler. Aynı zamanda, EV'ler birden fazla ve çeşitte molekülü taşıyabilmektedirler (Guerrero-Mandujano vd., 2017 ; Lima vd., 2020).

Diğer bir avantajı ise lipitleri ve hidrofobik çözünmeyen proteinlerin taşınabilmesidir. Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*'dan salgılanan EV'lerin PQS (*Pseudomonas* kinolon sinyali) taşıdığı bildirilmiştir (Mashburn ve Whiteley, 2005).



Şekil 2.3. Veziküllerin biyomolekülleri taşınmasının şematik gösterimi (Dagnelie vd., 2020)

2.2.2. Biyofilm oluşumunda ekstrasellüler veziküller

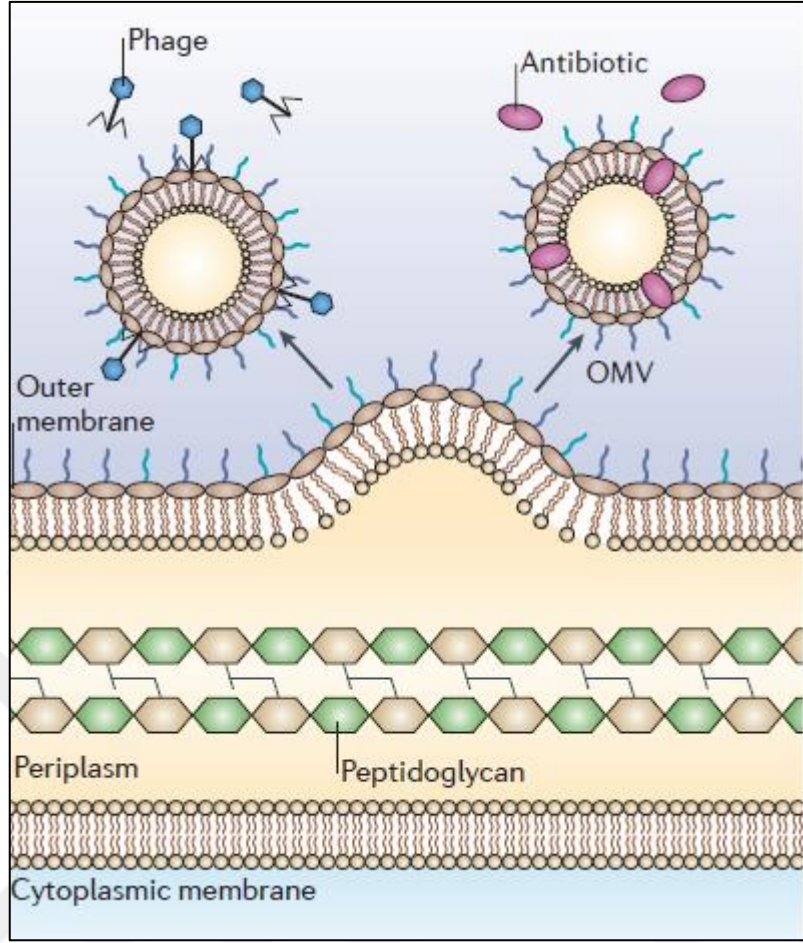
Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller hücreler arası etkileşim ve besin iletiminde yer alarak biyofilm oluşumuna katkı sağlamaktadır (Begić ve Josić, 2020; Cao ve Lin, 2021). Bir çalışmada besinsel kısıtlama durumunda *Porphyromonas gingivalis* tarafından salgılanan EV'lerde biyofilm oluşumuna katkı sağlayan Heme proteini tespit edilmiştir (Olczak vd., 2010). *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm oluşumunda yer alan PQS sinyali hücreler arasında EV'ler ile taşınarak hücre yüzeyinin hidrofobikliğini artırıp biyofilm oluşumunu sağlamaktadırlar (Begić ve Josić, 2020). Ayrıca biyofilm oluşturan bakterilerden salgılanan EV'lerin biyofilm oluşturmeyen bakterilerde de biyofilm oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (Wu vd., 2020; Seike vd., 2021). Aynı zamanda EV'lerin biyofilm yüzeylerinde dağılıp bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Cao ve Lin, 2021).

2.2.3. Antibiyotik dirençliliğinde ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller farklı şekillerde antibiyotik dirençliliğinde yer almaktadırlar (Uddin vd., 2020). İlk olarak enzimler taşıyarak antibiyotik dirençliliği sağlarlar. Örneğin; *Staphylococcus aureus* EV'lerinin β -laktamaz ve *Bacillus subtilis* EV'lerinin ise sublosine direnç sağlayan SunI proteinini içerdiği bulunmuştur (Dubois vd., 2009; Lee vd., 2013). Antibiyotiğe direnç sağlamadaki bir diğer yol EV'lerin ilaç bağlayıcı proteinleri içermesidir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın EV'lerinde ve oluşturdukları biyofilm yapısından izole edilmiş EV'lerinde ilaç bağlayıcı proteinlerin yüksek konsantrasyonda olduğu bulunmuştur (Park vd., 2014). EV'lerin antibiyotik dirençliliği sağlamasındaki son yol EV'lerin antibiyotikleri hücre dışında bağlamasıdır (Chattopadhyay ve Jaganandham, 2015). Yapılan bir çalışma da *Pseudomonas syringae* üzerinde etkili olan molistin ve melitin antibiyotiklerinin, kültür ortamına bakterinin kendisinden izole edilmiş EV'ler eklendiğinde antibiyotiklerin etkilerini gösteremedikleri tespit edilmiştir (Kulkarni vd., 2014).

2.2.4. Faj enfeksiyonu engellenmesinde ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller bakterileri faj enfeksiyonlarından koruyabilmektedirler. EV'ler bakterilerin dış zarından türetildiklerinden bakterilerle benzer yüzey yapılarına sahiptir. Bakteri dış zarından dışarıya salgılanan EV'lerin yüzeylerine faj reseptörleri proteinler aracılığıyla bağlanarak, fajların bakteri yüzeyine bağlanması engellenmektedir (Azam ve Tanji, 2019). *Escherichia coli* üzerinde yapılan bir çalışmada T4 bakteriyofaj ile enfeksiyonunda kültür ortamına saflaştırılmış EV'ler eklenerek, fajların geri dönüşümsüz olarak EV'lere bağlanması gözlenmiştir ve bakteri enfeksiyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Manning ve Kuehn, 2011).



Şekil 2.4. Veziküllerin salgılandıkları bakteri hücrelerini antibiyotiklere ve faj enfeksiyonuna karşı savunmasının şematik gösterimi (Schwechheimer ve Kuehn, 2015)

2.2.5. Mikrobiyota korunmasında ekstrasellüler veziküller

Bağırsak florasında bulunan bakteriler mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Mikrobiyota bakterileri tarafından da EV'lerin üretildiği bilinmektedir (Villard vd., 2020). EV'lerin mikrobiyota düzenlenmesinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur. Akkermansia muciphila'dan salgılanan EV'lerin inflamatuvar bağırsak hastalığına karşı mikrobiyota düzenini koruduğu (Kang vd., 2013) ve de bağlantı işlevini ve glikoz toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir (Chelakkot vd., 2018).

2.2.6. Gen aktarımında ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerde kromozomal ve plazmid DNA'lar bulunmuştur (Ho vd., 2015; Domingues ve Nielsen, 2017; Gröll vd., 2018; Tran ve Boedicker, 2019). EV'ler taşıdıkları nükleik asitleri ısı ve enzimsel denatürasyonlara karşı korumaktadır (Soler vd., 2008). Şu ana kadar bilinen gen aktarım mekanizmalarına (konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon) ek olarak EV'ler aracılığıyla gen aktarımı tanımlanmıştır. *Acinobacter baylyi* suşları arasında EV aracılı plazmid DNA aktarımı başarılı bir şekilde gözlenmiştir (Tran ve Boedicker, 2019).

Aynı zamanda EV'ler ile gen aktarımında yer alacak DNA özelliklerinin etkisi olduğu düşünülmüştür. Bu kapsamda yapılan çalışma da farklı plazmid kümeleri oluşturulmuştur. Plazmid kopya sayısı ve plazmid boyutu etkisi araştırılmıştır. EV'ler ile gen aktarım başarısının plazmid içeren vezikül sayısı ile doğru orantıda, plazmid kopya sayısı ile de ters orantıda olduğu bulunmuştur (Tran ve Boedicker, 2019; Bose vd., 2020).

2.2.7. Hücreler ile etkileşimde ekstrasellüler veziküller

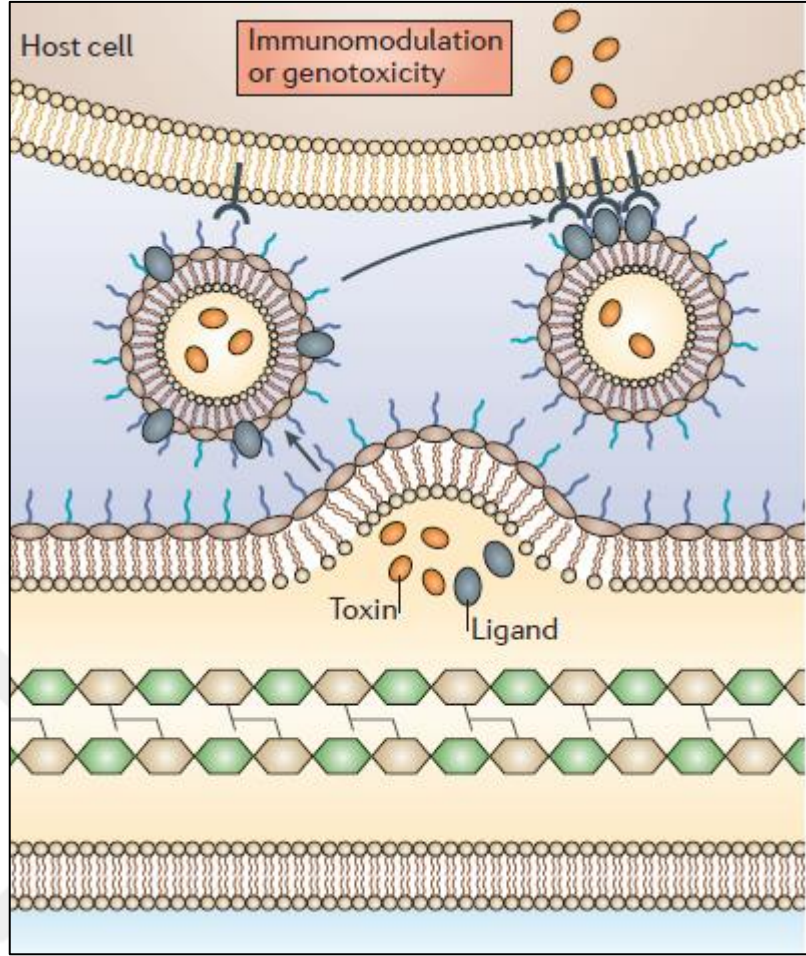
Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller prokaryot, ökaryot ve bitkilerle etkileşime girebilmektedir. EV'ler içeriğinde bulunan toksinler ve proteinler gibi biyomoleküller oluşacak olan etkileşimi yönlendirir (Yáñez-Mó vd., 2015; Toyofuku vd., 2017). Bazı bakteri EV'lerinin büyüme ortamında diğer bakteri türlerini öldüren toksinler içerdiği gösterilmiştir (Caruana ve Walper, 2020). EV'lerin hücrelere giriş yolları farklılık göstermektedir (O'Donoghue ve Krachler, 2016; Cai vd., 2018).

EV'lerin hücrelere giriş yollarından biri makropinositozdur. Makropinositoz, aktin kaynaklı çıkıntı oluşumuyla karakterizedir. *Pseudomonas aeruginosa* EV'lerinin epitel hücrelerine girişinde aktin polimerizasyonu inhibe edilmiş ve hücrelere girişin azaldığı gözlemlenmiştir (O'Donoghue ve Krachler, 2016). Hücrelere girişte farklı bir yol olarak hücre yüzey reseptörlerinin yer aldığı kltrin aracılı endositozdur. Yapılan çalışmalar ile kltrin aracılı endositozun EV'lerin hücre girişinde kullanılabilirliği gösterilmiştir (Parker vd., 2010). Ayrıca lipit salınımı aracılı endositoz yolu da EV'lerin hücrelere girişinde yer almaktadır. Bu yolun kullanıldığına dair *Haemophilus influenza* EV'leri üzerinde çalışma yapılmıştır (Sharpe vd., 2011).

Membran füzyonu da EV'lerin hücelere girişinde var olan diğer bir mekanizmadır. Membran füzyonunun genellikle yoğun lipit sal bölgelerinde gerçekleştiği gösterilmiştir. Çalışmalarda boya etiketleme tekniği kullanılarak hücre membranı üzerine EV membranın füzyonuyla hücre membranı alanında artış tespit edilmiştir (Rompikuntal vd., 2012; Jäger vd., 2015).

2.2.8. Patogeneizde ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller toksinler ve virülans faktörleri taşıyarak patogeneizde yer alabilmektedir. EV'ler birden fazla toksin ve virülans faktörlerini aynı anda taşıyabildiklerinden ve de taşıdıkları bileşenleri konakçı bağışıklık sisteminden korudukları için patogeneizde avantajlıdır (Haurat vd., 2015). *Bordetella pertussis* EV'lerinde adenilat siklaz toksini tespit edilmiştir ve konak hücrede cAMP seviyesinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Crowley vd., 2013). *Listeria monocytogenes* EV'lerinde virülans faktörü olan listeriolysin O; *Streptococcus pneumonia* EV'lerinde ise pnömolozin varlığı bildirilmiştir (Olaya-Abril vd., 2014; Bose vd., 2020). EV'ler konakçıya virülans faktörleri ve toksinler taşımanın yanında bu bileşenleri konakçı bağışıklığından kaçırarak da patogeneze katkı sağlarlar (Kuipers vd., 2018). *Neisseria gonorrhoeae* EV'lerinin patojeni konakçı bağışıklığından korunması için konakçı mitokondriyal membrana yapısını bozan porin proteini (PorB) içerdiği bildirilmiştir (Kunsmann vd., 2015). Aynı şekilde *Porphyromonas gingivalis* EV'lerinde de konakçı bağışıklık yapısını etkileyen peptidil arginin deiminaz (PPAD) enzimini içerdiği bildirilmiştir (Bielecka vd., 2014).



Şekil 2.5. Bakteri patogenezinde veziküllerin kullanımı (Schwechheimer ve Kuehn, 2015)

2.2.9. İmmün modülasyonunda ekstrasellüler veziküller

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller sinyal yollarını hedefleyen, bağışıklık tepkisi oluşturabilecek molekülleri taşıyabilmektedir. EV'ler konakçı hücre yüzeyine yapıştığında hücre zarı reseptörleri, hücre içi sinyalleşmeyi başlatır. EV'lerin türetildikleri bakteri türüne göre içerdikleri moleküller ve yapısal özellikleri farklı olduğundan oluşturacakları immün modülatör etkileri de farklı olabilmektedir (Cheng vd., 2020; Mancini vd., 2020; Munhoz da Rocha vd., 2020).

Ekstrasellüler mukozal kısımda immünoglobulin üretimini tetikler ve EV antijenleri, antijen taşıma hücreleri tarafından aktarılarak antijen hücre yanıtları oluşturur. Örnek bir çalışmada *Neisseria meningitidis* EV'leri nötrofil ve makrofajları uyararak interlökin (IL) üretimini sağlamıştır (Tavano vd., 2009).

Benzer şekilde *Moraxella catarrhalis* EV'lerinin IL-6; *Salmonella sp.* EV'lerinin TNF ve IL-12; *Streptococcus suis* EV'lerinin proinflamatuvar sitokinleri; *Clostridium perfringens* EV'lerinin inflamatuvar sitokinleri ve TNF- α ve *Staphylococcus aureus* EV'lerinin ise IL-6 ve IL-8 üretimini tetiklediği bildirilmiştir (Alaniz vd., 2007; Vidakovic vd., 2010; Jiang vd., 2014; Qin vd., 2020; Wang vd., 2020). Ayrıca in vivo model üzerinde de *Helicobacter pylori* EV'lerinin CXCL2 ekspresyonunda artış sağladığı gösterilmiştir (Kaparakis vd., 2010).

2.3. Mikrobiyal Ekstrasellüler Veziküllerin Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanımı

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin yer aldıkları fonksiyonel süreçler ve içerdikleri biyomoleküllerin tespit edilmesiyle birlikte EV'lerin biyoteknolojik uygulamalardaki kullanımına dair çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalar sağlık alanında kanser tedavisi, aşı geliştirilmesi ve ilaç taşıma sistemi geliştirilmesi şeklinde olup, gıda alanı kapsamında da çalışmalar mevcuttur.

2.3.1. Aşı platformu olarak ekstrasellüler veziküllerin kullanımı

Ekstrasellüler veziküllerin aşı olarak kullanımı ilk kez *Neisseria meningitidis* veziküllerinde çalışılmıştır (Acevedo vd., 2014). *Neisseria meningitidis* serogrup B tipine karşı geliştirilen aşı ürünleri Çizelge 2.3' de verilmiştir. EV'ler bakteri dış zarlarında türetildiklerinden doğal olarak bakteriyel yüzey antijenlerine sahiptirler. İmmün sistemdeki etkilerinden dolayı EV'lerin aşı malzemesi olarak kullanımını güçlendirmektedir. Aynı zamanda farklı bakterilere ait EV'lerin büyüme koşulları gibi çevresel faktörlere göre farklı içeriklere sahip olması kullanılacak olan EV'lerin tasarlanabilir bir ajan olmasını sağlayabilir (Qin vd., 2020).

Çizelge 2.2. Veziküllerin kullanıldığı *N.meningitidis* serogrup B'ye karşı geliştirilen aşılar

Aşı ismi	Açıklama	Referans
VA-MENGOC-BC®	Küba – Finlay Enstitüsü tarafından salgına karşı B4 (B:4:P1.19,15) suş tipi kullanılarak geliştirilmiştir. 1987-1989 yılları arasında test edilmiştir.	(Sierra vd., 1991)
MenBvac®	Norveç Halk Sağlığı Entitüsü tarafından salgına karşı B15 (B:15:P1.7,16 44/76-SL) suş tipi kullanılarak geliştirilmiştir. 1988-1991 yılları arasında test edilmiştir.	(Rosenqvist vd., 1995)
MeNZB®	Yeni Zelanda – Auckland Üniversitesi ve Dünya Sağlık Örgütü ortak projesi olarak B4 (B:4:P1.7-2) suş tipi kullanılarak geliştirilmiştir. 2004-2008 yılları arasında test edilmiştir.	(Arnold vd., 2011)
Bexsero®	Novartis tarafından B4 (B:4:P1.7-2,4:ST-42 (cc41/44)) suş tipi kullanılarak geliştirilmiştir. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından lisans alınmıştır.	(Bai vd., 2011)

Aşı olarak EV'lerin kullanılmasındaki güvenlik sorunu gram negatif bakterilerden izole edilmiş EV'lerde LPS'lerin varlığıdır (van de Waterbeemd vd., 2010). Buna çözüm olarak da LPS uzaklaştırılması ve EV izolasyonunda deterjan kullanımı yer almaktadır. Serogrup B'nin meningokok hastalığının tedavisinde yabancı tip EV aşıları kullanılmış ve başarılı etki gözlenmiştir (Holst vd., 2009). Sonraki yapılan çalışmalarla LPS varlığı bakteri üzerinde yapılan mutasyonlar ile azaltılmış ve vezikül içerikli aşılarda geliştirilmesi için genetik mühendisliğinin kullanımını teşvik etmiştir (van der Pol vd., 2015). LPS varlığının giderilmesine ek olarak farklı antijenleri vezikül içinde bir birarada kullanılarak ve de ek antijenlerin OMV yüzeyine ekleyerek vezikül içerikli konjuge aşılarda oluşturmak için önemli bir strateji oluşturmaktadır (Gerritzen vd., 2017).

2.3.2. İlaç taşıyıcı sistem olarak ekstrasellüler veziküllerin kullanımı

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin farklı işlevlerde ve türde biyomolekülleri taşıması, EV'lerin biyoteknolojik uygulamalarda taşıyıcı nanosistemler olarak kullanımına dikkat çekmiştir. EV'lerin taşıma sistemi olarak kullanılmasının belirli avantajları vardır. İlk avantaj olarak polimerik ve lipozomal taşıyıcılarda görülen dolaşım sırasındaki bozunma durumuna karşın EV'ler stabil formdadır (Zhang vd., 2019). Başlık 2.2.8'de özetlendiği üzere EV'ler konakçı bağışıklık sisteminden içerdiği molekülleri koruyabilmektedir. Aynı zamanda immün modülasyonundaki işlevi sayesinde patojen ilişkili antijenlerin salgılanması için bağışıklık sistemini uyarır. Son olarak da EV'ler genetik mühendisliği ile amaca göre modifiye edilebilir (Chen vd., 2020; Huang vd., 2020).

Avantajlarının yanı sıra tıpkı aşı olarak kullanılmasında karşılaşılan dezavantajlar gibi EV'lerin türetildikleri bakterilerin toksik bileşenlerini içerebilir. Bu sorunlar için patojenik olmayan bir bakteri EV'si kullanılabilir veya genetik mühendisliği stratejileri uygulanarak toksik bileşiklerin giderilmesidir. Yapılan bir çalışmada toksik bileşiklerin giderilmesi sağlanıp EV'lerin fare modellerine uygulanmasıyla bu yöntemlerin geçerliliği gösterilmiştir (Li vd., 2020a). EV'ler ile ilaç taşımaya örnek olarak, *Klebsiella pneumoniae* endotoksin içermeyen EV'leri Doksorubisin yüklenerek akciğer kanser hücrelerine uygulanması incelenmiştir ve EV'lerin ilacı hücrelere verimli şekilde iletmediği bildirilmiştir (Kuerban vd., 2020).

2.3.3. Kanser terapisinde ekstrasellüler veziküllerin kullanımı

Mikrobiyal ekstrasellüler veziküller lokal bağışıklığı tetiklemek üzere tümör dokuları etrafında birikme özelliği taşıyan yapılardır (Gujrati vd., 2019). EV'ler kullanılarak immünoterapi çalışıldığında, EV'lerin tümör çevresinde IFN-y üreterek anti-tümör etkiye katkı sağladığı gösterilmiştir (Kim vd., 2017). Anti-tümör immün aktivitelerinin yanında tümörlerin metastazını önlemede terapötiklerin artırma amacıyla EV'ler ile çalışmalar yapılmıştır.

Bir çalışmada *Salmonella typhimurium* EV'lerinin kemoterapötik ilaçlara göre yüksek anti-tümör aktivite göstermiştir ve ilaçlarla EV'lerin birlikte kullanımında ise tümör hacminde azalma ve tümör büyümesinde engellenme olduğu gösterilmiştir (Go vd., 2019).

Genetik mühendisliği ile EV'lerde yapılan modifikasyonlar ile kanser terapisi üzerine stratejiler çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada tümör hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini modüle eden PD-1 molekülünün EV'lere eklenmesi sağlanmıştır. İn vivo model üzerinde bağışıklık sistemi indüklenmiştir ve tümör hacminde azalma gözlenmiştir (Li vd., 2020). Benzer strateji ile tümör anjiyogenezinde rol alan temel fibroblast büyüme (BFGF) faktörüne karşı anti-büyüme faktörlerinin üretiminin EV'ler ile sağlanması amaçlanmıştır. Bunun için rekombinant teknoloji kullanılarak *E.coli* EV'lerinde BFGF üretilmiştir. BFGF taşıyan EV'ler farelere uygulandığında anti-BFGF üretimini uyarmıştır ve tümör baskılayıcı etki bildirilmiştir (Huang vd., 2020).

2.3.4. Farklı sektörlerde ekstrasellüler veziküllerin kullanımı

Sağlık sektörü dışında farklı sektörlerde EV'lerin uygulamalarına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Gıda sektöründe vezikül kullanımına dair bir çalışma konserve gıda üzerinedir. Ton balığı ürünlerinde kontaminasyona sebep olan *Shewanella putrefaciens* karşı bakteriyosin salgılayan *Lactobacillus plantarum*'dan EV'ler izole edilmiştir ve ton balığı numuneleri EV'lerle kaplanmıştır. Saklama süresi sonunda kalite ve antimikrobiyal testleri yapılmıştır ve sonuç olarak EV'lerin antibakteriyel etki gösterdiği gıda depolanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir (Lee vd., 2020).

Tarım sektöründe de EV'lerin uygulanması araştırılmıştır. Bitkiler üzerinde patojen etkisi olan *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas fluorescens*'den izole edilen EV'ler, *Arabidopsis thaliana* yaprakları ile inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresince de patojenik bakteri uygulanmıştır. Böylece patojen bakteri antijenleri taşıyan EV'lerin bitkide bağışıklığı indüklemesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda EV'lerin bitkilerde koruyucu etkisi gösterilmiştir (McMillan vd., 2021).

2.4. Halofilik Mikroorganizmalar

Yüksek sıcaklık, yüksek pH, yüksek asidik ve yüksek tuz gibi ekstrem koşullarda yaşayabilen canlılara 'ekstremofiller' olarak adlandırılmaktadır (Cowan vd., 2015). Yüksek tuz miktarı içeren çevrelerde yaşayabilen canlılar 'halofiller' olarak tanımlanmaktadır (Horikoshi ve Grat, 1998). Halofil mikroorganizmalar tolere edebildikleri tuz konsantrasyonlarına göre gruplara ayrılmaktadırlar; NaCl konsantrasyonu 0,2 ila 0,5 molar arasında büyüeyebilenlere 'hafif halofiller', 0,5 ila 2 molar arasında büyüeyebilenlere 'orta halofiller', 2 ila 5 molar arasında büyüeyebilenlere 'aşırı halofiller' ve tuzlu ortam varlığında veya yokluğunda büyüeyebilen mikroorganizmalara da 'halotolerant' olarak tanımlanmaktadır (Kushner, 1985; Ventosa, 1998).

Halofilik mikroorganizmaların ilk keşfi milattan önce 2700'lere kadar uzanmaktadır (Bass-Becking, 1931). 1920-1940 yılları arasında hayvan postu ve balık yüzeylelerinden halofilik mikroorganizmalar keşfedilmiştir (Baumgartner, 1937). 1983'te Büyük Tuz gölü çevresinden halofilik bakteri olan *Halanaerobium praevalens* izole edilip tanımlanmıştır (Zeikus vd., 1983). 1984 yılında ise Ölü Deniz sedimentlerinden *Halobacteriodies halobius* izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Ören vd., 1984).

2.4.1. Halofilik mikroorganizmaların adaptasyon stratejileri

Yüksek tuzlu ortamlarda dış ortam ile hücrelerin içi arasındaki yük konsantrasyon farkından dolayı hücrelerin patlaması (ozmoz) gerçekleşir. Halofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında hücre içinin izotonik olarak kalmasını sağlayabilmek için kullandığı adaptasyon stratejileri mevcuttur. İlk strateji, yüksek tuz stratejisidir. Bu strateji, hücre içinde potasyum iyonlarının birikimi ile dış ortama göre iyon yükü dengesi içermektedir. Potasyum iyonları dış çevreden hücre içine pompalanarak, hücre içi tuz konsantrasyonu hücre dışı tuz konsantrasyonundan yüksek olması sağlanmaktadır (Edbeib vd., 2016). İkinci adaptasyon stratejisi ise uyumlu organik çözünen (ozmolit) birikimidir. Ozmolitlerin hücre içinde birikmesiyle mikroorganizmanın tuzlu ortamlara göre hücre içi konsantrasyonunun yüksek kalması sağlanmaktadır. Ozmolitlerin birikim seviyesi moleküler düzeyde incelenmiş ve ozmolit konsantrasyonlarının, hücre dışı tuz konsantrasyonuna göre belirlendiği bildirilmiştir (Canovas, 1996).

Tuzlu ortamlara adaptasyonda halofilik mikroorganizmaların bazıları yüksek tuz stratejisini, bazıları uyumlu organik çözünen birikim stratejisini, bazıları ise ikisini birden kullanmaktadır. Bu stratejilerin yanında protein modifikasyonu da tuzlu ortama adaptasyonda önemli bir faktördür. Halofilik ve halofilik olmayan mikroorganizmalardan izole edilen proteinler karşılaştırıldığında, halofilik mikroorganizmalara ait proteinlerinin yüzeylerinde yüksek oranda glutamat ve aspartat bulunmuştur (Zhang ve Yi, 2013 ; Edbeib vd., 2016).

2.4.2. Halofilik mikroorganizmalarda ekstrasellüler vezikül çalışmaları

Birçok mikroorganizma türünün ekstrasellüler veziküller ürettiği ve üretilen veziküllerin de mikroorganizma fonksiyonlarında yer aldığı bildirilmiştir. Ekstrasellüler veziküller ürettiği bildirilen mikroorganizmalar içerisinde halofilik mikroorganizmalarda mevcuttur ancak çalışmalar çok az sayıdadır. Halofil mikroorganizmalarda EV üretimine dair çalışmalar aşağıda özetlenmiştir;

Halofilik mikroorganizmalar arasında yer alan *Vibrio vulnificus* tarafından EV'ler üretildiği tespit edilmiştir ve EV'lerin *V.vulnificus* tarafından salgılanan sitolizin-hemolizin sitotoksini konakçı epitel hücrelerine taşıdığı bildirilmiştir (Kim vd., 2010). Gram negatif halofilik bir deniz bakterisi olan *Novosphingobium pentaromativorans*'ın EV ürettiği bildirilmiştir. Ürettikleri EV'nin karakterizasyonu sonucu ve 25-70 nm çap aralığında olduğu ve içerdiği proteinlerin bakteri dış zar proteinlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Yun vd., 2017). Farklı bir çalışmada da *Novosphingobium sp.* 'den EV'ler izole edilmiştir ve proteomik analizleri yapılmıştır. Ayrıca veziküllerin HaCaT (keratinosit hücre hattı) üzerine sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (De Lise vd., 2019). Son olarak bir *Haloarcheon*'dan EV izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen EV'lerin PR1SE plazmiti taşıdığı ve de plazmit içermeyen hücrelere aktarımını sağlayarak plazmit içerikli hücre sayısını artırdığı bildirilmiştir (Erdmann vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar

Bio-Rad' dan temin edilen ticari %30'luk Akrilamid/bisakrilamid (29:1) solüsyonu kullanılmıştır (Bio-Rad Cat.161-0156)

Protein miktarlarının belirlenmesi için ticari BCA test kiti (BCA kit-Thermo Scientific -23227) kullanılmıştır.

Kütle spektrometresinde yıkama çözeltisi olarak ticari Sep-Pak (Waters) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan laboratuvar cihazları

Kullanılan Cihazlar	Marka-Model
Etüv	Binder – ED 23
Çalkamalı İnkübatör	Lab Companion - SI 600R
Hassas Terazi	Ohaus – Adventurer Pro AV2640
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph - MR 3001
Santrifüj	Beckman-Coulter - Allegra X-30
Ultrasantrifüj	Hitachi - CP100WX
Elektron Mikroskobu	Joel, USA - JEM 2100-F
Saf Su Cihazı	Mes Mp Multipure
Kütle Spektrometresi	Thermo Scientific - Q Exactive Orbitrap
Otoklav	Hırayama – Hıclave HG-80
Elektroforez Güç Kaynağı	Cleaver Scientific

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan halofilik bakterinin stok kültürünün canlandırılması için %12 tuz içeren MGM besiyeri, pasajlanması için ise %12 tuz içeren MGM agar besiyeri kullanılmıştır ve bakterinin farklı tuz konsantrasyonlarında ki üretimlerini incelemek için %6 ve %18 tuz içeren MGM besiyerleri kullanılmıştır. Mezofil bakterinin stok kültürünün pasajlanması için Nutrient agar besiyeri, canlandırılması için ise Nutrient broth besiyeri kullanılmıştır.

% 6 tuz içeren MGM besiyeri (g/L)

%30'luk tuz çözeltisi	200 mL
Pepton	1 g
Maya özütü	1 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

% 12 tuz içeren MGM besiyeri (g/L)

%30'luk tuz çözeltisi	400 mL
Pepton	1 g
Maya özütü	1 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

%12 tuz içeren MGM agar besiyeri (g/L)

%30'luk tuz çözeltisi	400 mL
Pepton	1 g
Maya özütü	1 g
Agar	20 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

%18 tuz içeren MGM besiyeri (g/L)

%30'luk tuz çözeltisi	200 mL
Pepton	1 g
Maya özütü	1 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

Nutrient broth besiyeri (g/L)

Et ekstraktı	1 g
Pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Maya özütü	2 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

Nutrient agar besiyeri (g/L)

Et ekstraktı	1 g
Pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Maya özütü	2 g
Agar	15 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tamponlar**%30 Tuz Çözeltisi (g/L)**

NaCl	240 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	35 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	30 g
NaBr	0,8 g

NaHCO ₃	0,2 g
KCl	7 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C’de 15 dakika süreyle sterilizasyonu sağlanmıştır.

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) Tamponu

27,2 g Tris base 100 mL saf suda çözülmüştür. HCl ile pH 8.8’e ayarlanmış ve 150 mL saf su ile tamamlanmıştır.

1 M Tris-HCl (pH 6.8) Tamponu

12,1 g Tris base 80 mL saf suda çözülmüştür. HCl ile pH 6.8’e ayarlanmış ve 100 mL saf su ile tamamlanmıştır.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi

5 g Sodyum dodesil sülfat 50 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır.

%20 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi

10 g Sodyum dodesil sülfat 50 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır.

%10 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi

0.1 g Amonyum persülfat 1 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır.

6X Denatürasyon Boya Çözeltisi

0.5 M Tris HCl (pH 6.8)	1 mL
Gliserol	0,8 mL
%20 SDS	0,8 mL
β-Merkaptoetanol	0,4 mL
Bromfenol mavisi	0,005 g

Saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

5X Yürütme Tamponu

Tris Base	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g

1 litre saf suda çözünmüştür. Kullanım için 1X hacime seyreltilmiştir.

Jel Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Mavisi	0,1 g
Metanol	40 mL
Glasiyal Asetik Asit	10 mL

Saf su ile 100 mL tamamlanmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi

Metanol	50 mL
Glasiyal Asetik Asit	70 mL

Saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g

Saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH 7 olacak şekilde ayarlanmıştır.

% 4 Paraformaldehit çözeltisi

40 g paraformaldehit 800 mL PBS içinde çözülmüştür ve 60 °C' de homojen olana kadar karıştırılır. Homojenite sağlandıktan sonra PBS ile 1 litreye tamamlanmıştır.

% 0,5 Üranil asetat çözeltisi

0,5 g üranil asetat 100 ml saf su içinde çözülmüştür ve 0,2 µm' lik filtreden geçirilmiştir.

3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında mikrobiyal vezikül izolasyonu için halofilik bir bakteri olan *Halomonas caseinilytica* KB2 (KF668253.1) suşu kullanılmıştır. Mezofilik kontrol grubu olarak ise *Escherichia coli* suşu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların geliştirilmesi

Halomonas caseinilytica KB12 stok kültürü %12 MGM ortamında 37 °C'de 150 rpm'de 1 gece boyunca büyütülerek canlandırılmıştır. Canlandırma sonrası elde edilen aşı kültürden, farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan (%6, %12, %18) MGM ortamlarına % 1 inokülasyon oranında ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürlerden vezikül izolasyonu, izolasyon prosedürü takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Aynı şekilde *Escherichia coli* stok kültürü Nutrient broth besiyerinde 37 °C'de 150 rpm'de 1 gece boyunca büyütülerek canlandırılmıştır. Canlandırma sonrası elde edilen aşı kültürden taze Nutrient broth besiyerine % 1 inokülasyon oranında ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürlerden vezikül izolasyonu, izolasyon prosedürü takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin izolasyonu

İnkübasyon sonrası elde edilen bakteri kültürleri 4 °C'de 15 dk 10.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplanan süpernatantlar 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilmiş süpernatantlardan 100 µL alınıp kontaminasyon kontrolü için, Nutrient

agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Filtreden geçirilmiş süpernatantlar 4 °C'de 4 saat boyunca 150.000 xg'de ultrasantrifüj edilmiştir. Ultrasantrifüj işlemi sonrası toplanan, vezikülleri içeren peletler, 2 mL steril PBS ile çözülüp kullanıma kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3. Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin elektron mikroskobu ile belirlenmesi

Elde edilen veziküllerin morfolojileri Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz için veziküllerin %4 paraformaldehitte sabitlenmesi sağlanmıştır ve formvar karbon kaplı grid üzerine yerleştirilmiştir. Yıkama sonrası, %1 glutaraldehit kullanılarak veziküller sabitlenmiş ve 10 dakika % 0,5 uranil asetat ile inkübasyona bırakılarak boyanmıştır ve sonrasında görüntüleme yapılmıştır.

3.2.4. Mikrobiyal ekstrasellüler veziküllerin proteomik analizi

3.2.4.1. Bakterilerden total protein izolasyonu

H. caseinilytica' dan total protein izolasyonu için ;

- Büyütülmüş bakteri kültürü 4 °C'de 9000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılıp peletler üzerine 5 mL saf su eklenmiştir ve tekrar aynı koşullarda santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası bu kez peletler üzerine 2 mL PBS tamponu eklenmiş ve peletler çözünmüştür.
- Tampon içinde çözünmüş peletler 10 dk sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur.
- Sonikasyon sonunda 14.000 rpm' de 15 dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant temiz bir tüpe aktarılıp protein örneği olarak kullanılmak üzere SDS-poliakrilamid jel elektroforez işlemine kadar - 20 °C' ye kaldırılmıştır.

3.2.4.2. Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Ekstrasellüler vezikül numunelerinin protein miktarları ticari BCA testi ile belirlenmiştir. Her kültür gruplarından, 10 µg EV numunesi, 1:3 oranında denatürasyon boya çözeltisi ile proteinlerin denatürasyonunu sağlamak amacıyla 100 °C'de 10 dakika kaynatılmıştır ve jel elektroforezine yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

Elektroforez için öncelikle %12'lik yürütme jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlandıktan sonra elektroforez camlarına eklenmiştir ve jelin düz bir yapı kazanması için üzerine 1 mL saf su eklenmiştir. Jelin donması için 30 dk beklendikten sonra %4'lük yükleme jeli hazırlanmıştır. Yükleme jelinin içerisinde taraklar ile kuyucuklar oluşturulup donmasından sonra camlar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank 5X yürütme tamponundan seyreltilerek hazırlanan 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Kaynatılarak yüklenmeye hazır hale getirilen örneklerin her birinden 15 µL kuyucuklara eklenmiştir. 60 V'ta 30 dk 120 V'ta yaklaşık 3 saat yürütülmüştür. Yürütme sonrası jeller 1 saat süreyle Coomassie mavi boyası içeren boyama çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama sonrası jeller boya uzaklaştırıcı solüsyon içinde bir gece bekletilmiştir.

3.2.4.3. Kütle spektrometri analizi (LC-MS/MS)

Analiz öncesi numune hazırlığı yapılmıştır. Bunun için her numuneden 50 µg protein mikro tüplere aktarılmıştır. Proteinler, oda sıcaklığında 5 mM nihai konsantrasyonu ayarlamak için ditiotreitol (DTT) ile indirgenmiştir ve karanlıkta 1 saat boyunca oda sıcaklığında 50 mM nihai konsantrasyonu ayarlamak için iyodoasetamid (IAA) ile alkilenmiştir. 10 mM nihai konsantrasyonu ayarlamak için ilave DTT eklenmiştir. Proteinler metanol/kloroform çökeltme protokolü kullanılarak çökeltilmiştir ve pH 8.5'te 8 M üre ve 50 mM Tris tamponu içeren çözelti içinde çözülmüştür. Üre konsantrasyonu daha sonra pH 8.5'te 50 mM Tris tamponu ile seyreltilmiştir. Tripsin, pH 8.5'te 50 mM Tris tamponu içinde çözündürülmüştür. Sonra protein çözeltisine 1:100 oranında tripsin-LysC/protein ilave edilmiştir ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Trifloroasetik konsantrasyonun nihai konsantrasyonunu %0.5'e ayarlayarak enzimatik sindirimi

durdurmak için inkübe edilen çözeltiye trifloroasetik asit ilave edilmiştir. Numuneler ticari Sep-Pak (Waters) protokolüne göre temizlenmiştir. Numuneler Speed-Vac santrifüj buharlaştırıcı kullanılarak kurutulmuştur ve sonrasında protein konsantrasyonunun 1 µg/µL olması için MilliQ su içinde çözülmüştür.

Hazırlık sonrası peptitler, bir Q Exactive Plus kütle spektrometresinde bir Ultimate 3000 RSLnano sistemine bağlı 50 cm'lik bir kolon üzerinde yürütülmüştür. Örnekler kolona tampon A (su içinde %0,1 formik asit) ile yüklenmiştir ve 150 dakikalık bir gradyan süresi ile, 250 nL/dk'lık bir akış hızında %5 ila %95 tampon B (%95 ACN, %0.1 FA) ile ayrıştırılmıştır. Kütle spektrumları, veriye bağlı modda bir Orbitrap Q Exactive Plus kütle spektrometresi ile 17.500 çözünürlükte elde edilmiştir.

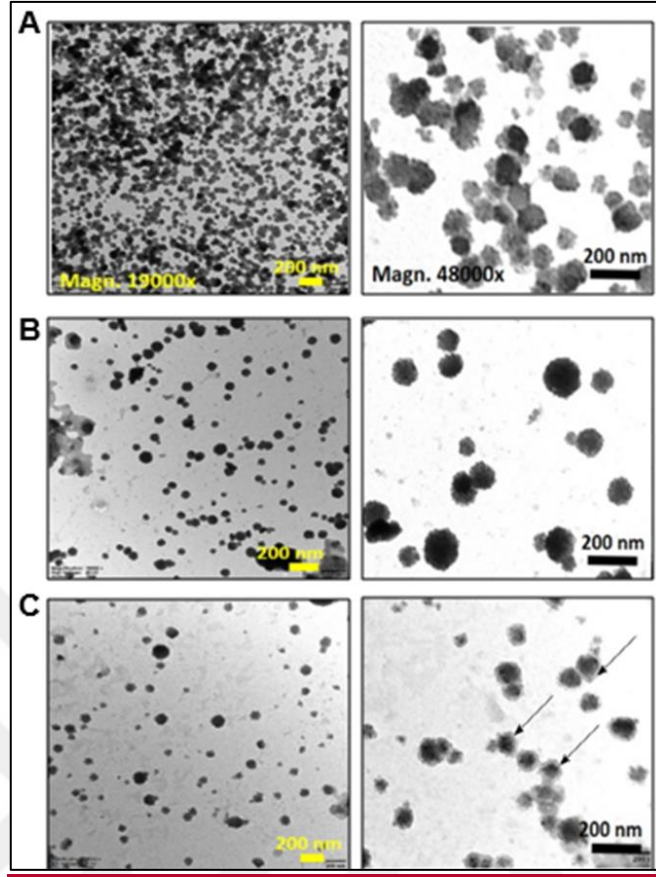
3.2.4.4. Biyoformatik analizler

MS spektrum analizinden elde edilen veriler, Maxquant (versiyon 2.03.0) yazılımı ile protein eşleştirilmeleri yapılmıştır (Protein verileri EK 1'de verilmiştir). *H. caseinilytica* ve *E. coli* proteomik verileri Uniport veri tabanından elde edilmiştir. Proteinlerin hücre altı lokalizasyonu Cello yazılımı (versiyon 2.0), ortolog grup kümeleri EggNOG yazılımı ve transmembran topolojisi ise Phobius yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler R (versiyon 4.1) yazılımında birleştirilmiştir. Her kültür gruplarına ait vezikül proteinlerinin korelasyon ve PCA analizleri yapılmıştır

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyal Ekstrasellüler Vezikülerin TEM Görüntüleri

H. caseinilytica %6, %12 ve %18 tuz içeren MGM ortamında büyütülmüştür ve her bir kültür grubundan ekstrasellüler vezikül izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen veziküller TEM'de görüntülenmiştir. Görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir. Veziküllerin ortalama çapı 50 - 200 nm aralığında bulunmuştur. Literatürde yer alan vezikül boyutları ile benzer olduğu görülmüştür (Haurat vd., 2015). Farklı tuz gruplarına ait veziküllerde görüntülenen alan ortalaması göz önüne alındığında vezikül sayısı yoğunluğu olarak, en fazla %6 tuz içeren ortamda büyütülen kültürlerde; en az ise %18 tuz içeren ortamda büyütülen kültürlerden vezikül salındığı belirlenmiştir. %18 tuz konsantrasyonunda veziküllerin dış zarlarının kalınlaştığı gözlenmiştir. Halofillerin, ozmotik basınçtaki değişikliklere yanıt olarak hücre zarı bileşimini ve akışkanlığını artırabildikleri ve böylece morfolojilerini değiştirebildikleri gözlenmiştir (Liu vd., 2022). *H. caseinilytica* veziküllerin üretiminin büyük olasılıkla daha düşük tuz konsantrasyonundan kaynaklandığını ve zar yapılarının, salgılandıkları bakteri hücrelerinin zar yapısını yansıttığını destekler. Hücre duvarı stabilitesindeki azalma, tuz konsantrasyonları düştükçe veziküllerin salınmasına neden olabilir. Daha yüksek tuz konsantrasyonlarında, kompakt formdaki dış zar yapıları suyun hareketini kısıtlayabilir, peptidoglikana daha iyi bağlanır ve dolayısıyla daha sağlam bir yapı kazanır.



Şekil 4.1. Ekstrasellüler veziküllerin TEM görüntüleri. A: % 6 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller, B:% 12 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller, C: %18 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller

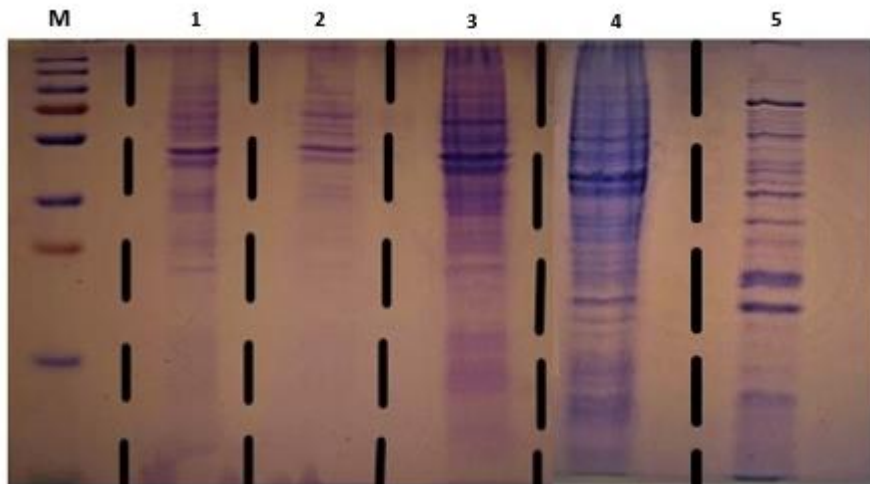
4.2. SDS-PAGE Sonuçları

İzole edilen veziküllerin SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülmesinden önce ticari BCA kiti ile (BCA kit-Thermo Scientific -23227) protein miktarları belirlenmiştir. Protein miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Kit prosedürü takip edilerek BCA reaktifi örnek başına 2 mL olacak şekilde reaktif A ve reaktif B 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Sonrasında 96’lı mikropılaka kuyucuklarına vezikül örneklerinden 25 µL BCA reaktifinden de 200 µL eklenip karıştırılmıştır. Mikropılakalar 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropılakalar oda sıcaklığına soğuduğunda 562 nm’de absorbans ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 20 – 20.000 µg/mL aralığında hazırlanan BSA konsantrasyonları kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. BCA testi ile belirlenen vezikül protein miktarları

Örnek adı	Protein miktarı ($\mu\text{g/mL}$)
%6 tuzlu ortamda büyütülmüş <i>H.caseinilytica</i> KB12' den izole edilmiş veziküller	461,33
%12 tuzlu ortamda büyütülmüş <i>H.caseinilytica</i> KB12' den izole edilmiş veziküller	1654,66
%18 tuzlu ortamda büyütülmüş <i>H.caseinilytica</i> KB12' den izole edilmiş veziküller	2788,00
<i>E.coli</i> ' den izole edilmiş veziküller	2981,33

Veziküllerin protein miktarları belirlendikten sonra %12' lik yürütme ve %4' lük yükleme jelleri kullanılarak veziküller SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonra protein bant yapıları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Veziküllerin SDS-poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü. M:marker, 1: *H.caseinilytica* total proteini 2: % 6 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller, 3:% 12 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller, 4: %18 tuzlu ortamda büyütülen kültürden izole edilen veziküller, 5: *E.coli*' den izole edilmiş veziküller

Yürütme sonunda farklı tuz konsantrasyonlarında büyütülmüş kültürden izole edilen veziküller arasında ve de optimal besiyeri ortamında büyütülen *H. caseinilytica* total bakteri proteinleri arasında protein bantları farklılıkları tespit edilmiştir. Aynı zamanda mezofilik bir tür olan *E. coli*'den izole edilmiş veziküller ile diğer veziküller arasında da protein bant farklılıkları belirlenmiştir. %12 ve %18 tuz oranlarındaki örnekler daha benzer ve %6 tuz oranındaki örneklerden yüksek protein içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu, daha yüksek tuz seviyelerinde farklı numuneler içindeki protein içeriği ve dağılımında temel bir kayma olduğunu göstermektedir ve membran protein konsantrasyonlarının değişen çevresel koşullarla değiştiği gözlemleriyle uyumludur (Mozaheb ve Mingeot-Leclercq, 2020).

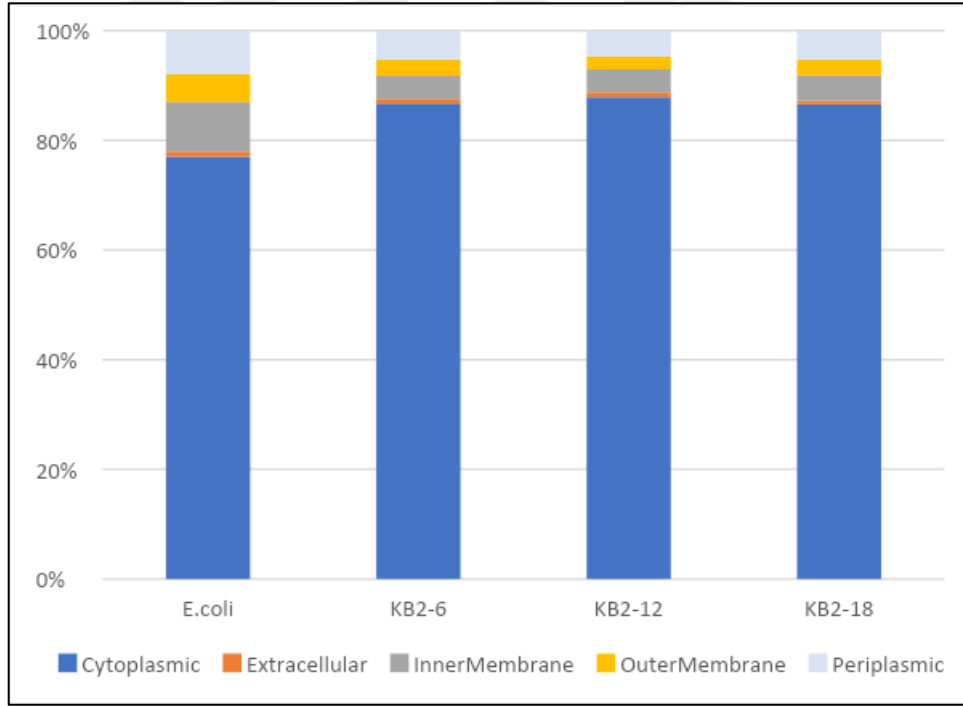
4.3. Proteomik Analiz Bulguları

4.3.1. Proteinlerin hücre altı konum ve ortolog gruplarının belirlenmesi

Her bir vezikül örneğinin protein sayıları ve proteinlerin hücre altı konumları ve oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3). %12 tuz oranında büyütülmüş kültürden izole edilen veziküllerde daha fazla protein tanımlanmıştır. Ayrıca tüm vezikül gruplarında hücre dışı proteinleri azken, sitoplazmik proteinlerin daha fazla sayıda olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* vezikülleri ile *H.caseinilytica*' dan izole edilen veziküller karşılaştırıldığında *E.coli* veziküllerinde dış zar proteinleri daha yüksek oranda bulunmuştur. Aynı zamanda *H.caseinilytica*' dan izole edilen veziküllerin sitoplazmik proteinlerinde belirlenen yüksek ortolog grupları amino asit taşınması ve metabolizması, translasyon ve ribozomal yapı, enerji üretimine ait iken; hücre dışı proteinlerde ise hücre zarı biyogenezine aittir.

Çizelge 4.2. Veziküllere ait protein sayılarının hücre altı konumlarına göre dağılım oranları

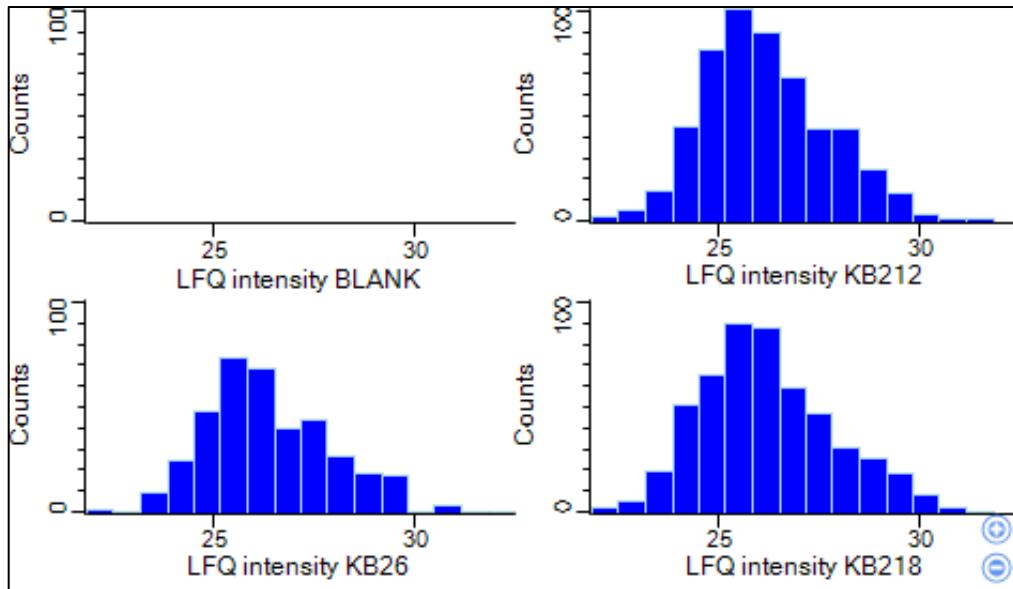
Hücre altı konum	<i>E.coli</i> EV		%6 <i>H.caseinilytica</i> EV		%12 <i>H.caseinilytica</i> EV		%18 <i>H.caseinilytica</i> EV	
	Sayı	Yüzelik oran	Sayı	Yüzelik oran	Sayı	Yüzelik oran	Sayı	Yüzelik oran
Sitoplazma	77	77,0	664	86,7	922	87,9	775	86,6
Ekstrasellüler	1	1,0	7	0,9	9	0,9	6	0,7
İç zar	9	9,0	32	4,2	44	4,2	41	4,6
Dış zar	5	5,0	22	2,9	25	2,4	25	2,8
Periplazma	8	8,0	41	5,4	49	4,7	48	5,4
Toplam	100	%100	764	%100	1049	%100	895	%100



Şekil 4.3. Vezikül proteinlerinin hücre altı konum oranlarının grafiksel gösterimi

4.3.2. Kantitatif analiz

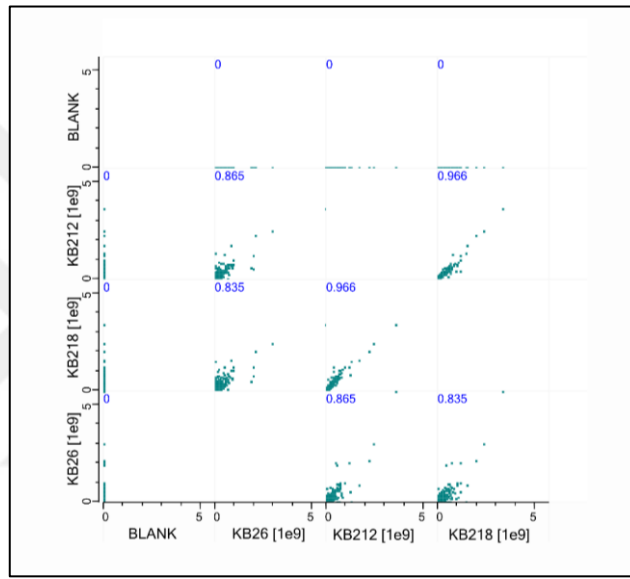
Etiketsiz kantitatif analizinde spektrometrik sinyal yoğunluğu ile protein ekspresyonları ölçülmektedir. LC-MS/MS analizinde de aynı prensib ile analiz yapılmaktadır. Analiz sonucunda elde edilen sinyal yoğunlukları logaritmik olarak dönüştürülmüştür. Sinyal yoğunluk değerleri, her numune için protein ekspresyonunu tahminlemeyi sağlamıştır. Sinyal yoğunlukları Şekil 4.4’de histogram modeli ile verilmiştir. Histogram modeli ile verilen sinyal yoğunlukları karşılaştırıldığında %6 tuz içeren kültürden izole edilen veziküllerin yüksek çarpık değere sahip olduğu ve %12 ve %18 tuz içeren kültürden izole edilen veziküller için dağılım modelinin daha benzer olduğu bulunmuştur. Bu sonuç SDS-PAGE analizi verileriyle de uyumludur. LC-MS/MS analizi elde edilen protein ve peptit spektrumlar MaxQuant kullanılarak doğru eşleşme oranları belirlenmiştir ve bu şekilde istatistiksel analizde kullanılacak ham veriler elde edilmiştir. Ayrıca MaxQuant sonrası protein sayımında %6 tuz içeren kültürden izole edilen veziküllerde 388; %12 tuz içeren kültürden izole edilen veziküllerde 526 ve %18 tuz içeren kültürden izole edilen veziküllerde ise 552 protein olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. LFQ değerlerinin histogram modeli ile gösterimi

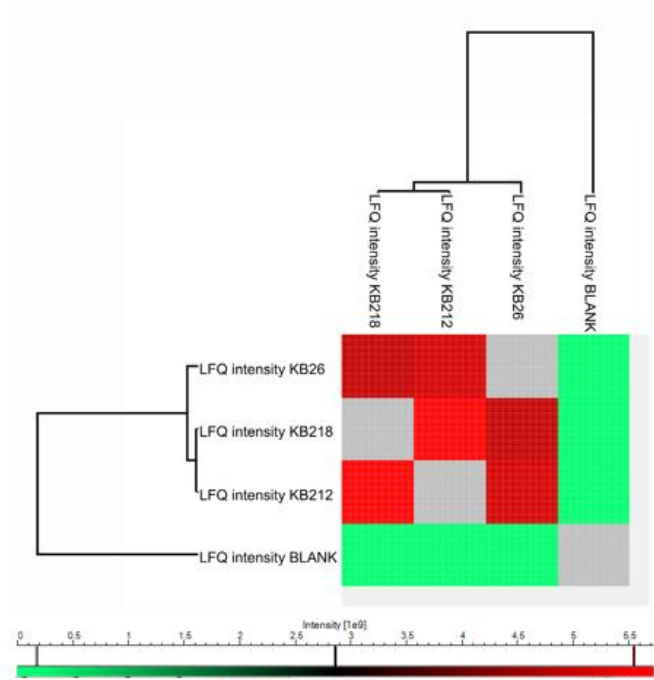
4.3.3. Korelasyon analizi

Tüm veriler için Pearson korelasyon analizi yapılmıştır. Veriler arasında genel olarak yüksek bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda %12 ve %18 tuz içeren kültürlerden izole edilen vezikül protein verileri arasında korelasyon katsayısı 0,96; %6 ve %18 tuz içeren kültürlerden izole edilen vezikül protein verileri arasında korelasyon katsayısı 0,83 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Protein verileri arasındaki korelasyon analizi sonuçları

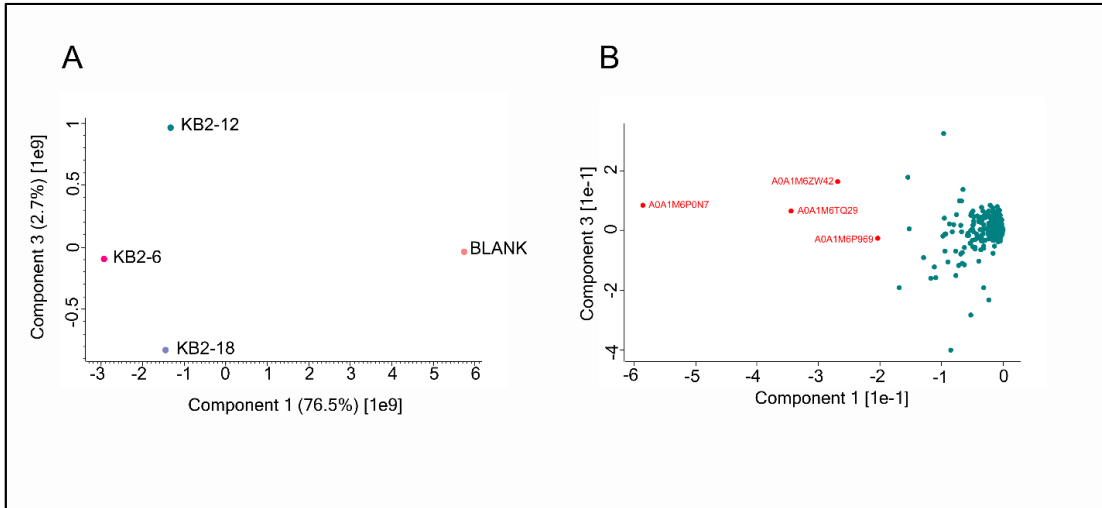
Verilerin küme analizi ile veziküllerin protein ekspresyon ifadelerinin kıyaslanması da yapılmıştır (Şekil 4.6) korelasyon analizi ile aynı şekilde %12 ve %18 tuz içeren kültürlerden izole edilen veziküllerin, %6 tuz içeren kültürden izole edilen veziküllere kıyasla benzer ekspresyon ifadelerine sahip oldukları belirlenmiştir. Hem korelasyon hem de küme analizi sonuçları, vezikül proteomunun tuz oranları ile beraber değişiklik gösterdiğini desteklemektedir.



Şekil 4.6. Küme analizi sonuç histogramı

4.3.4. Temel bileşen analizi

Temel bileşen analizi (PCA), kütle spektrometrisi verilerinde kümeleme görselleştirmesi için sıklıkla kullanılan bir istatistiksel yaklaşımdır. Farklı örneklerden elde edilen verilerdeki değişkenliğin çoğu, belirlenen ana bileşenlerle açıklanmaktadır. Sonuç olarak analiz, ana bileşeni, protein alt kümelerini tanımlamak için kullanılabilir ve bu da veri boyutunu etkin bir şekilde azaltmaktadır. Temel bileşen analizi sonucunda %6 tuz konsantrasyonunda izole edilen vezikül proteinlerinin, %12 ve %18 tuz konsantrasyonlarından elde edilen vezikül proteinlerinden daha farklı olduğu görülmüştür (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. PCA analiz sonuç grafiği

Aynı zamanda ayrıntılı inceleme yapıldığında 4 proteinin (A0A1M6P0N7, A0A1M6ZW42, A0A1M6TQ29 ve A0A1M6P969) diğer proteinlerin oluşturduğu kümeden çok daha uzakta olduğu tespit edilmiştir. Farklı kümelenen proteinlerin tanımlanması ve halofilik mikroorganizmalardaki işlevinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir ve Çizelge 4.3' de verilmiştir. A0A1M6P0N7, OmpA-OmpF porin olarak açıklanmıştır (Sugawara ve Nikaido, 1994). Aynı zamanda halofilik bakterilerde ozmoregülü edilmiş membran proteinleri olarak da tanımlanmıştır (Yun vd., 2018). A0A1M6ZW42, uzama faktörü Tu olarak açıklanmıştır. Tu, G-protein süper ailesinin EF-Tu (EF-1A) alt ailesine aittir. Protein üretimi sırasında bu protein, aminoasil-tRNA'nın ribozomların A bölgesine GTP' ye bağlı bağlanmasını kolaylaştırır (Dilgimen vd., 2014) ve de halotoleransı kontrol eden translasyon gözetimine katkıda bulunmaktadır (Chen vd., 2017). A0A1M6TQ29, şaperonin olarak açıklanmıştır. Protein yapısı tuzluluğa tepki olarak değişebilir ve bu da konformasyonunu etkileyebilir. Bu nedenle, GroL proteinlerinin artan ifadesi, proteinlerin uygun şekilde katlanmasını sağlamaya yardımcı olur (Thagela vd., 2018). Tuz stresi altında *Tetragenococcus halophilus*'ta önemli ölçüde yukarı regüle edilen genlerden biri olarak rapor edilmiştir (Liu vd., 2015). A0A1M6P6Y6, Tol-Pal sistem proteini TolB olarak açıklanmıştır. TolB, Tol-Pal (peptidoglikanla ilişkili lipoprotein) kompleks bileşenlerindedir (Schwechheimer ve Kuehn, 2015). Tol-Pal kompleksi, peptidoglikan ile etkileşime girmenin yanı sıra membran stabilitesine yardımcı olan bir hücre bölünmesi bileşenidir (Gerding vd., 2007; Yeh vd., 2010).

Çizelge 4.3. Farklı kümelenen proteinlerin özellikleri

Protein ID	Hücre altı konum	Ortogonal grup kategorisi	Tanımlama
A0A1M6P0N7	Ekstrasellüler	Hücre zarı biyogenezi	OmpA ailesine ait
A0A1M6ZW42	Sitoplazma	Translasyon	Uzama faktörü, Aminoasil-tRNA'nın A-bölgesine bağlanmasını sağlar.
A0A1M6TQ29	Sitoplazma	Aminoasit metabolizması	Şaperonin, yanlış katlanmayı önler.
A0A1M6P6Y6	Dış membran	Hücre zarı biyogenezi	Tol-Pal kompleksi bileşeni TolB

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında farklı tuz konsantrasyonlarında (%6, %12 ve %18) geliştirilen *H.caseinilytica*' dan ve *E.coli*'den ekstrasellüler veziküller izole edilmiştir. İzole edilen veziküllerin morfolojileri belirlenmiştir. Sonrasında veziküllerin proteinleri belirlenip analizleri yapılmıştır. Proteinlerin tanımlanmaları, ortolog gruplarının belirlenmesi ve hücre altı yerleşimlerinin belirlenmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Elde edilen veriler ile istatistiksel analizler yapılarak farklı tuz konsantrasyonlarına ait veziküllerin protein farklılıkları karşılaştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucu farklı tuz konsantrasyonlarına ait vezikül proteinleri benzer iken, *E. coli* vezikül proteinlerinin farklı olduğu bulunmuştur. *H. caseinilytica* KB2'de ekstrasellüler vezikül üretiminin, tuzluluktaki azalmayla arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda %12 ve %18 tuz konsantrasyonlarına ait veziküllerin daha benzer olduğu görülmüştür. Veriler üzerinde yapılan küme ve temel bileşen analizleri sonucunda genel benzer kümelenen proteinler arasında farklı olarak kümelendiği belirlenen 4 proteinin (A0A1M6P0N7, A0A1M6ZW42, A0A1M6TQ29 ve A0A1M6P969) halofil organizmalardaki işlevleri araştırılmıştır. Özet olarak, ortolog grubu analizi ile uyumlu olarak, bu proteinlerin ekspresyon paterni, hücre duvarı bütünlüğünü korumanın yanı sıra protein sentezini ve stabilitesini değiştirmeye yönelik hücresel ihtiyacı ortaya koymaktadır. Bu proteinlerinin *H. caseinilytica* veziküllerinin oluşumunda ve veziküllerin tuzlu ortama adaptasyonunda yer alabileceğini belirlenmiştir.

Literatür araştırmamıza göre, ekstrasellüler veziküllerin tuzlu ortama adaptasyonundaki rollerinin keşfine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında ekstremofil mikroorganizmalara ait veziküllerin ortama adaptasyonunda yer alabileceği gösterilmiştir. Hem ekstrasellüler veziküllerde hem de bakteri hücrelerinde ozmoprotektanların, inorganik iyonların ve lipidlerin değişen tuz konsantrasyonundaki dinamiklerini araştıran çalışmalar, bu çalışmada bildirilen bulguları daha fazla aydınlatılabilir. Örneğin, bunlar ekstrasellüler vezikül içeriğinin de hücre dışı ortamı etkilemeyi amaçlayıp amaçlamadığını belirlemeye yardımcı olabilir.

Bu çalışmada, *H. caseinilytica* KB2 ekstrasellüler vezikülleri, değişen tuz konsantrasyonundan kaynaklanan hücresel değişiklikleri yansıtırsa da, değişen tuzluluğa uyum sağlama yönünde kendi başına doğrudan bir rol oynamayabilir. Ekstremofil mikroorganizmalarda vezikül karakterizasyonu ve adaptasyon mekanizmalarındaki rolleri üzerine yapılacak olan ileri çalışmalar ile hem literatürde yer alan adaptasyon mekanizmalarına hem de bilinen vezikül fonksiyonlarına daha fazla katkı sağlanacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acevedo, R., Fernández, S., Zayas, C., Acosta, A., Sarmiento, M. E., Ferro, V. A., Rosenqvist, E., Campa, C., Cardoso, D., Garcia, L., & Perez, J. L. (2014). *Bacterial Outer Membrane Vesicles and Vaccine Applications*. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00121>
- Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., & Cookson, B. T. (2007). *Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of Salmonella typhimurium That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity In Vivo*. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7692–7701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>
- Anand, D., & Chaudhuri, A. (2016). *Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications*. *Molecular Membrane Biology*, 33(6–8), 125–137. <https://doi.org/10.1080/09687688.2017.1400602>
- Arnold, R., Galloway, Y., McNicholas, A., & O’Hallahan, J. (2011). *Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand*. *Vaccine*, 29(40), 7100–7106. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.120>
- Azam, A. H., & Tanji, Y. (2019). *Bacteriophage-host arm race: An update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2121–2131. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09629-x>
- Bai, X., Findlow, J., & Borrow, R. (2011). *Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(7), 969–985. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.585965>
- Bass-Becking, L. G. M. (1931). *Historical notes on salt and salt-manufacture*. *The Scientific Monthly*, 32(5), 434-446.
- Baumgartner, J. G. (1937). *The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile*. *Journal of Food Science*, 2(4), 321–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1937.tb16523.x>
- Begić, M., & Josić, D. (2020). *Biofilm formation and extracellular microvesicles—The way of foodborne pathogens toward resistance*. *ELECTROPHORESIS*, 41(20), 1718–1739. <https://doi.org/10.1002/elps.202000106>
- Bielecka, E., Scavenius, C., Kantyka, T., Jusko, M., Mizgalska, D., Szmigielski, B., Potempa, B., Enghild, J. J., Prossnitz, E. R., Blom, A. M., & Potempa, J. (2014). *Peptidyl Arginine Deiminase from Porphyromonas gingivalis Abolishes Anaphylatoxin C5a Activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32481–32487. <https://doi.org/10.1074/jbc.C114.617142>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bishop, D., & Work, E. (1965). *An extracellular glycolipid produced by Escherichia coli grown under lysine-limiting conditions*. *Biochemical Journal*, 96(2), 567–576. <https://doi.org/10.1042/bj0960567>
- Bose, S., Aggarwal, S., Singh, D. V., & Acharya, N. (2020). *Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria*. *Microbial Cell*, 7(12), 312–322. <https://doi.org/10.15698/mic2020.12.737>
- Briaud, P., & Carroll, R. K. (2020). *Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria*. *Infection and Immunity*, 88(12), e00433-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20>
- Cai, W., Kesavan, D. K., Wan, J., Abdelaziz, M. H., Su, Z., & Xu, H. (2018). *Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based*. *Diagnostic Pathology*, 13(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0768-y>
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L. N., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1996). *Osmoprotectants in Halomonas elongata: High-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway*. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7221–7226. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7221-7226.1996>
- Cao, Y., & Lin, H. (2021). *Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5), 1795–1801. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11140-1>
- Caruana, J. C., & Walper, S. A. (2020). *Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>
- Cecil, J. D., Sirisaengtaksin, N., O'Brien-Simpson, N. M., & Krachler, A. M. (2019). *Outer Membrane Vesicle-Host Cell Interactions*. *Microbiology Spectrum*, 7(1), 7.1.06. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018>
- Chan, K. W., Shone, C., & Hesp, J. R. (2017). *Antibiotics and iron-limiting conditions and their effect on the production and composition of outer membrane vesicles secreted from clinical isolates of extraintestinal pathogenic E. coli*. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 11(1–2), 1600091. <https://doi.org/10.1002/prca.201600091>
- Chatterjee, S. N., & Das, J. (1967). *Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-wall Material by Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1099/00221287-49-1-1>
- Chattopadhyay, M. K., & Jaganandham, M. V. (2015). *Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00758>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chelakkot, C., Choi, Y., Kim, D.-K., Park, H. T., Ghim, J., Kwon, Y., Jeon, J., Kim, M.-S., Jee, Y.-K., Gho, Y. S., Park, H.-S., Kim, Y.-K., & Ryu, S. H. (2018). *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(2), e450–e450. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.282>
- Chen, Q., Bai, H., Wu, W., Huang, G., Li, Y., Wu, M., Tang, G., & Ping, Y. (2020). *Bioengineering Bacterial Vesicle-Coated Polymeric Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy and Metastasis Prevention*. *Nano Letters*, 20(1), 11–21. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02182>
- Chen, Y.-H., Lu, C.-W., Shyu, Y.-T., & Lin, S.-S. (2017). *Revealing the Saline Adaptation Strategies of the Halophilic Bacterium Halomonas beimenensis through High-throughput Omics and Transposon Mutagenesis Approaches*. *Scientific Reports*, 7(1), 13037. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13450-9>
- Cheng, K., Kang, Q., & Zhao, X. (2020). *Biogenic nanoparticles as immunomodulator for tumor treatment*. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1646>
- Cheng, K., Kang, Q., & Zhao, X. (2020). *Biogenic nanoparticles as immunomodulator for tumor treatment*. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1646>
- Chowdhury, C., & Jagannadham, M. V. (2013). *Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of Pseudomonas syringae pv. Tomato T1 during normal growth*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(1), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.09.015>
- Cowan, D., Ramond, J.-B., Makhalanyane, T., & De Maayer, P. (2015). *Metagenomics of extreme environments*. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.005>
- Crowley, J. T., Toledo, A. M., LaRocca, T. J., Coleman, J. L., London, E., & Benach, J. L. (2013). *Lipid Exchange between Borrelia burgdorferi and Host Cells*. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003109. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003109>
- Dagnelie, M., Corvec, S., Khammari, A., & Dréno, B. (2020). *Bacterial extracellular vesicles: A new way to decipher host-microbiota communications in inflammatory dermatoses*. *Experimental Dermatology*, 29(1), 22–28. <https://doi.org/10.1111/exd.14050>
- De Jonge, E. F., Balhuizen, M. D., van Boxtel, R., Wu, J., Haagsman, H. P., & Tommassen, J. (2021). Heat shock enhances outer-membrane vesicle release in *Bordetella* spp. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100009. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100009>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Lise, F., Mensitieri, F., Rusciano, G., Dal Piaz, F., Forte, G., Di Lorenzo, F., Molinaro, A., Zarrelli, A., Romanucci, V., Cafaro, V., Sasso, A., Filippelli, A., Di Donato, A., & Izzo, V. (2019). *Novosphingobium* sp. *PPIY* as a novel source of outer membrane vesicles. *Journal of Microbiology*, 57(6), 498–508. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8483-2>
- De, S. N. (1959). *Enterotoxicity of Bacteria-free Culture-filtrate of Vibrio cholerae*. *Nature*, 183(4674), 1533–1534. <https://doi.org/10.1038/1831533a0>
- Derkus, B., Emregul, K. C., & Emregul, E. (2017). *A new approach in stem cell research Exosomes: Their mechanism of action via cellular pathways: Mechanisms of exosomes by cellular pathways*. *Cell Biology International*, 41(5), 466–475. <https://doi.org/10.1002/cbin.10742>
- Dilgimen, A. S., Arga, K. Y., Erdmann, V. A., Wittmann-Liebold, B., Denizci, A. A., & Kazan, D. (2014). *Comparison of Protein Expression Profiles of Novel Halomonas smyrnensis AAD6 and Halomonas salina DSMZ 5928*. *Natural Science*, 06(09), 628–640. <https://doi.org/10.4236/ns.2014.69062>
- Domingues, S., & Nielsen, K. M. (2017). *Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes*. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.012>
- Dorward, D. W., & Garon, C. F. (1990). *DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1960–1962. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1960-1962.1990>
- Dubois, J.-Y. F., Kouwen, T. R. H. M., Schurich, A. K. C., Reis, C. R., Ensing, H. T., Trip, E. N., Zweers, J. C., & van Dijl, J. M. (2009). *Immunity to the Bacteriocin Sublancin 168 Is Determined by the SunI (YolF) Protein of Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 651–661. <https://doi.org/10.1128/AAC.01189-08>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). *Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Ellen, A. F., Albers, S.-V., Huibers, W., Pitcher, A., Hobel, C. F. V., Schwarz, H., Folea, M., Schouten, S., Boekema, E. J., Poolman, B., & Driessen, A. J. M. (2008). *Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal Sulfolobus species reveals the presence of endosome sorting complex components*. *Extremophiles*, 13(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0199-x>
- Erdmann, S., Tschitschko, B., Zhong, L., Raftery, M. J., & Cavicchioli, R. (2017). *A plasmid from an Antarctic haloarchaeon uses specialized membrane vesicles to disseminate and infect plasmid-free cells*. *Nature Microbiology*, 2(10), 1446–1455. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0009-2>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferrari, G., Garaguso, I., Adu-Bobie, J., Doro, F., Taddei, A. R., Biolchi, A., Brunelli, B., Giuliani, M. M., Pizza, M., Norais, N., & Grandi, G. (2006). *Outer membrane vesicles from group B Neisseria meningitidis Δgna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles*. PROTEOMICS, 6(6), 1856–1866. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500164>
- Gaudin, M., Gaudiard, E., Schouten, S., Houel-Renault, L., Lenormand, P., Marguet, E., & Forterre, P. (2013). *Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA: Membrane vesicles from Thermococcales*. Environmental Microbiology Reports, 5(1), 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00348.x>
- Gerding, M. A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H., & De Boer, P. A. J. (2007). *The trans - envelope Tol–Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in E. coli*. Molecular Microbiology, 63(4), 1008–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05571.x>
- Gerritzen, M. J. H., Martens, D. E., Wijffels, R. H., van der Pol, L., & Stork, M. (2017). *Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform*. Biotechnology Advances, 35(5), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.003>
- Go, R., El-Enbaawy, M., Abdelrahman, S., Ata, N. (2019). *The in vitro potential antitumor effect of S. typhimurium outer membrane vesicles on MCF-7 and Caco-2 cell lines compared to chemotherapies*. Inter. J. Vet. Sci. 8, 259–266
- Grüll, M. P., Mulligan, M. E., & Lang, A. S. (2018). *Small extracellular particles with big potential for horizontal gene transfer: Membrane vesicles and gene transfer agents*. FEMS Microbiology Letters, 365(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny192>
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). *The outer membrane vesicles: Secretion system type zero*. Traffic, 18(7), 425–432. <https://doi.org/10.1111/tra.12488>
- Gujrati, V., Prakash, J., Malekzadeh-Najafabadi, J., Stiel, A., Klemm, U., Mettenleiter, G., Aichler, M., Walch, A., & Ntziachristos, V. (2019). *Bioengineered bacterial vesicles as biological nano-heaters for optoacoustic imaging*. Nature Communications, 10(1), 1114. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09034-y>
- Haurat, M. F., Elhenawy, W., & Feldman, M. F. (2015). *Prokaryotic membrane vesicles: New insights on biogenesis and biological roles*. Biological Chemistry, 396(2), 95–109. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0183>
- Ho, M.-H., Chen, C.-H., Goodwin, J. S., Wang, B.-Y., & Xie, H. (2015). *Functional Advantages of Porphyromonas gingivalis Vesicles*. PLOS ONE, 10(4), e0123448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123448>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J., & Rosenqvist, E. (2009). *Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27, B3–B12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.071>
- Horikoshi K. D. & Grant W. D. (1998). *Extremophiles: microbial life under extreme conditions*. Wiley-Liss. New York. Pp: 155-180
- Huang, W., Shu, C., Hua, L., Zhao, Y., Xie, H., Qi, J., Gao, F., Gao, R., Chen, Y., Zhang, Q., Li, W., Yuan, M., Ye, C., & Ma, Y. (2020). *Modified bacterial outer membrane vesicles induce autoantibodies for tumor therapy*. *Acta Biomaterialia*, 108, 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.030>
- Jäger, J., Keese, S., Roessle, M., Steinert, M., & Schromm, A. B. (2015). *Fusion of Legionella pneumophila outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes: Membrane fusion of L. pneumophila OMVs*. *Cellular Microbiology*, 17(5), 607–620. <https://doi.org/10.1111/cmi.12392>
- Jan, A. T. (2017). *Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jeon, J., Mok, H. J., Choi, Y., Park, S. C., Jo, H., Her, J., Han, J.-K., Kim, Y.-K., Kim, K. P., & Ban, C. (2017). *Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from Propionibacterium acnes*. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 11(1–2), 1600040. <https://doi.org/10.1002/prca.201600040>
- Jun, S.-H., Lee, T., Lee, J.-C., & Shin, J.-H. (2019). Different epithelial cell response to membrane vesicles produced by *Listeria monocytogenes* cultured with or without salt stress. *Microbial Pathogenesis*, 133, 103554. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103554>
- Kahnt, J., Aguiluz, K., Koch, J., Treuner-Lange, A., Konovalova, A., Huntley, S., Hoppert, M., Søgaard-Andersen, L., & Hedderich, R. (2010). *Profiling the Outer Membrane Proteome during Growth and Development of the Social Bacterium Myxococcus xanthus by Selective Biotinylation and Analyses of Outer Membrane Vesicles*. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 5197–5208. <https://doi.org/10.1021/pr1004983>
- Kang, C., Ban, M., Choi, E.-J., Moon, H.-G., Jeon, J.-S., Kim, D.-K., Park, S.-K., Jeon, S. G., Roh, T.-Y., Myung, S.-J., Gho, Y. S., Kim, J. G., & Kim, Y.-K. (2013). *Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially Akkermansia muciniphila, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis*. *PLoS ONE*, 8(10), e76520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076520>
- Kaparakis, M., Turnbull, L., Carneiro, L., Firth, S., Coleman, H. A., Parkington, H. C., Le Bourhis, L., Karrar, A., Viala, J., Mak, J., Hutton, M. L., Davies, J. K., Crack, P. J., Hertzog, P. J., Philpott, D. J., Girardin, S. E., Whitchurch, C. B., & Ferrero, R. L. (2010). *Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells*. *Cellular Microbiology*, 12(3), 372–385. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01404.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karthikeyan, R., Gayathri, P., Gunasekaran, P., Jagannadham, M. V., & Rajendhran, J. (2020). Functional analysis of membrane vesicles of *Listeria monocytogenes* suggests a possible role in virulence and physiological stress response. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104076. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104076>
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., & Gho, Y. S. (2015). *Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.006>
- Kim, O. Y., Park, H. T., Dinh, N. T. H., Choi, S. J., Lee, J., Kim, J. H., Lee, S.-W., & Gho, Y. S. (2017). *Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response*. *Nature Communications*, 8(1), 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
- Kim, Y. R., Kim, B. U., Kim, S. Y., Kim, C. M., Na, H. S., Koh, J. T., Choy, H. E., Rhee, J. H., & Lee, S. E. (2010). *Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytolysin–hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.122>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Klimentova, J., Pavkova, I., Horcickova, L., Bavlovic, J., Kofronova, O., Benada, O., & Stulik, J. (2019). *Francisella tularensis* subsp. *Holarctica* Releases Differentially Loaded Outer Membrane Vesicles Under Various Stress Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02304>
- Kuerban, K., Gao, X., Zhang, H., Liu, J., Dong, M., Wu, L., Ye, R., Feng, M., & Ye, L. (2020). *Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(8), 1534–1548. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.002>
- Kuipers, M. E., Hokke, C. H., Smits, H. H., & Nolte-‘t Hoen, E. N. M. (2018). *Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
- Kulkarni, H. M., & Jagannadham, M. V. (2014). *Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria*. *Microbiology*, 160(10), 2109–2121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>
- Kulkarni, H. M., Swamy, Ch. V. B., & Jagannadham, M. V. (2014). *Molecular Characterization and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas syringae* Suggest a Possible Response to Environmental Conditions*. *Journal of Proteome Research*, 13(3), 1345–1358. <https://doi.org/10.1021/pr4009223>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kunsmann, L., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Glüder, M., Kemper, B., Fruth, A., Wai, S. N., He, X., Llobes, R., Schmidt, M. A., Dobrindt, U., Mellmann, A., Karch, H., & Bielaszewska, M. (2015). *Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by Escherichia coli O104:H4 outbreak strain*. *Scientific Reports*, 5(1), 13252. <https://doi.org/10.1038/srep13252>
- Kushner D. J. (1985). *The Bacteria. In The Halobacteriaceae*, Chapter 3, Vol VIII, Academic Press, Inc., 171-213, London.
- Lee, B.-H., Wu, S.-C., Shen, T.-L., Hsu, Y.-Y., Chen, C.-H., & Hsu, W.-H. (2020). *The applications of Lactobacillus plantarum-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish*. *Food Chemistry*, 340, 128104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128104>
- Lee, E.-Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D.-S., Kang, J. S., Kim, H.-J., Park, K.-S., Lee, J.-O., Kim, Y.-K., Kwon, K.-H., Kim, K.-P., & Gho, Y. S. (2007). *Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli*. *PROTEOMICS*, 7(17), 3143–3153. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700196>
- Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. I., Kang, S. S., & Hyun, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response*. *FEMS Microbiology Letters*, 331(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>
- Lee, J., Lee, E.-Y., Kim, S.-H., Kim, D.-K., Park, K.-S., Kim, K. P., Kim, Y.-K., Roh, T.-Y., & Gho, Y. S. (2013). *Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles Carry Biologically Active β -Lactamase*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>
- Li, M., Zhou, H., Yang, C., Wu, Y., Zhou, X., Liu, H., & Wang, Y. (2020). *Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update*. *Journal of Controlled Release*, 323, 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
- Li, M., Zhou, H., Yang, C., Wu, Y., Zhou, X., Liu, H., & Wang, Y. (2020a). *Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update*. *Journal of Controlled Release*, 323, 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
- Li, Y., Zhao, R., Cheng, K., Zhang, K., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Liu, G., Xu, J., Xu, J., Anderson, G. J., Shi, J., Ren, L., Zhao, X., & Nie, G. (2020). *Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition*. *ACS Nano*, 14(12), 16698–16711. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03776>
- Lima, S., Matinha-Cardoso, J., Tamagnini, P., & Oliveira, P. (2020). *Extracellular Vesicles: An Overlooked Secretion System in Cyanobacteria*. *Life*, 10(8), 129. <https://doi.org/10.3390/life10080129>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, L., Si, L., Meng, X., & Luo, L. (2015). *Comparative transcriptomic analysis reveals novel genes and regulatory mechanisms of Tetragenococcus halophilus in response to salt stress*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(4), 601–616. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1579-0>
- Liu, S., Liu, X., Shi, Y., Zhuang, S., & Chen, Q. (2022). *RETRACTED: The adaptive mechanism of halophilic Brachy bacterium muris in response to salt stress and its mitigation of copper toxicity in hydroponic plants*. *Environmental Pollution*, 313, 120124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120124>
- MacDonald, I. A., & Kuehn, M. J. (2013). *Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2971–2981. <https://doi.org/10.1128/JB.02267-12>
- Mancini, F., Rossi, O., Necchi, F., & Micoli, F. (2020). *OMV Vaccines and the Role of TLR Agonists in Immune Response*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4416. <https://doi.org/10.3390/ijms21124416>
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). *Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense*. *BMC Microbiology*, 11(1), 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Marguet, E., Gaudin, M., Gauliard, E., Fourquaux, I., le Blond du Plouy, S., Matsui, I., & Forterre, P. (2013). *Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus Thermococcus*. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 436–442. <https://doi.org/10.1042/BST20120293>
- Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). *Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote*. *Nature*, 437(7057), 422–425. <https://doi.org/10.1038/nature03925>
- McCaig, W. D., Koller, A., & Thanassi, D. G. (2013). *Production of Outer Membrane Vesicles and Outer Membrane Tubes by Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1120–1132. <https://doi.org/10.1128/JB.02007-12>
- McMillan, H. M., Zebell, S. G., Ristaino, J. B., Dong, X., & Kuehn, M. J. (2021). *Protective plant immune responses are elicited by bacterial outer membrane vesicles*. *Cell Reports*, 34(3), 108645. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108645>
- Mendez, J. A., Soares, N. C., Mateos, J., Gayoso, C., Rumbo, C., Aranda, J., Tomas, M., & Bou, G. (2012). *Extracellular Proteome of a Highly Invasive Multidrug-resistant Clinical Strain of Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 5678–5694. <https://doi.org/10.1021/pr300496c>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Micoli, F., Alfini, R., Di Benedetto, R., Necchi, F., Schiavo, F., Mancini, F., Carducci, M., Palmieri, E., Balocchi, C., Gasperini, G., Brunelli, B., Costantino, P., Adamo, R., Piccioli, D., & Saul, A. (2020). GMMA Is a Versatile Platform to Design Effective Multivalent Combination Vaccines. *Vaccines*, 8(3), 540. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030540>
- Mozaheb, N., & Mingeot-Leclercq, M.-P. (2020). Membrane Vesicle Production as a Bacterial Defense Against Stress. *Frontiers in Microbiology*, 11, 600221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>
- Mullaney, E., Brown, P. A., Smith, S. M., Botting, C. H., Yamaoka, Y. Y., Terres, A. M., Kelleher, D. P., & Windle, H. J. (2009). *Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen Helicobacter pylori*. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 3(7), 785–796. <https://doi.org/10.1002/prca.200800192>
- Munhoz da Rocha, I. F., Amatuzzi, R. F., Lucena, A. C. R., Faoro, H., & Alves, L. R. (2020). *Cross-Kingdom Extracellular Vesicles EV-RNA Communication as a Mechanism for Host-Pathogen Interaction*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 593160. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.593160>
- Nieves, W., Asakrah, S., Qazi, O., Brown, K. A., Kurtz, J., AuCoin, D. P., McLachlan, J. B., Roy, C. J., & Morici, L. A. (2011). *A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary Burkholderia pseudomallei infection*. *Vaccine*, 29(46), 8381–8389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.058>
- O'Donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). *Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells: MicroReview - OMV entry into host cells*. *Cellular Microbiology*, 18(11), 1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
- Olaya-Abril, A., Prados-Rosales, R., McConnell, M. J., Martín-Peña, R., González-Reyes, J. A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón, L., Fernández, J., Luque-García, J. L., García-Lidón, C., Estévez, H., Pachón, J., Obando, I., Casadevall, A., Pirofski, L., & Rodríguez-Ortega, M. J. (2014). *Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteomics*, 106, 46–60.
- Olczak, T., Wójtowicz, H., Ciuraszkiewicz, J., & Olczak, M. (2010). *Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of Porphyromonas gingivalis HmuY*. *BMC Microbiology*, 10(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-134>
- Oren, A., Weisburg, W. G., Kessel, M., & Woese, C. R. (1984). *Halobacteroides halobius* gen. Nov., sp. Nov., a Moderately Halophilic Anaerobic Bacterium from the Bottom Sediments of the Dead Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(1), 58–70. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80051-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80051-X)
- Park, A. J., Surette, M. D., & Khursigara, C. M. (2014). *Antimicrobial targets localize to the extracellular vesicle-associated proteome of Pseudomonas aeruginosa grown in a biofilm*. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00464>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M. B., & Keenan, J. I. (2010). *Uptake of Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicles by Gastric Epithelial Cells*. *Infection and Immunity*, 78(12), 5054–5061. <https://doi.org/10.1128/IAI.00299-10>
- Perez Vidakovics, M. L. A., Jendholm, J., Mörgelin, M., Månsson, A., Larsson, C., Cardell, L.-O., & Riesbeck, K. (2010). *B Cell Activation by Outer Membrane Vesicles—A Novel Virulence Mechanism*. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000724. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000724>
- Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y. U., Manyam, G., Morozov, V. N., Zhou, W., & van Hoek, M. L. (2011). *Proteomic Characterization and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles of Francisella novicida Suggests Possible Role in Virulence and Use as a Vaccine*. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 954–967. <https://doi.org/10.1021/pr1009756>
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J. K., & Zillig, W. (2000). *Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus Sulfolobus*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2985–2988. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2985-2988.2000>
- Qin, M., Du, G., & Sun, X. (2020). *Biomimetic cell-derived nanocarriers for modulating immune responses*. *Biomaterials Science*, 8(2), 530–543. <https://doi.org/10.1039/C9BM01444F>
- Rompikuntal, P. K., Thay, B., Khan, M. K., Alanko, J., Penttinen, A.-M., Asikainen, S., Wai, S. N., & Oscarsson, J. (2012). *Perinuclear Localization of Internalized Outer Membrane Vesicles Carrying Active Cytotoxic Distending Toxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 80(1), 31–42. <https://doi.org/10.1128/IAI.06069-11>
- Rosenqvist, E., Høiby, E. A., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., Rønnild, E., Bjune, G., & Nøkleby, H. (1995). *Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine*. *Infection and Immunity*, 63(12), 4642–4652. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4642-4652.1995>
- Rueter, C., & Bielaszewska, M. (2020). *Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic Escherichia coli Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 91. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>
- Santos, S., Arauz, L. J. de, Baroque-Ramos, J., Lebrun, I., Carneiro, S. M., Barreto, S. A., & Schenkman, R. P. F. (2012). *Outer membrane vesicles (OMV) production of Neisseria meningitidis serogroup B in batch process*. *Vaccine*, 30(42), 6064–6069. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.052>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). *Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions*. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seike, S., Kobayashi, H., Ueda, M., Takahashi, E., Okamoto, K., & Yamanaka, H. (2021). *Outer Membrane Vesicles Released From Aeromonas Strains Are Involved in the Biofilm Formation*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 613650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.613650>
- Sharpe, S. W., Kuehn, M. J., & Mason, K. M. (2011). *Elicitation of Epithelial Cell-Derived Immune Effectors by Outer Membrane Vesicles of Nontypeable Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 79(11), 4361–4369. <https://doi.org/10.1128/IAI.05332-11>
- Sierra, G. V., Campa, H. C., Varcacel, N. M., Garcia, I. L., Izquierdo, P. L., Sotolongo, P. F., Casanueva, G. V., Rico, C. O., Rodriguez, C. R., & Terry, M. H. (1991). *Vaccine against group B Neisseria meningitidis: Protection trial and mass vaccination results in Cuba*. *NIPH Annals*, 14(2), 195–207; discussion 208-210.
- Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J.-M., & Forterre, P. (2008). *Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales*. *Research in Microbiology*, 159(5), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.015>
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (1994). *OmpA protein of Escherichia coli outer membrane occurs in open and closed channel forms*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(27), 17981–17987.
- Thagela, P., Yadav, R. K., Tripathi, K., Singh, P. K., Ahmad, A., Dahuja, A., & Abraham, G. (2018). *Salinity induced changes in the chloroplast proteome of the aquatic pteridophyte Azolla microphylla*. *Symbiosis*, 75(1), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0521-4>
- Tavano, R., Franzoso, S., Cecchini, P., Cartocci, E., Oriente, F., Aricò, B., & Papini, E. (2009). *The membrane expression of Neisseria meningitidis adhesin A (NadA) increases the proimmune effects of MenB OMVs on human macrophages, compared with NadA - OMVs, without further stimulating their proinflammatory activity on circulating monocytes*. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 143–153. <https://doi.org/10.1189/jlb.0109030>
- Toyofuku, M., Morinaga, K., Hashimoto, Y., Uhl, J., Shimamura, H., Inaba, H., Schmitt-Kopplin, P., Eberl, L., & Nomura, N. (2017). *Membrane vesicle-mediated bacterial communication*. *The ISME Journal*, 11(6), 1504–1509. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). *Types and origins of bacterial membrane vesicles*. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., & Eberl, L. (2012). *Identification of Proteins Associated with the Pseudomonas aeruginosa Biofilm Extracellular Matrix*. *Journal of Proteome Research*, 11(10), 4906–4915. <https://doi.org/10.1021/pr300395j>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M., & Nomura, N. (2015). *Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 226, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.08.013>
- Tran, F., & Boedicker, J. Q. (2019). *Plasmid Characteristics Modulate the Propensity of Gene Exchange in Bacterial Vesicles*. *Journal of Bacteriology*, 201(7), e00430-18, /jlb/201/7/JB.00430-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JB.00430-18>
- Uddin, M. J., Dawan, J., Jeon, G., Yu, T., He, X., & Ahn, J. (2020). *The Role of Bacterial Membrane Vesicles in the Dissemination of Antibiotic Resistance and as Promising Carriers for Therapeutic Agent Delivery*. *Microorganisms*, 8(5), 670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050670>
- van de Waterbeemd, B., Streefland, M., van der Ley, P., Zomer, B., van Dijken, H., Martens, D., Wijffels, R., & van der Pol, L. (2010). Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. *Vaccine*, 28(30), 4810–4816. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.082>
- van de Waterbeemd, B., Zomer, G., van den IJssel, J., van Keulen, L., Eppink, M. H., van der Ley, P., & van der Pol, L. A. (2013). *Cysteine Depletion Causes Oxidative Stress and Triggers Outer Membrane Vesicle Release by *Neisseria meningitidis*; Implications for Vaccine Development*. *PLoS ONE*, 8(1), e54314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054314>
- van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). *Outer membrane vesicles as platform vaccine technology*. *Biotechnology Journal*, 10(11), 1689–1706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). *Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504–544. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998>
- Villard, A., Boursier, J., & Andriantsitohaina, R. (2020). *Microbiota-derived extracellular vesicles and metabolic syndrome*. *Acta Physiologica*. <https://doi.org/10.1111/apha.13600>
- Wang, X., Eagen, W. J., & Lee, J. C. (2020). *Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(6), 3174–3184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915829117>
- Wang, X., Thompson, C. D., Weidenmaier, C., & Lee, J. C. (2018). Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nature Communications*, 9(1), 1379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03847-z>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, R., Tao, Y., Cao, Y., Zhou, Y., & Lin, H. (2020). *Streptococcus mutans Membrane Vesicles Harboring Glucosyltransferases Augment Candida albicans Biofilm Development*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581184. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581184>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., De Wever, O. (2015). *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- YashRoy, R. C. (2017). *Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria*. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* (pp. 341–367). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00015-9>
- Yeh, Y.-C., Comolli, L. R., Downing, K. H., Shapiro, L., & McAdams, H. H. (2010). *The Caulobacter Tol-Pal Complex Is Essential for Outer Membrane Integrity and the Positioning of a Polar Localization Factor*. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4847–4858. <https://doi.org/10.1128/JB.00607-10>
- Yu, Y., Wang, X., & Fan, G.-C. (2018). *Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(4), 514–533. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.82>
- Yun, J.-H., Sung, H., Kim, H. S., Tak, E. J., Kang, W., Lee, J.-Y., Hyun, D.-W., Kim, P. S., & Bae, J.-W. (2018). *Complete genome sequence of the halophile bacterium Kushneria konosiri X49T, isolated from salt-fermented Konosirus punctatus*. *Standards in Genomic Sciences*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0324-0>
- Yun, S. H., Lee, S.-Y., Choi, C.-W., Lee, H., Ro, H.-J., Jun, S., Kwon, Y. M., Kwon, K. K., Kim, S.-J., Kim, G.-H., & Kim, S. I. (2017). *Proteomic characterization of the outer membrane vesicle of the halophilic marine bacterium Novosphingobium pentaromativorans US6-1*. *Journal of Microbiology*, 55(1), 56–62. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6581-6>
- Zeikus, J. G., Hegge, P. W., Thompson, T. E., Phelps, T. J., & Langworthy, T. A. (1983). *Isolation and description of Haloanaerobium praevalens gen. Nov. And sp. Nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments*. *Current Microbiology*, 9(4), 225–233. <https://doi.org/10.1007/BF01567586>
- Zhang, G., huihua, G., & Yi, L. (2013). *Stability of halophilic proteins: From dipeptide attributes to discrimination classifier*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.10.031>
- Zhang, Y., Fang, Z., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2019). *Design of Outer Membrane Vesicles as Cancer Vaccines: A New Toolkit for Cancer Therapy*. *Cancers*, 11(9), 1314. <https://doi.org/10.3390/cancers11091314>