



**İNTRAGENİK ANTİMİKROBİYAL PEPTİD
TÜREVLERİNİN KARAKTERİZASYONU, TEK ve
ÇİFT TÜRLÜ BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Güler Tuba BUĞDACI

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI**

2025

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İNTRAGENİK ANTİMİKROBİYAL PEPTİD TÜREVLERİNİN
KARAKTERİZASYONU, TEK ve ÇİFT TÜRLÜ BİYOFİLM OLUŞUMU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Güler Tuba BUĞDACI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**İNTRAGENİK ANTİMİKROBİYAL PEPTİD TÜREVLERİNİN
KARAKTERİZASYONU, TEK ve ÇİFT TÜRLÜ BİYOFİLM OLUŞUMU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Ayşenur YAZICI danışmanlığında, Güler Tuba BUĞDACI tarafından hazırlanan bu çalışma 16 / 05 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırmalar Projesi Koordinatörlüğü tarafından 2024/016 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16 / 05 / 2025

İmzası

Güler Tuba BUĞDACI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNTRAGENİK ANTİMİKROBİYAL PEPTİD TÜREVLERİNİN KARAKTERİZASYONU, TEK ve ÇİFT TÜRLÜ BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Güler Tuba BUĞDACI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur Yazıcı

Çoğu enfeksiyon türü, özellikle kronik enfeksiyonlar, polimikrobiyal kökenlidir ve bu tür enfeksiyonlarda birden fazla mikroorganizma etkileşim hâlinde rol oynamaktadır. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*, kronik polimikrobiyal enfeksiyonlarda etkileşimleri iyi bilinen iki önemli bakteriyel patojendir. Yapılan çalışmalar, bu iki bakterinin in vivo birlikte bulunmasının hastalık seyri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın birlikte çift türlü biyofilm oluşturabilmesi için uygun bir besiyeri ortamı belirlenmiş ve çift türlü biyofilm oluşumu gram boyama, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve floresan mikroskopisi gibi mikroskobik yöntemlerle doğrulanmıştır. Veritabanı filtreleme teknolojisi kullanılarak APD3 veritabanında yer alan antimikrobiyal peptitler arasından seçilen Hs02 peptidinden yola çıkarak yeni türevler (VR-10 ve GV-13) tasarlanmıştır. Bu antibiyofilm peptitler HPLC ile saflaştırılmış ve MS ile doğrulaması yapılmıştır. Saflaştırılan peptitlerin karakterizasyonu ise CD spektroskopisi ve FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonun ardından, peptitlerin hem tek hem de çift türlü biyofilm modellerine karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri değerlendirilmiş, biyofilm yapıları ve hücre morfolojileri SEM ve floresan mikroskopisi ile incelenmiştir. Ayrıca, bu peptitlerin bakteri hareketliliği üzerindeki etkileri ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri de analiz edilmiştir. Virülansla ilişkili genlerin (*icaA*, *hla*, *agrA*, *blaZ*, *pbp2a*, *lasB*, *pilA*, *algD* ve *oprL*) ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, MTT testi ile peptitlerin sitotoksik etkileri ve hemoliz testi ile hemolitik aktiviteleri değerlendirilmiş; her iki peptidin de güvenli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, biyoinformatik analizler sonucu potansiyel antibiyofilm aktivitesi gösterdiği öngörülen VR-10 ve GV-13 peptitlerinin, antimikrobiyal özellikleri ile birlikte tek ve çift türlü biyofilm modellerine karşı etkili olabilecek yeni adaylar olduğu ortaya konmuştur.

2025, 106 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal Peptitler, Antibiyofilm Peptitler, VR-10, GV-13, Çift Türlü Biyofilm

ABSTRACT

MS. Thesis

CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF INTRAGENIC ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVATIVES AGAINST MONO AND DUAL- SPECIES BIOFILM FORMATION

Güler Tuba BUĞDACI

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Most types of infections, especially chronic infections, are of polymicrobial origin, and multiple microorganisms play a role in such infections. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are two important bacterial pathogens whose interactions are well known in chronic polymicrobial infections. Studies show that the coexistence of these two bacteria in vivo has an effect on the course of the disease. In this thesis study, a suitable medium was determined for *S. aureus* and *P. aeruginosa* to form a dual-species biofilm together, and the formation of the dual-species biofilm was confirmed by microscopic methods such as gram staining, scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence microscopy. New derivatives (VR-10 and GV-13) were designed based on the Hs02 peptide selected from the antimicrobial peptides in the APD3 database using database filtering technology. These antibiofilm peptides were purified by HPLC and confirmed by MS. The characterization of the purified peptides was performed by CD spectroscopy and FTIR. After characterization, the antimicrobial and antibiofilm activities of the peptides against both single and double biofilm models were evaluated, and their biofilm structures and cell morphologies were examined by SEM and fluorescence microscopy. In addition, the effects of these peptides on bacterial motility and cell viability were also analyzed. Changes in the expression levels of virulence-associated genes (*icaA*, *hla*, *agrA*, *blaZ*, *pbp2a*, *lasB*, *pilA*, *algD* and *oprL*) were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method. In addition, the cytotoxic effects of the peptides were evaluated by MTT test and their hemolytic activities were evaluated by hemolysis test; both peptides were found to be safe. As a result, it has been revealed that the peptides VR-10 and GV-13, which are predicted to show potential antibiofilm activity as a result of bioinformatic analyzes, are new candidates that can be effective against single and double type biofilm models with their antimicrobial properties.

2025, 106 page

Keywords: Antimicrobial Peptides, Antibiofilm Peptides, VR 10, GV 13, Dual Species Biofilm

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlardan “Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri” programı ile beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmamın yürütüldüğü ve 122Z741 numaralı proje ile desteklenen TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının her aşamasında bilgi, tecrübe ve desteğini büyük bir özveriyle paylaşan, akademik ve kişisel gelişimime katkılarda bulunan değerli hocam Doç. Dr. Ayşenur YAZICI’ya ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ’ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi, destek ve iş birliğiyle yanımda olan değerli ekip arkadaşlarım Şeymanur ÇOBANOĞLU ve Erdem ERKENGİZ’e içten teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreç boyunca bana gösterdiği destek ve verdiği güven için Yusuf DADAŞ’a teşekkür ederim.

Manevi destekleri, sabırları ve her koşulda yanımda olarak verdikleri güçle bu süreci benim için daha anlamlı kılan, iyi ve kötü her anımda desteğini hissettiren kıymetli dostlarım Ruhane TOSUNOĞLU ve Simay ALDAĞ’a gönülden teşekkür ederim.

Hayatım boyunca koşulsuz sevgisi, sonsuz desteği ve dualarıyla her daim yanımda olan canım annem Mehtap BUĞDACI’ya, her zaman örnek aldığım kıymetli babam Murat BUĞDACI’ya, yanımda olarak bana güç veren abim Abdulkadir BUĞDACI’ya ve neşesiyle, sevgisiyle hayatıma renk katan kardeşim Zeynep Beril BUĞDACI’ya gönülden teşekkür ederim.

Güler Tuba BUĞDACI

Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm	1
1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları	3
1.3. Polimikrobiyal Biyofilmler	5
1.3.1. Polimikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.4. Antimikrobiyal Peptitler.....	9
1.5. AMP'lerin Sınıflandırılması	11
1.5.1. AMP'lerin kaynaklara göre sınıflandırılması	11
1.5.2. Aktiviteye göre sınıflandırma	12
1.5.3. Amino asit zengini türlere göre AMP'lerin sınıflandırılması.....	13
1.5.4. AMP yapılarına dayalı sınıflandırma	13
1.6. AMP'lerin Etki Mekanizmaları.....	14
1.6.1. AMP'lerin planktonik bakterilere karşı etki mekanizması	16
1.7. Antibiyofilm Peptitler (ABP).....	16
1.8. İntragenik Antimikrobiyal Peptitler (IAP).....	19
1.8.1. İntragenik antimikrobiyal peptitlerin (IAP'ler) seçimi.....	20
1.8.2. <i>Homo sapiens</i> IAP'ler	21
1.8.3. Hs02 peptidi	23
1.9. Tez Çalışmasının Amacı	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29

3.1.1. Cihazlar ve bakteri suşları	29
3.1.2. Besiyerleri ve solüsyonların hazırlanışları	30
3.1.2.1. Mueller-hinton agar (MHA).....	30
3.1.2.2. Mueller-hinton broth (MHB)	31
3.1.2.3. Patates dekstroza agar (PDA)	31
3.1.2.4. Triptik-soy broth (TSB)	31
3.1.2.5. Mannitol salt agar.....	31
3.1.2.6. Pseudomonas agar base.....	32
3.1.2.7. Soft besiyerleri	32
3.1.2.8. RPMI 1640 ve morfolinopropanesüfonik asit (MOPS) solüsyonu.....	32
3.1.2.9. %0,1'lik kristal viyole (CV) boyası hazırlama	32
3.1.2.10. %30'luk asetik asit	33
3.1.2.11. Agaroz jel hazırlama	33
3.1.2.12. 10X TBE buffer.....	33
3.1.2.13. %0,1 Dietil pirokarbonat (DEPC)'li su hazırlama	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Tek ve dual kültürlerin oluşturulması	34
3.2.1.1. Tek kültürler.....	34
3.2.1.2. Dual kültürler	34
3.2.1.3. Dual kültürlerin optimize edilmesi	34
3.2.1.3.1. Büyüme kinetiği.....	34
3.2.1.3.2. Rekabet testi	35
3.2.1.3.3. Dual kültür besiyeri optimizasyonu	35
3.2.1.3.4. Biyofilm oluşumu	36
3.2.2. Mikroskopik analizler	36
3.2.2.1. Gram boyama	36
3.2.2.2. Floresan mikroskobu analizi	37
3.2.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	37
3.2.3. Peptitlerin sentezi	37
3.2.3.1. Karakterizasyon.....	38
3.2.3.1.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	38
3.2.3.1.2. Circular dichroism (CD) spektrometresi	38
3.2.4. Antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi.....	38
3.2.4.1. Mikrodilüsyon testi (MIC belirlenmesi)	38

3.2.4.2. Kristal viyole (CV) testi (MBIC Belirlenmesi).....	39
3.2.4.3. Biyofilm eradikasyon testi (MBEC belirlenmesi).....	40
3.2.5. Mikroskopik analizler	40
3.2.5.1. Gram boyama	40
3.2.5.2. Floresan mikroskobu analizi	41
3.2.5.3. SEM analizi	41
3.2.6. Bakteri hareketliliğinin incelenmesi	42
3.2.6.1. Seğirme hareketinin incelenmesi (twitching motility)	42
3.2.6.2. Kaynaşma hareketinin incelenmesi (swarming motility).....	42
3.2.7. Hücre canlılığı tespit kiti-8 (CVDK-8) Testi	42
3.2.8. Gen ekspresyon analizleri	43
3.2.8.1. Bakteri kültürlerinin hazırlanması	43
3.2.8.2. RNA izolasyonu	43
3.2.8.3. cDNA sentezi	44
3.2.8.4. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR).....	44
3.2.9. Hemolitik ve sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi	46
3.2.9.1. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi.....	46
3.2.9.2. MTT testi.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	47
4.1. Dual Kültürlerin Optimize Edilmesi	47
4.1.1. Büyüme eğrisinin oluşturulması	47
4.1.2. Rekabet testi	48
4.1.3. Dual kültürler için besiyeri ortamının geliştirilmesi	49
4.1.4. Biyofilm oluşumu	52
4.1.5. Gram boyama	53
4.1.6. Floresan mikroskobu analizi	54
4.1.7. SEM analizi	55
4.2. Peptitlerin Sentezi	56
4.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	58
4.2.2. Kütle spektrometrisi (MS)	59
4.3. Karakterizasyon.....	60
4.3.1. FTIR analizi	60
4.3.2. CD spektroskopisi	60
4.4. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi.....	62

4.4.1. Mikrodilüsyon testi (MIC belirlenmesi)	62
4.4.2. Kristal viyole (CV) testi (MBIC belirlenmesi)	64
4.4.3. Biyofilm eradikasyon testi (MBEC belirlenmesi).....	67
4.5. Mikroskopik Analizler	70
4.5.1. Gram boyama	70
4.5.2. Floresan mikroskopisi	71
4.5.3. SEM analizi	73
4.6. Bakteri Hareketliliğinin İncelenmesi	77
4.6.1. Seğirme hareketinin incelenmesi (twitching motility).....	77
4.6.2. Kaynaşma hareketinin incelenmesi (swarming motility).....	78
4.7. CVDK-8 Testi	82
4.8. Gen Ekspresyon Analizleri	84
4.8.1. RNA izolasyonu	84
4.8.2. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR).....	85
4.9. Hemolitik ve Sitotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi	90
4.9.1. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi.....	90
4.9.2. MTT testi.....	91
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	93
KAYNAKLAR	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

CFU	Koloni Oluşturan
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mililitre
ng	Nanogram
OD	Optik Dansite
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABP	Antibiyofilm Peptitler
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
APD3	Antimikrobiyal Peptit Veritabanı
CD	Dairesel Dikroizm
CV	Kristal Viyole
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
EPS	Hücre Dışı Polisakkarit Matriks
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HDFa	Human Dermal Fibroblast, Adult
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IAP	İntragenik Antimikrobiyal Peptitler
KF	Kistik Fibröz
LPS	Lipopolisakkaritler
LTA	Lipoteiokoik asit
qRT-PCR	Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimer Zincir Reaksiyonu
QS	Quorum Sensing
MBEC	Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MBIC	Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MOPS	Morfolinopropansüfonik Asit
MS	Kütle Spektrometrisi
PBS	Fosfat Buffer Salin
PI	Propidyum İyodür
SCV	Küçük Koloni Varyantları
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TBE	Tris Borat EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. EPS yapısının şematik gösterimi	2
Şekil 1.2. Biyofilm oluşum şeması	5
Şekil 1.3. Glikoz varlığında iki türün bir arada bulunabilirliği.....	7
Şekil 1.4. Stres varlığında <i>S. aureus</i> 'un SCV varyant döngüsü.....	8
Şekil 1.5. AMP zaman çizelgesi	10
Şekil 1.6. AMP'lerin sınıflandırılması.....	11
Şekil 1.7. AMP'lerin yapısal sınıflandırılması	14
Şekil 1.8. AMP'lerin membran hedefli etki modelleri	15
Şekil 1.9. ABP'lerin olası etki mekanizmaları.....	16
Şekil 1.10. Biyoaktif peptitler.....	19
Şekil 1.11. Hs02 peptidinin üç boyutlu yapısı	24
Şekil 4.1. Bakteriyel büyüme eğrisi.....	47
Şekil 4.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın <i>S. aureus</i> 'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.....	48
Şekil 4.3. Dual kültür besiyeri denemesine ait plate görüntüsü.....	49
Şekil 4.4. TSB+%1 Glikoz+ %2,5 NaCl besiyerinde gelişen bakterilerin petri görüntüleri	51
Şekil 4.5. Tek ve dual kültürlerde biyofilm oluşumu	52
Şekil 4.6. Tek ve dual kültürlerin gram boyama sonuçları	53
Şekil 4.7. Dual kültür Syto 9/PI boyama sonucu	54
Şekil 4.8. Dual kültür SEM analizi görüntüsü	55
Şekil 4.9. Dizayn edilen peptit dizilerine ait sarmal tekerlek grafiği.....	57
Şekil 4.10. Peptitlerin pepfold analizi sonuçları	57
Şekil 4.11. VR-10 peptidinin sentez sonucu.....	58
Şekil 4.12. GV-13 peptidinin sentez sonucu.....	58
Şekil 4.13. VR-10 sentez sonucu	59
Şekil 4.14. GV-13 sentez sonucu.....	59
Şekil 4.15. VR-10 ve GV-13'ün FTIR analizi sonuçları	60

Şekil 4.16. VR-10 ve GV-13 peptitlerinin CD analiz sonuçları	61
Şekil 4.17. GV-13'ün <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi	65
Şekil 4.18. VR-10'nun <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi	66
Şekil 4.19. Peptitlerin dual biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi.....	66
Şekil 4.20. GV-13'in oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi.....	68
Şekil 4.21. VR-10'nun oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi	68
Şekil 4.22. Peptitlerin oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi.....	69
Şekil 4.23. Peptitlerin dual kültüre karşı etkinliği	70
Şekil 4.24. 2MIC konsantrasyonundaki GV-13'ün <i>P. aeruginosa</i> 'ya ve <i>S. aureus</i> 'a karşı canlılık değerlendirmesi	71
Şekil 4.25. 2MIC konsantrasyonundaki VR-10'nun <i>P. aeruginosa</i> 'ya ve <i>S. aureus</i> 'a karşı canlılık değerlendirmesi	72
Şekil 4.26. 2MIC konsantrasyonundaki VR-10'nun ve GV-13'ün dual kültüre karşı canlılık değerlendirmesi	73
Şekil 4.27. GV-13'ün <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı ½ MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri	74
Şekil 4.28. VR-10'nun <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı ½ MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri	75
Şekil 4.29. Peptitlerin dual kültüre karşı ½ MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri	76
Şekil 4.30. GV-13'ün <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki etkinliği	77
Şekil 4.31. VR-10'nun <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki etkinliği	78
Şekil 4.32. GV-13'ün <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki etkinliği.....	79
Şekil 4.33. VR-10'nun <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki etkinliği.....	80
Şekil 4.34. Peptitlerin dual kültür üzerindeki etkinliği	81
Şekil 4.35. GV-13 uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları.....	82
Şekil 4.36. VR-10 uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları.....	83
Şekil 4.37. Peptitlerin uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları	83

Şekil 4.38. Dual RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	85
Şekil 4.39. GV-13'ün <i>P. aeruginosa</i> ve <i>S. aureus</i> 'da seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.40. VR-10'nu <i>P. aeruginosa</i> ve <i>S. aureus</i> 'da seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.41. Peptitlerin dual kültür için seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi	88
Şekil 4.42. Peptitlerin hemolitik aktivite sonuçları.....	90
Şekil 4.43. Peptitlerin hemolitik aktivitesinin belirlenmesi.....	91
Şekil 4.44. Hücre canlılığına peptitlerin etkisi.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antibiyofilm aktivitesine sahip bazı peptitler.....	17
Çizelge 1.2. Hs IAP'ler.....	22
Çizelge 1.3. Cihazlar ve modelleri.....	29
Çizelge 1.4. Kullanılan patojen suşlar ve kodları	30
Çizelge 1.5. Dual besiyeri denemesi.....	36
Çizelge 1.6. Peptitler ve birincil yapıları	38
Çizelge 1.7. cDNA 2X RT-Master Mix.....	44
Çizelge 1.8. qRT-PCR'da kullanılan primerler	45
Çizelge 1.9. Seçici besiyerlerinde gelişen bakteri koloni sayıları ve morfolojileri	50
Çizelge 1.10. ABP moleküllerinin özellikleri.....	56
Çizelge 1.11. CD spektroskopisi analiz sonuçları	61
Çizelge 1.12. GV-13 peptidinin tek ve dual bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.....	62
Çizelge 1.13. VR-10 peptidinin tek ve dual bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri	63

1. GİRİŞ

1928 yılında penisilinin keşfiyle birlikte antimikrobiyal ilaçlar, mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde bir çözüm yolu olarak kabul edilmiş ve enfeksiyon hastalıklarının insidansında önemli ölçüde bir azalma sağlamıştır (Hou et al. 2023).

Fakat, zamanla antibiyotik tüketimindeki artış, bakterilerdeki mutasyonlar, yatay gen transferi ve direnç genlerinin oluşumu gibi faktörler antimikrobiyal direnç probleminin gelişmesine yol açmıştır. Mutasyon kaynaklı direnç, antibiyotik alımının azalmasına, antibiyotik hedef bölgelerinin modifikasyonuna, salgı pompalarının aşırı ekspresyonuna ve antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretilmesine neden olabilir (Arslan et al. 2023).

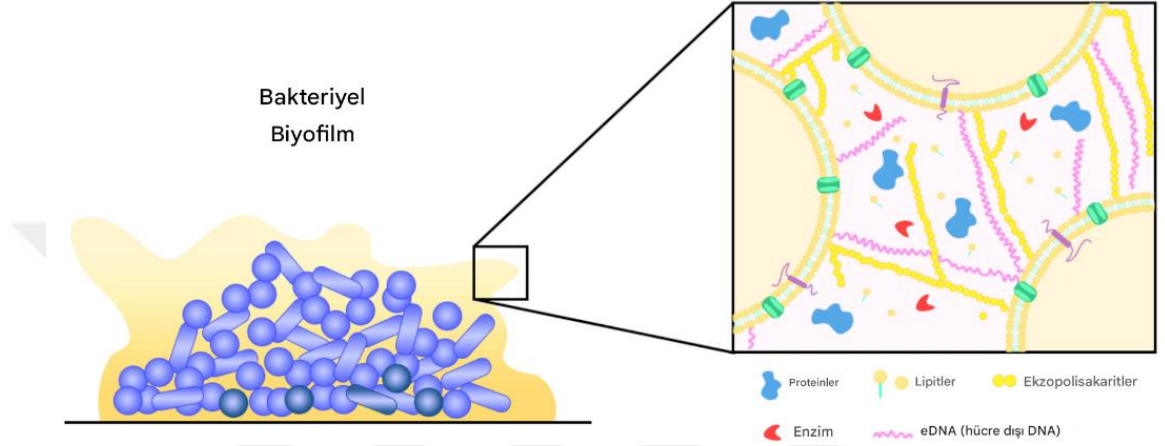
Yatay gen transferi, antimikrobiyal direnç genlerinin yayılmasında kritik bir role sahiptir. Buna ek olarak, çevrede direnç genlerinin ve dirençli bakterilerin varlığı da antimikrobiyal direncin yayılma riskini artırmaktadır (Lin et al. 2021). Ancak bakteriler yalnızca hücre seviyesinde direnç geliştirmez, aynı zamanda topluluk halinde organize olarak yaşamaları da antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu doğrultuda, biyofilm oluşum mekanizmaları antibiyotik direnç ile doğrudan ilişkilidir (Arslan et al. 2023).

1.1. Biyofilm

Biyofilm ilk kez 1978 yılında tanımlanmış ve keşfi ise 1684 yılında Antoni Van Leeuwenhoek'e atfedilmiştir (Olivares et al. 2020). Biyofilmler, mikroorganizmaların abiyotik veya biyotik yüzeylere yapıştığı ve hücre dışı polisakkarit matrisine (EPS) gömüldüğü mikrobiyal topluluklardır. Bir biyofilm yapısı esas olarak mikroorganizmalar tarafından salgılanan metabolitlerden, parçalanmış hücrelerden, geri dönüştürülen hücre dışı polisakkaritlerden, hücre dışı DNA'dan, lipidlerden ve proteinlerden oluşur (Karygianni et al. 2020). Biyofilmin EPS bileşimi türden türe değişiklik gösterebilir ancak esas olarak polisakkaritlerden ve yaklaşık %97 oranında sudan oluşmaktadır (Sharma et al. 2022).

1. GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmaların hem yüzeylere hem de komşu hücrelere tutunmasını sağlayarak üç boyutlu bir yapı oluşturur. Bu yapı, EPS aracılığıyla mikroorganizmalar arasında fiziksel ve kimyasal etkileşimleri desteklemektedir. Biyofilm matrisi ayrıca bakteriler için bir çevre oluşturmaktadır. Suyu, besinleri ve hücre dışı enzimleri tutarak, bakterileri antibiyotiklerden, çevresel streslerden ve konak bağışıklık sisteminden korumaktadır (Chan et al. 2021).



Şekil 1.1.EPS yapısının şematik gösterimi (Nishikawa and Kobayashi 2021).

Biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, bilinen antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, metabolik aktivitenin azalması, büyüme hızındaki düşüş ve virülans faktörlerinin üretimi ile karakterize edilen fenotipik ve gen ekspresyonunda değişiklikler sergilemektedir. Biyofilm içinde bulunan mikrobiyal topluluklar, planktonik formdaki mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında büyüme hızı ve gen ekspresyonu açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. Biyofilmler, çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmekte olup, doğal ve yapay ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Tıbbi implantlar, canlı dokular, su dağıtım sistemleri, boru hatları, hastane yüzeyleri, gıda işleme tesisleri ve diğer endüstriyel yüzeyler biyofilm oluşumunun gözlemlendiği başlıca alanlar arasındadır (Rather et al. 2021).

Biyofilmler, ciddi ve tedaviye dirençli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonlar, diş çürükleri, kistik fibrozda (KF) görülen kronik akciğer enfeksiyonları ve endokardit gibi çeşitli klinik tablolarda biyofilm oluşumu önemli bir patojenite faktörü olarak rol oynamaktadır. Biyofilmler, mikroorganizmaların konak savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanmasını

1. GİRİŞ

sağlayarak enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve kronikleşmesine yol açmaktadır (Zea et al. 2020).

1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu, çok faktörlü ve karmaşık bir süreç olup, aynı bakteri türünün planktonik formundan farklı olarak belirli bir gen kümesinin ekspresyonunu gerektirir. Bu süreç, quorum sensing (QS) mekanizması ve transkripsiyonel düzenleme yoluyla kontrol edilen spesifik sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenmektedir (Goel et al. 2021).

QS, hücrelerin eşik popülasyon yoğunluğuna ulaştıklarında davranışlarını koordine etmelerine olanak tanıyan bir bakteri iletişim sistemidir (Chen et al. 2024). Mikroorganizmalar arasında biyofilm oluşum mekanizmaları farklılık gösterse de genel olarak beş temel aşamadan oluşmaktadır; adsorpsiyon, biyotik veya abiyotik bir yüzeye başlangıçta adezyon, mikrokoloni gelişimi, biyofilmin olgunlaşması ve planktonik hücrelerin dağılımıdır (Goel et al. 2021).

Yüzeylere yapışmaya yardımcı olan bakteriyel adezinlerin üretimi, ilk aşama olan adsorpsiyonun bir özelliğidir. Planktonik formdaki bakteriler, çeşitli çevresel faktörlerin etkisi altında herhangi bir yüzeye bağlanabilirler. Etkin adezinlere rağmen, sınır tabakasındaki hidrodinamik, itici kuvvetler ve yapıştırıcı moleküllerin yetersiz üretimi ve işlevi nedeniyle bu aşamada bağlanma kırılmalı ve genellikle geçicidir (Luo et al. 2022).

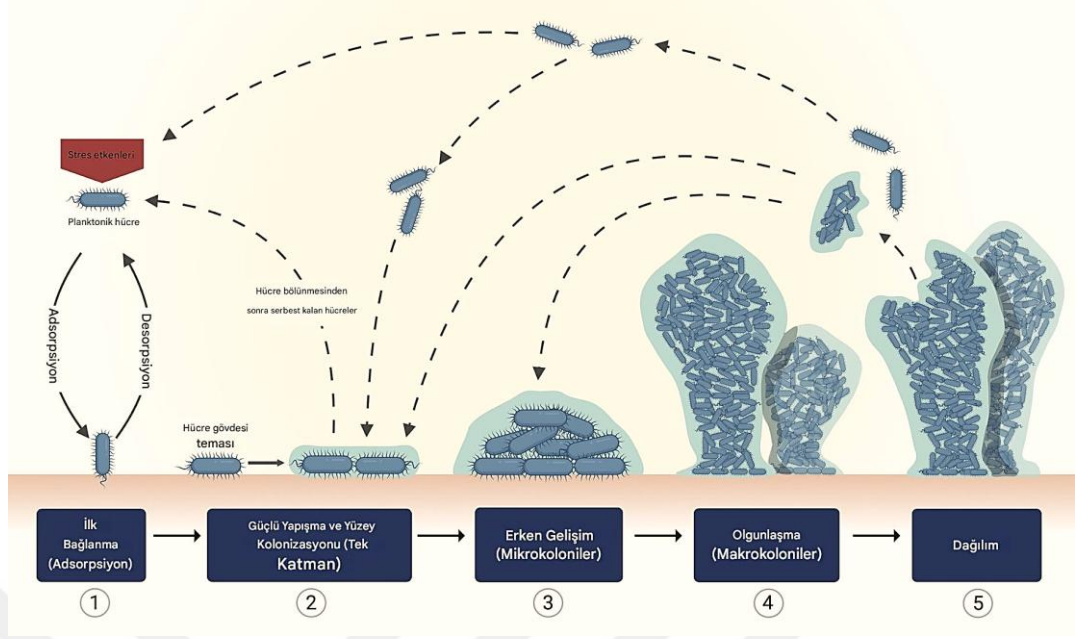
Bu bağlanma süreci, besin konsantrasyonu, pH seviyesi ve yüzey sıcaklığı gibi parametreler tarafından belirlenen fizikokimyasal kuvvetlerden etkilenmektedir. Yüzeye tutunma mekanizması; hidrofobik etkileşimler, elektrostatik çekim, Van der Waals kuvvetleri ve spesifik protein-bağlanma etkileşimleri gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Bakteriler yüzeye, flagella ve pili gibi bakteri uzantıları veya fiziksel kuvvetler aracılığıyla tutunurlar (Goel et al. 2021).

1. GİRİŞ

İlk tutunmanın ardından, bakteriler yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanarak (adezyon) agregatlar oluşturur. Bu süreç ilerledikçe, hücre bölünmesi ve çoğalması sonucu mikro koloniler meydana gelir. Mikrokoloni yapılarının oluşumunu takiben, dış matriksin ana bileşenlerinden biri olan EPS sentezlenerek kompleks, çok katmanlı biyofilm yapısının oluşumuna katkıda bulunur (Sharma et al. 2023).

Mikrokolonilerin oluşumu sırasında, kapsüllenmiş bakteriler iç mikropları destekleyen ve onları antibakteriyel moleküllere karşı koruyan büyük miktarda EPS üretir (Luo et al. 2022). Mikrokolonilerin oluşumunu takiben, hücre proliferasyonu ve bakteriyel agregasyon, QS mekanizması tarafından düzenlenerek optimal hücre yoğunluğuna ulaşana kadar EPS senteziyle birlikte artmaya devam eder. Bu süreç, çok katmanlı mikrokolonilerin oluşumunu teşvik etmektedir. Mikrokoloniler zamanla birleşerek daha büyük ve kompleks yapılar olan makrokolonileri oluşturur ve biyofilmin kalınlaşmasına katkıda bulunur. Olgun biyofilm yapısı, gözenekli bir matriks içerisinde gaz ve besin alışverişi kanalları ile yoğun paketlenmiş hücre bölgelerinden meydana gelir (Sharma et al. 2023).

Biyofilmin olgunluğa ulaşmasının ardından, belirli çevresel koşullara veya genetik düzenleyici mekanizmalara bağlı olarak ayrılma ve dağılma süreçleri devreye girer, yapısal bir bozulma meydana getirir (Guzmán-Soto et al. 2021). Bu ayrışma sonucunda serbest hale gelen bakteriyel hücreler, bir yüzeye yeniden tutunabilir ve ikincil bir biyofilm oluşturabilir veya ara ortamda serbest halde kalabilir (Luo et al. 2022).



Şekil 1.2. Biyofilm oluşum şeması (Guzmán-Soto et al. 2021).

1.3. Polimikrobiyal Biyofilmler

Polimikrobiyal biyofilmler, bir biyofilmin içerisinde eş zamanlı olarak birden fazla mikroorganizma türünün bulunması durumunu ifade eder (Allkja et al. 2023). Tek tür biyofilmler daha önce kapsamlı olarak incelenmiş olmasına rağmen, daha fazla araştırma enfeksiyonların çoğunun polimikrobiyal biyofilmlerden kaynaklandığını göstermiştir (Ma et al. 2020).

Polimikrobiyal biyofilmler, birden fazla türün neden olduğu enfeksiyonlar sırasında oluşarak, dünya genelinde giderek artan ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Pek çok hastalıkta tek bir patojenin etken olduğu nadiren görülürken, mikroorganizmalar genellikle koagregasyon halinde bulunur. Bu durum, polimikrobiyal biyofilm oluşumunu teşvik ederek enfeksiyonların karmaşıklığını ve antimikrobiyal tedavilere karşı direnç oranlarını artırmaktadır (Kulshrestha and Gupta 2022).

Polimikrobiyal enfeksiyonlar da türler arasında hem sinerjik hem de antagonistik etkileşimler olabilir. Polimikrobiyal etkileşimlerin incelenmesi, virülans faktörü ifadesinin analizi, antimikrobiyal duyarlılık kalıpları ve bakteriyel davranışın doğrudan

gözlemlenmesi dahil olmak üzere çeşitli metodolojiler yoluyla ele alınabilmektedir (Mitra et al. 2025).

1.3.1. Polimikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*

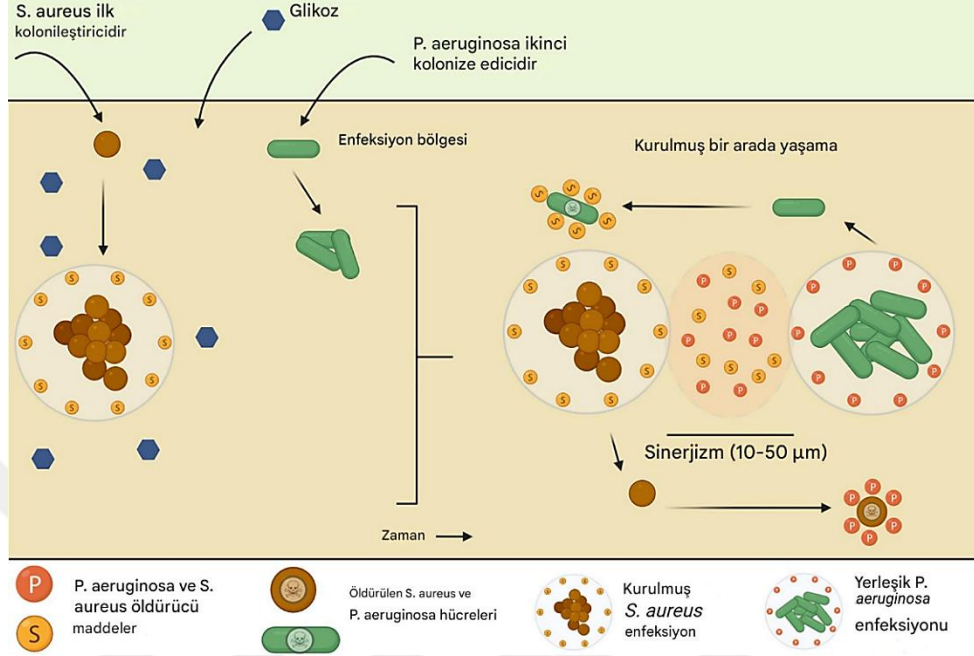
Kronik enfeksiyonlara en fazla neden olan *P. aeruginosa* ve *S. aureus* birden fazla enfeksiyon ortamında bir arada bulunur ve her ikisi de ortadan kaldırılması zor olabilen biyofilmler oluşturur. *P. aeruginosa* ve *S. aureus*, KF'li hastalarda en yaygın solunum yolu patojenlerinden ikisidir ve her ikisi de bu hastalarda zayıf akciğer fonksiyonu ve klinik sonuçlarla ilişkilidir (Orazi et al. 2019).

P. aeruginosa ve *S. aureus*'un aralarındaki ilişkinin doğası gereği rekabetçi olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa*, piyosiyanın, hidrojen siyanür ve alkil-hidroksikinolin N-oksitler gibi çeşitli toksinlerin üretimi nedeniyle yakın mesafede bulunduğu *S. aureus*'un büyümesini engelleyebilir ve hatta ölümüne neden olabilir. Bu toksinler *S. aureus*'un elektron taşıma zincirini de bloke edebilir. Bu rekabete rağmen, *S. aureus* genellikle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında varlığını sürdürür. Bu durum, *P. aeruginosa*'nın oldukça viskoz biyofilmlerinde hücre göçünün kısıtlanmasıyla ilişkili olabilir. *S. aureus* biyofilm oluşumunu artırarak, küçük koloni varyantları (SCV) oluşumu gibi *P. aeruginosa* toksinlerinin etkisini ortadan kaldırmak için farklı mekanizmalar kullanabilir (Magalhães et al. 2019).

S. aureus'un kendini koruyabildiği başka bir mekanizma, *P. aeruginosa*'yı öldürdüğü bilinen organik asitler oluşturarak glikozun parçalanmasıdır. KF hastalarında yüksek glikoz seviyeleri bulunmuştur ve yüksek kan glikoz seviyelerine sahip KF hastalarının, normal kan glikoz seviyelerine sahip hastalara göre her iki suşla da eş zamanlı enfekte olma olasılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. *S. aureus*, ortamda glikoz mevcut olduğunda büyüme ortamını asitleştirir, *P. aeruginosa*'nın büyümesini sınırlar ve *P. aeruginosa*'yı inhibe eden madde üreterek, bir popülasyon oluşturur. *P. aeruginosa*'da iki türü birbirinden uzak tutan *S. aureus*'u inhibe eden maddeler üretir. Bu şekilde, iki türün bir arada bulunması, örneğin

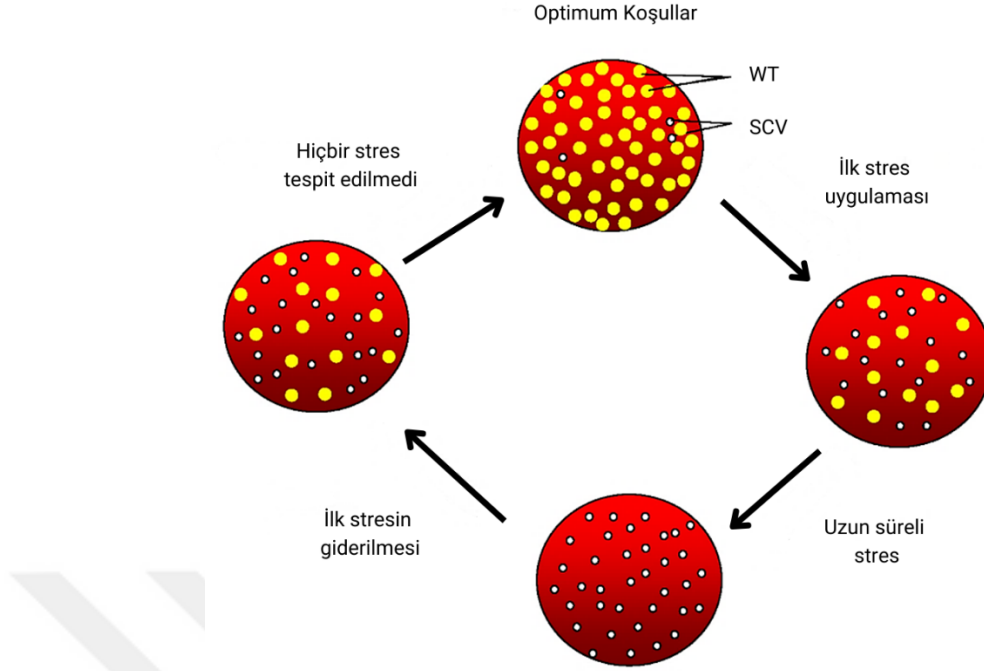
1. GİRİŞ

artan virölans ve antibiyotik toleransı gibi bir sinerjiyle birlikte, eş enfeksiyonlarda ayrı tek tür kümeleri olarak görülür (Kvich et al. 2022).



Şekil 1.3. Glikoz varlığında iki türün bir arada bulunabilirliği (Kvich et al. 2022).

S. aureus'un SCV varyantları, kendisini zorlu bir ortamdan, stres gibi etkilere ve antibiyotik tedavilerinden koruduğu bir durumu ifade eder. Bu SCV varyantları yarı uykuda, yavaş büyüyen bir bakteri alt popülasyonunu oluşturur. Agarlı besiyerlerinde daha küçük kolonilerin oluşumu, durgun metabolizma, azalmış hemolitik ve koagülaz aktiviteleri, azalmış karbonhidrat kullanımı, düşük virölans potansiyeli ve yükselmiş antibiyotik direnci gibi kendine özgü fenotipik ve patojenik özellikler barındırır (Loss et al. 2019).



Şekil 1.4. Stres varlığında *S. aureus*'un SCV varyant döngüsü. Optimum koşullarda WT popülasyonları baskındır, fakat stres durumunda *S. aureus* SCV fenotipine geçerek kendini korur. Stresin giderilmesi ile popülasyonlar WT haline geri döner. (WT;Yabanıl tip) (Onyango et al. 2013).

Ek olarak, *P. aeruginosa*'dan elde edilen ekzoürünlerin bir virülans faktörü olan stafiloksantin üretimini teşvik ettiği ve *S. aureus*'un virülansını daha da artırdığı gösterilmiştir. *S. aureus*'un bir ortak kültürde *P. aeruginosa*'la birlikte var olabildiği zaman, antibiyotiklere karşı toleransın önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Landa et al. 2024).

P. aeruginosa, enfeksiyon sırasında 2-heptil-4-hidroksikinolin N- oksit (HQNO), sideroforlar, ramnolipidler ve fenazinler dahil olmak üzere, QS ile düzenlenen antimikrobiyal ekzoürünler salgılar. HQNO ve iki *P. aeruginosa* sideroforu olan pioverdin ve piyoşelinin, *S. aureus*'u fermantasyonlu bir yaşam tarzına yönlendirdiği gösterilmiştir. Ramnolipidler ise hücre zarı bütünlüğünü bozmaktadır. Fenazinler, *S. aureus* metabolizmasını engelleyerek, demir alınımasını ve biyofilm gelişimini sağlar. KF, aljinatı aşırı üreten *P. aeruginosa* izolatlarının ortaya çıkmasıyla belirgin olan bir hastalıktır. *P. aeruginosa* tarafından aljinatın aşırı üretimi, ekzoürünlerin transkripsiyonel aşağı regülasyonuna neden olarak *S. aureus*'a karşı virülansın azalmasına yol açar. Bu durum bu iki bakterinin *in vivo*'da beraber yaşayabileceğini gösterir (Price et al. 2020).

Polimikrobiyal biyofilmlerin yaygınlığı ve mevcut antibiyotiklerin yetersizliği göz önünde bulundurulduğunda, bu dirençli yapıların hem biyofilm matrisini hem de mikroorganizmaları hedef alacak şekilde yeni ajanlar ve stratejilerle kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu doğrultuda, biyofilm oluşumunda kritik rol oynayan QS, EPS sentezi, biyofilmle ilişkili gen ekspresyonu, mikrobiyal hareketlilik, yapışma ve dağılım gibi süreçleri düzenleyen sinyal yollarını hedefleyen, toksik olmayan ve yüksek etkinliğe sahip antibiyofilm ve antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yönelik yeni yaklaşımlar benimsenmelidir (Rather et al. 2021).

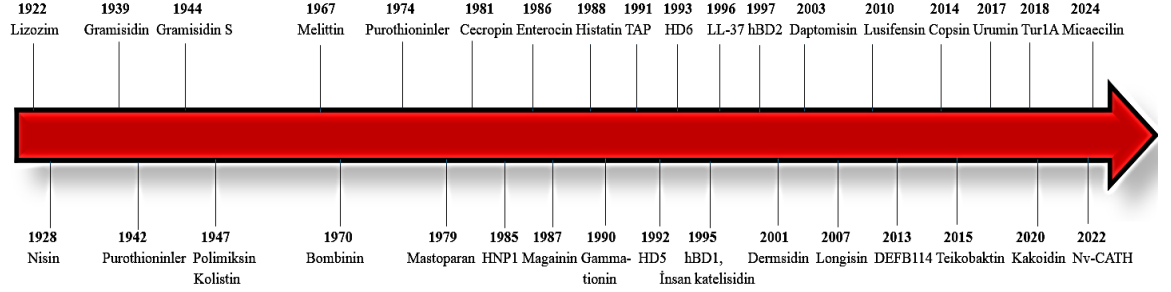
1.4. Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptitler, tüm canlı organizmalar tarafından üretilen ve doğuştan gelen bağışıklıkta önemli bir rol oynayan 10-150 aminoasit uzunluğunda olan küçük moleküllerdir. Gram-negatif ve pozitif bakterilere, mantarlara, mikobakterilere ve bazı zarflı virüslere karşı geniş bir aktivite yelpazesi göstermektedir. Ayrıca kanser hücreleri üzerinde de sitotoksik etkilere sahiptirler (Wang 2014; Di Somma et al. 2020).

Antimikrobiyal peptitler nadiren anyoniktir, çoğunlukla katyonik ve amfipatik yapıdadır. AMP'lerin çoğu pozitif yüklüdür ve yüklerden sorumlu lizin, arginin ve bazen de histidin gibi aminoasitler açısından zengindir. Polar katyonik, polar anyonik, polar nötr, polar olmayan alifatik ve polar olmayan aromatik amino asitler gibi çeşitli amino asit kombinasyonlarından oluşurlar (Mohaideen et al. 2023).

Alexander Fleming tarafından 1922 yılında ilk insan antimikrobiyal proteini olarak kabul edilen lizozim ve 1928 yılında nisin adlı antimikrobiyal özelliğe sahip polipeptid keşfedilmiştir (Rogers 1928; Fleming). *Lactococcus lactis* suşu tarafından üretilen nisin, küçük (3,4 kDa), 34 amino asitli, katyonik ve hidrofobik bir peptittir (Cheigh and Pyun 2005). 1939 yılında mikrobiyolog Rene Dubos tarafından *Bacillus* suşundan keşfedilen Gramicidin, klinikte kullanılan ilk antimikrobiyal peptittir. Daha sonra, böceklerden cecropin, *Triticum aestivum* bitkisinden tanımlanan bir antifungal peptid olan purothionin, hayvanlardan brevinin, inek sütünden laktoferrin, insandan defensin, katelisidin ve histatinler gibi diğer organizmalardan AMP'lerin tanımlanması gelmektedir (Mohaideen et al. 2023).

Antimikrobiyal Peptitlerin Keşfi



Şekil 1.5.AMP Zaman Çizelgesi (veriler <https://aps.unmc.edu/>'dan alınmıştır.)

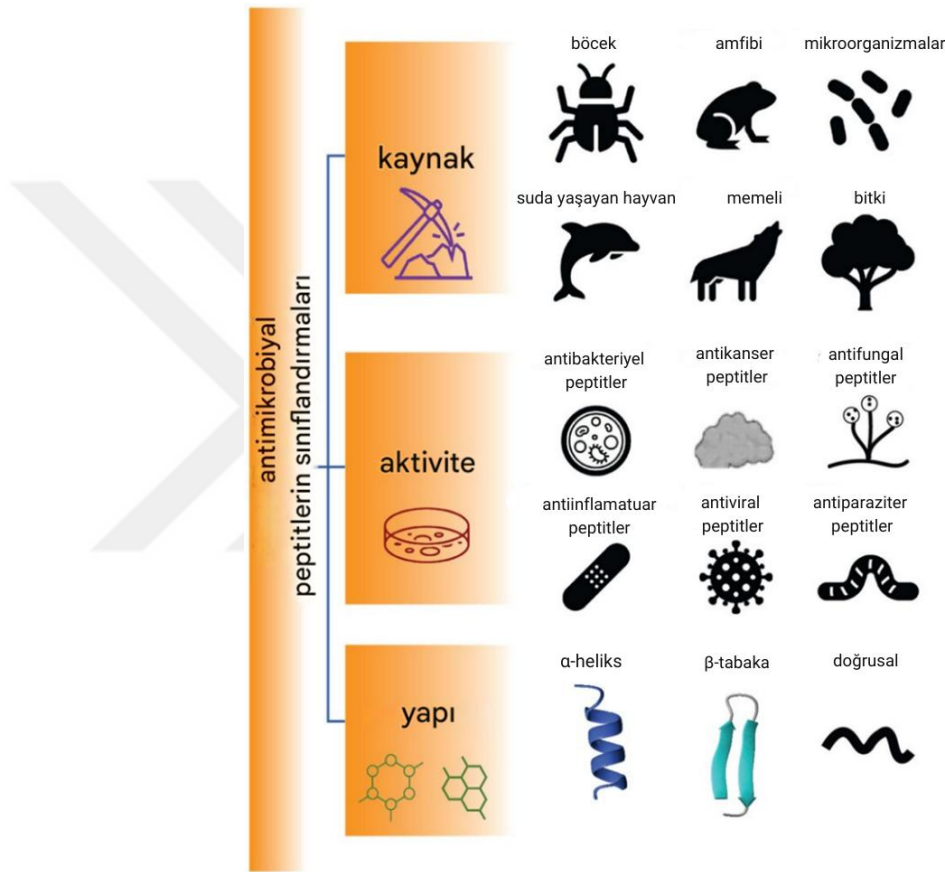
1960'larda, çoklu ilaca dirençli patojenlerin sayısındaki artış nedeniyle, bilim camiasının dikkati antimikrobiyal peptitlerin incelenmesine yönelmiştir. O tarihten itibaren, antimikrobiyal peptitlerin potansiyeli kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup, günümüzde yeni nesil antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır (Di Somma et al. 2020).

Savunma sisteminin evrimsel olarak korunan bileşenleri olan AMP'lerin bitkilerde, balıklarda, hayvanlarda ve insanlarda bulunduğu bildirilmiştir. Yeni AMP keşifleri, birçok AMP veritabanının oluşumuyla sonuçlanan genomik ve proteomikteki kademeli büyümeden kaynaklanmıştır. Bu veritabanları, diziler, yapılar, aktiviteler hakkındaki bilgileriyle birlikte birçok AMP'yi depolamak için çok önemlidir. AMP sayısı hızla arttığından, büyük miktardaki veriyi manuel olarak işlemek zorlaşmaktadır. AMP'lerin rasyonel tasarımı ve tahmini için hesaplamalı araçlardan yararlanmak amacıyla ve AMP'lerin sunulması için birçok veritabanı geliştirilmiştir (Bhat et al. 2022).

Bunlardan biri, 2003 yılında çevrimiçi olarak kurulan ve sürekli güncellenen Antimikrobiyal Peptit Veritabanı (APD3), altı yaşam aleminden, 3306 doğal AMP'ler (bakterilerden 410 bakteriyosin/peptit antibiyotik, arkelerden 5, protistlerden 8, mantarlardan 29, bitkilerden 268 ve hayvanlardan 2580), 1299 sentetik ve 231 tahmini AMP dahil olmak üzere 5099 peptit içermektedir (veriler <https://aps.unmc.edu/>'dan alınmıştır).

1.5. AMP'lerin Sınıflandırılması

AMP'ler, kaynakları, biyolojik aktiviteleri, yapısal özellikleri ve amino asit içerikleri açısından sınıflandırılmaktadır. APD3 veritabanında yer alan istatistiksel veriler, AMP'lerin kaynaklarına göre memeliler, amfibiler, mikroorganizmalar ve böcekler olmak üzere dört ana gruba ayrıldığını göstermektedir (Huan et al. 2020).



Şekil 1.6. AMP'lerin sınıflandırılması (Liu et al. 2023).

1.5.1. AMP'lerin kaynaklara göre sınıflandırılması

Memelilere ait AMP'ler, insan, koyun, sığır ve diğer omurgalı türlerinde bulunmaktadır. Bu peptitler arasında katelisidinler ve defensinler, başlıca AMP aileleri olarak öne çıkmaktadır. İnsan konak savunma peptitleri (HDP) olarak sınıflandırılan katelisidinler ve defensinler, antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra bağışıklığın

düzenlenmesi, apoptoz mekanizmalarında ve yara iyileşme süreçlerinde de önemli roller üstlenmektedir (Reddy et al. 2004).

Amfibilerden elde edilen AMP'ler, küresel amfibi popülasyonlarının azalmasına yol açan patojenlere karşı doğal savunma mekanizmalarının önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Bu peptitler, amfibilerin enfeksiyöz ajanlara karşı korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Rollins-Smith 2009).

AMP'ler başlıca böceklerin yağ gövdelerinde ve hemositlerinde de sentezlenmektedir. Bu peptitlerin üretimi, böceklerin çevresel patojenlere karşı direnç geliştirmelerinde ve hayatta kalma yeteneklerini artırmalarında temel adaptif mekanizmalardan biri olarak değerlendirilmektedir (Vilcinskas 2013). AMP'ler, bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Bu peptitler arasında nisin ve gramisidin, antimikrobiyal aktivite açısından öne çıkan bileşikler arasında yer almaktadır (Cao et al. 2018). Bununla birlikte, çeşitli AMP'ler bitkilerin gövdeleri, tohumları ve yapraklarından izole edilmiştir. Bu peptitler, tiyoninler ve defensinler başta olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmaktadır (Tang et al. 2018).

1.5.2. Aktiviteye göre sınıflandırma

AMP'lerin biyolojik aktiviteleri 18 farklı kategoriye ayrılabilir. Bu kategoriler arasında antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparaziter, HIV karşıtı ve anti-tümör peptitler öne çıkmaktadır. AMP'lerin en büyük kısmını antibakteriyel peptitler oluşturmaktadır (Li et al. 2019). Antifungal peptitler, mantar enfeksiyonlarına karşı etkili olan biyomoleküllerdir (Madanchi et al. 2020). Antiviral peptitler, virüslerin hücre yüzeyine tutunmasını ve hücre zarı ile füzyonunu inhibe etmenin yanı sıra, viral zarfı bozarak veya replikasyonu engelleyerek güçlü antiviral etki göstermektedir (Jung et al. 2019). Antiparaziter peptitler ise sıtma gibi parazit kaynaklı hastalıklara neden olan organizmalar üzerinde öldürücü etkiye sahiptir (Chalmers et al. 2020).

Antikanser peptitler, tümör hücrelerinin eliminasyonunu sağlamak amacıyla çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla etki göstermektedir. Bu mekanizmalar

arasında bağışıklık hücrelerini aktive ederek tümör hücrelerinin apoptoz veya nekrozunu indüklemek, tümör beslenmesini engellemek ve metastazı önlemek amacıyla anjiyogenezi inhibe etme, ayrıca tümör hücrelerinin gen transkripsiyonu ve translasyon süreçlerine müdahale etmek için belirli düzenleyici fonksiyonel proteinleri aktive etme gibi süreçler yer almaktadır (Wu et al. 2014).

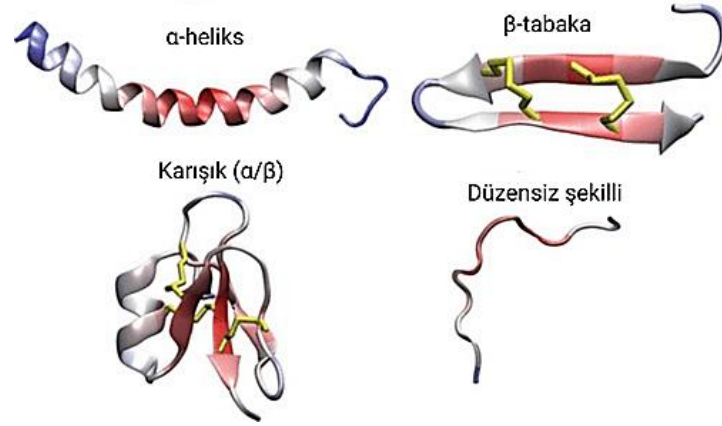
1.5.3. Amino asit zengini türlere göre AMP'lerin sınıflandırılması

AMP'ler, içerdikleri amino asitlerin tür ve oranlarına göre farklı sınıflara ayrılmakta olup, bu sınıflardan biri apolar bir amino asit olan prolin açısından zengin AMP'lerdir. Bunlar diğer AMP'lerden farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Bakteri membranını doğrudan tahrip etmek yerine, iç membran taşıyıcıları aracılığıyla bakteri sitoplazmasına geçiş yaparak ribozomları hedef almakta veya protein sentezini inhibe etmektedir (Mattiuzzo et al. 2007). Öte yandan, triptofan (Trp) ve arjinin (Arg) açısından zengin AMP'ler deki apolar bir amino asit olan Trp, lipit çift tabakasının ara yüzey bölgesinde belirgin bir etki göstermektedir. Temel bir amino asit olan Arg ise bakteri zarında yüksek oranda bulunan anyonik bileşenlerle etkileşime girmek için gerekli olan peptit yükü ve hidrojen bağı etkileşimlerini sağlamaktadır (Walrant et al. 2020).

Histidin açısından zengin AMP'lerdeki histidin, yaygın olarak bulunan bazik bir amino asit olup yüksek membran geçirgenliği aktivitesi sergilemektedir (Dong et al. 2019). Öte yandan, glisin açısından zengin AMP'lerde bulunan glisinin R grubu, biyolojik olarak genellikle apolar bir amino asit olarak sınıflandırılmaktadır. Attakinler ve dipterisinler gibi glisin açısından zengin AMP'ler doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Lee et al. 2001).

1.5.4. AMP yapılarına dayalı sınıflandırma

AMP'ler, yapısal özelliklerine göre dört ana grupta sınıflandırılabilir: α -heliks peptitler, β -tabaka peptitler, doğrusal uzantı yapısına sahip peptitler ve hem α -heliks hem de β -tabaka yapılarından oluşan peptitler'dir (Lei et al. 2019).



Şekil 1.7.AMP'lerin yapısal sınıflandırılması (Wani et al. 2024).

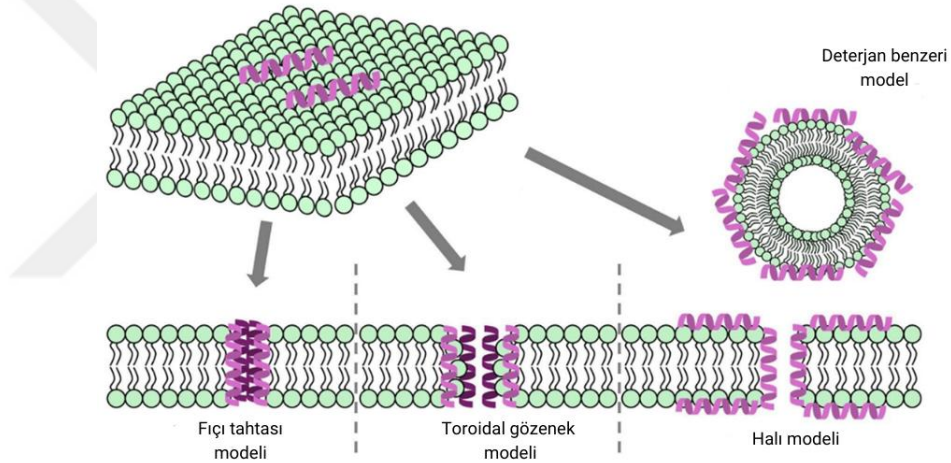
1.6. AMP'lerin Etki Mekanizmaları

AMP'lerin etki mekanizmaları membran hedefleme ve membran dışı hedefleme olarak ikiye ayrılır. Birincisi, hücre içi iyonların ve metabolitlerin kaybına, depolarizasyona, ozmotik şoka ve hücre ölümüne yol açan membran gözeneklerinin oluşumuyla karakterize edilir. Bu, katyonik AMP'lerin karakteristiğidir. Katyonik yük, peptitler ve plazma membran bileşenleri arasındaki etkileşime izin verir, bu da bu moleküllerin yüzeylerde birikmesiyle sonuçlanır. Anyonik AMP'ler ayrıca, mikroorganizmaların negatif yüklü membran bileşenlerine bağlı katyonik tuz köprüleri oluşturarak metal iyon kofaktörlerinin kullanımı yoluyla membranı hedef alabilir (Zupin et al. 2022).

AMP'ler genel olarak pozitif yükünden dolayı negatif yüklü mikrobiyal yüzeyle elektrostatik olarak etkileşime girer, genellikle belirli bir ikincil yapı benimseyerek membran lipitlerine nüfuz eder ve onu geçirgenleştirir. Bu nihayetinde membran bozulmasına ve bakteriyel hücre ölümüne yol açar. Etki mekanizmasına bağlı olarak AMP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin üç ana modeli, fiçi tahtası, toroidal gözenek ve halı benzeri yapılardır (Migoń et al. 2018).

1. GİRİŞ

Fıçı tahtası modeline göre peptitler, dik olarak yönlendirildikleri bakteri membranında bir gözenek oluştururlar. Helikal peptidin hidrofobik yüzü membrana doğru, hidrofilik yüzü ise yeni oluşan gözeneğin merkezine doğru yönlendirilmiştir. Toroidal modele göre gözenek, peptit kaynaklı lipid çift tabakasının bükülmesi sonucu oluşur. Bu durumda gözenek çizgisi sadece peptitlerden değil, aynı zamanda lipid baş gruplarından da oluşur. Son olarak, halı benzeri veya deterjan benzeri model, membran yüzeyine paralel peptit birikimine dayanır. Yüzeyde biriken peptidin kritik konsantrasyonu aşıldığında, membran yapısı değişir ve sonuçta membran bozulmasına yol açar. Dahası, AMP'ler hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, nükleik asit ve protein sentezinin inhibisyonu veya apoptozis/nekrozun indüklenmesi gibi diğer mekanizmalar yoluyla da antimikrobiyal etkiler gösterebilir (Brogden 2005).



Şekil 1.8. AMP'lerin membran hedefli etki modelleri (Min et al. 2024).

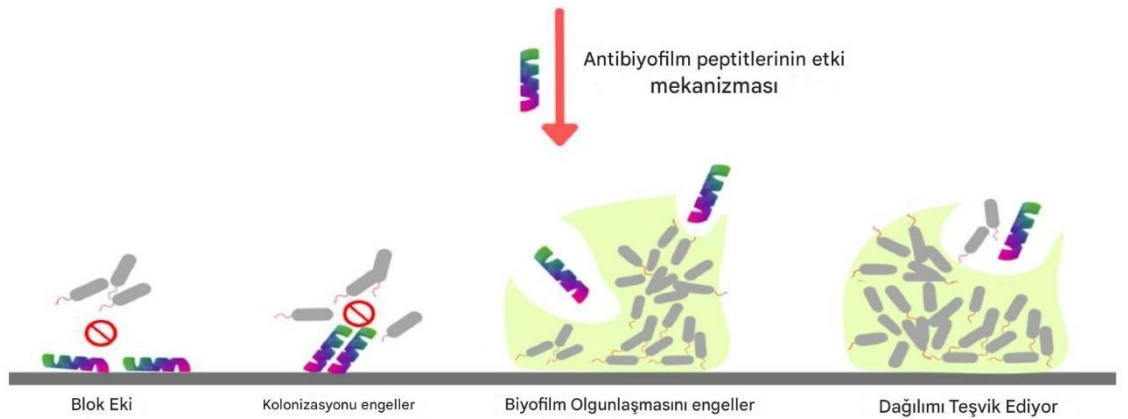
Dış zarı hedefleyen AMP'ler hücrelere doğrudan penetrasyon veya endositoz yoluyla girerler. Hücrelerin içine girdikten sonra, AMP'ler farklı hedeflere sahip olabilir. AMP'ler, ilgili efektör enzimler veya moleküllerle etkileşim yoluyla transkripsiyonu, translasyonu ve protein katlanmasını etkileyebilir. Çoğunlukla anyonik AMP'ler doğrudan ribozomları ve şaperonları hedefleyebildiği bilinmektedir (Mardirossian et al. 2014). AMP'ler ayrıca serin proteaz, elastaz ve kimotripsin gibi proteaz aktivitesini inhibe edebilir veya nükleik asitleri hedefleyip parçalayarak nükleik asit biyosentezinin temel enzimlerini inhibe edebilir. Aynı zamanda DNA replikasyonuna ve nükleik asit hasar tepkisine de müdahale edebilir (Le et al. 2017).

1.6.1. AMP'lerin planktonik bakterilere karşı etki mekanizması

AMP'lerin etki mekanizması genellikle Gram-negatif bakterilerin dış zarlarındaki lipopolisakkaritler (LPS) ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarındaki lipoteikoik asit (LTA) gibi negatif yüklü kısımlarla etkileşime girerek başlar. AMP'ler bakterilerin dış zarını veya hücre duvarını geçtiğinde, gözenekler oluşur ve sitoplazmik zarların bozulması ile hücre lizisi meydana gelir. AMP'ler ayrıca hücre duvarlarını, DNA'yı, RNA'yı ve proteinin sentezini inhibe edebilir. Ayrıca otolitik ölümü indükleyen otolizinler gibi enzimleri de aktive edebilir (Yasir et al. 2018). Biyofilmlere karşı etki mekanizmaları incelendiğinde ise, antibiyofilm peptit kavramı ön plana çıkmaktadır.

1.7. Antibiyofilm Peptitler (ABP)

ABP'ler, alternatif terapötik yaklaşımlar arasında en umut verici sınıflardan biri olarak öne çıkmaktadır. ABP'ler, biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında etkili olabilir. Planktonik hücrelerin yüzeye tutunmasını engelleyerek, yüzme veya sürünme hareketliliğini ve kamçı yapısını bozabilir. EPS'nin bozunması veya çevresel stres tepkisine müdahale edilmesi, seğirme hareketliliğini uyarak biyofilm dağılımına neden olabilir. Ayrıca, membran potansiyelini destabilize ederek biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını durdurabilir ya da QS mekanizmalarını inhibe ederek biyofilmleri hedef alabilir (Puchakayala et al. 2023).



Şekil 1.9.ABP'lerin olası etki mekanizmaları (Puchakayala et al. 2023).

1. GİRİŞ

ABP, biyofilm oluşumunu engelleyen veya mevcut biyofilmleri yok eden AMP'lerin bir alt grubudur. Genel AMP'lerden farklı mekanizmalar sergileyebilir ve planktonik hücrelere karşı etki göstermeyebilir. Şu ana kadar biyofilmlere karşı etkili olduğu belirlenen yaklaşık 168 ABP, BaAMPs adlı veri tabanında listelenmektedir. ABP'ler, organizmaları öldürmeden veya antibiyotik direncinin gelişmesi riskine girmeden mikrobiyal virülansı sınırlamak için bir strateji olarak özellikle dikkat çekici olabilir. ABP'ler mikrobiyal enfeksiyonlarda antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir (Bose et al. 2022).

İlk tanımlanan ABP olan insan katelisin LL-37, önceden oluşmuş *P. aeruginosa* biyofilmlerini minimum inhibitör konsantrasyonunun on altıda birinde inhibe ederek dağılmasına neden olmuştur. LL-37'nin bir ABP olarak nitelendirilmesi, antibiyofilm aktivitesine sahip çok sayıda peptidin keşfine ve tasarlanmasına ilham olmuştur (Dostert et al. 2018).

ABP'ler diğer tedavilere yanıt vermeyen enfeksiyonları, tedavi etmede büyük bir potansiyele sahiptir. Geleneksel antimikrobiyal ajanların başarısız olduğu ilaç, tarım ve bahçe endüstrilerinde direnç oluşumunun önlenmesi ve hastalıkların ortadan kaldırılması için kullanılabilir (Hancock et al. 2021).

ABP'ler biyofilm büyümesinin çeşitli aşamalarına müdahale etme konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahiptir. Biyofilmlerdeki hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri öldürmede geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir, geleneksel antibiyotiklerle güçlü bir sinerji gösterir ve biyofilm büyümesi için gerekli olan sıkı stres tepkisini benzersiz bir şekilde hedefler (Pletzer et al. 2016). Antibiyofilm özelliklere sahip peptitlerin birkaç örneği Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Antibiyofilm aktivitesine sahip bazı peptitler.

Peptidin Adı	MIC	MBIC	Etkilediği Organizma	Referans
AS10	50 µM	0.22 µM	<i>Candida albicans</i>	(De Brucker et al. 2014)

1. GİRİŞ

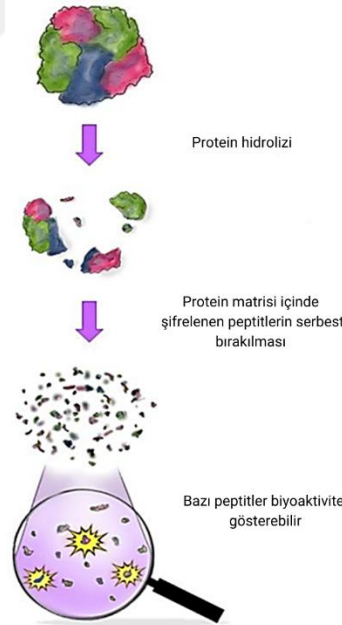
KT2 ve RT2	5–18 µM	1 µM	<i>Escherichia coli</i>	(Anunthawan et al. 2015)
SB056 ve türevleri	10>40 µM	5–20 µM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(Batoni et al. 2016)
Siklik lipopeptid 3	22–55 µM	4 µM	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(Bionda et al. 2016)
LL-37 ve türevleri	32 µg/mL	1–16 µg/mL	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	(Aka 2015)
(IDR-)1018	8–128 µg/mL	2-8 µg/mL	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>S. aureus</i>	(Fuente-Núñez et al. 2014; Mishra et al. 2016)
DJK-5	1.6–16 µg/mL	0.8–4 µg/mL	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i>	(Fuente-Núñez et al. 2015)
DJK-6	4–16 µg/mL	0.5–8 µg/mL	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i>	(Fuente-Núñez et al. 2015)

Geniş spektrumlu sentetik bakteresin türevleri 1018 ve DJK-5'in incelenmesi, ABP'lerin etki mekanizmasına ilişkin bilgiler sağlamıştır. Bu aktivitenin temeli, sinyal molekülü guanozin pentaşfat'a (ppGpp) bağlanarak ve onun bozunmasını tetikleyerek yüksek oranda korunan sıkı stres yanıtını doğrudan hedefleme yetenekleri olduğu bulunmuştur. Sıkı stres tepkisi besin sınırlayıcı koşullarda aktive olur ve bakteriyel biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Geleneksel antibiyotiklerin aksine, bu bileşiklerin ppGpp gibi ikincil haberci moleküllerle etkileşime girdiği ve gelecekteki tedavilerde direnç geliştirme olasılığını azaltabilecek birden fazla etki mekanizmasına sahip olabileceği düşünülmektedir (Dostert et al. 2018).

1.8. İntragenik Antimikrobiyal Peptitler (IAP)

Bazı proteinler, birincil yapılarında, antimikrobiyal, kemotaktik ve anti-hipertansif gibi biyolojik aktiviteler sergileyebilecek, ana molekülünden farklı özelliklere sahip şifrelenmiş peptit dizileri barındırmaktadır. Bunlar biyoaktif peptitler olarak adlandırılır ve fizyolojik olarak anlam taşıyan durumlarda, kısmi proteoliz yoluyla salınabilir ve bu süreç, dokuya özgü peptit havuzlarının oluşmasına yol açabilir (Mariano et al. 2021).

Biyoaktif peptitler, çoğu zaman 20 birimden daha az amino asit içeren küçük protein molekülleridir. Biyoaktif peptitler fizyolojik aktivite göstermezler veya büyük protein moleküllerinde doğal polipeptit sekansının bir parçası olarak bulunduklarında inaktif olarak daha iyi tanımlanırlar. Enzimatik, kimyasal reaksiyonlar veya hidroliz yoluyla salındığında, serbest kalan peptitler fizyolojik olarak aktif-biyoaktif hale gelir (Ahsan et al. 2024).



Şekil 1.10. Biyoaktif peptitler (Ahsan et al. 2024).

Biyoaktif peptitler, insan sağlığını iyileştirme potansiyeline sahip biyolojik etkiler gösterme yeteneği ile karakterize edilirler. Bu peptitler ekzojen veya endojen olabilir. Ekzojen biyoaktif peptitler gıdalardan, diyet takviyelerinden veya ilaçlardan elde edilir.

1. GİRİŞ

Aksine, endojen biyoaktif peptitler farklı hücre ve salgı bezi tipleri tarafından üretilir. Biyoaktif peptitler, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antioksidan, antihipertansif, antidiyabetik, antineoplastik ve opioid aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelerle ilişkilidir. Bu gözlemler, proteinlerin iç yapılarındaki potansiyel biyolojik aktivite alanlarının tanımlanmasına yönelik çalışmalara ilham vermiştir. Bu tür peptitler, "IAP'ler" olarak adlandırılmaktadır (Brand et al. 2012; Mariano et al. 2021). Çeşitli organizmalardan elde edilen proteinlerin, şifrelenmiş yapısal elemanlar içerdiği IAP'ler, duyarlı ve dirençli bakteri suşlarına karşı geniş skalada, doğrudan antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antibiyofilm ve bağışıklık hücrelerinde kemoatraktan etki gösterme gibi özelliklere sahiptir (Bessa et al. 2019).

Antimikrobiyal peptitlerin bir alt grubu olan IAP'ler, tanımlanıp sentezlendiklerinde antimikrobiyal aktivite sergileyen AMP'lere fizikokimyasal benzerlikler (α -sarmal yapı, katyonik yapı ve sınırdaki hidrofobiklik) gösteren proteinlerin dahil olduğu dizilerdir. Hemen hemen her organizmanın genomları tarafından kodlanan birçok olgun protein, IAP'lerin iç rezervuarları olarak kabul edilebilir ve bu onlara geniş biyoteknolojik potansiyel kazandırır. Proteolizden türetilen bu tür peptitler şu anda tarım, insan sağlığı ve gıda muhafazası ile ilgili biyoteknolojik süreçlerde araştırılmaktadır. IAP'ler ilk olarak bitkilerde keşfedilmiştir ve düşük hemolitik aktivitelerle sahip güçlü ve geniş antimikrobiyal ajanlardır (Brand et al. 2018; Mariano et al. 2021)

Genellikle, IAP'ler ilk önce biyokimyasal araçlar kullanılarak *in vivo* olarak tespit edilir, saflaştırılmış proteinlerin veya protein özütlerinin sınırlı proteolizi ile *in vitro* elde edilir ve daha sonra aktiviteleri belirli biyolojik analizlerle karakterize edilir. Bu nedenle, enzim hidrolizi ile üretilen protein parçalarının *in vivo*, *in vitro* veya *ex vivo* olarak ana proteinlerden ayrı ayrı polipeptit dizileri olarak varlığı, şifrelenmiş moleküller olarak karakterizasyonları için bir gerekliliktir (Costa et al. 2024).

1.8.1. İntragenik antimikrobiyal peptitlerin (IAP'ler) seçimi

Aday IAP'ler, biyoinformatik bir araç olan Kamal alpha (<https://av.cenargen.embrapa.br/Kamal/>) yazılımı kullanılarak protein dizilerinin taranmasıyla seçilmiştir. Kamal adı verilen bilgisayar programı, daha büyük polipeptit

zincirleri içindeki varsayımsal AMP parçalarını tanımlayabilen belirli fizikokimyasal parametreler tarafından yönlendirilen protein dizilerinin *in silico* işlenmesinin etkileşimli rutinlerini oluşturur. Bunlar daha sonra istenen aktivitelere sahip bir dizi peptit adayı tanımlamak için belirli dizi tabanlı kriterler kullanılarak filtrelenmektedir. Filtreleme prosedürü, aynı veritabanından rastgele bir molekül kümesinden antimikrobiyal peptitlere daha yüksek fizikokimyasal benzerliğe sahip protein parçaları alt kümesiyle sonuçlanır (Brand et al. 2012; Ramada et al. 2017)

Kamal tarafından filtrelenen peptitlerin aynı veritabanından rastgele seçilen moleküllere kıyasla AMP örneklerine fizikokimyasal olarak daha benzer olduğu tespit edilmiştir. Kamal yazılımı tarafından varsayılan IAP'lerin seçimi, büyük protein veri bankalarında yüksek verimli taramalar gerçekleştirmek için uygundur (Brand et al. 2012; Ramada et al. 2017).

1.8.2. *Homo sapiens* IAP'ler

Homo sapiens (Hs) IAP'ler olarak adlandırılan insan proteinlerinde bulunan 17 intragenik antimikrobiyal peptit keşfedilmiştir. Bu peptitlerin isimlendirilmesi şu şekildedir; Hs01, Hs02, Hs03, Hs04, Hs05, Hs06, Hs10, Hs11, Hs12, Hs13, Hs14, Hs15, Hs16, Hs17, Hs18, Hs19, Hs20'dır. Hs IAP'ler, zar bozucu peptit molekülüdür ve farklı zar etkileşimi nitelikleri sunduğu bilinmektedir. Gram-pozitif ve negatif bakterilerin yanı sıra mayalara karşı da geniş antimikrobiyal spektrumlar sunarak, bu peptitlerin çeşitli zar yapılarına rağmen mikroorganizmaların büyümesini engelleyebildiği bilinmektedir. Hs IAP'ler insandaki belirli proteinlerin iç parçalarından türetilmektedir. Örneğin; Hs01, PRAME aile üyesi proteininden, Hs03, insan Anafaz-Promoting Kompleksinin N alt biriminden, Hs04, Muhtemel E3 ubiquitin-protein ligase izoform 1 proteininden, Hs05, insan RNA sitidin asetiltransferaz'dan, Hs06, MOB kinaz aktivatörü 1A izoform 3'den türetilmiştir (Brand et al. 2019; Mariano et al. 2021; Santos et al. 2023; Costa et al. 2024). Çizelge 1.2'de Hs IAP'lerin birincil yapıları ve kaynak proteinlerinin kodları verilmiştir.

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2.Hs IAP'ler

Kaynak Proteinin Kodu	Peptidin Adı	Birincil Yapı	Referans
NP_001093322.2	Hs01	LKMLGMLFHNIRNILKTV-NH ₂	(Brand et al. 2019)
NP_001094891.3	Hs02	KWAVRIIRKFIKGFIS-NH ₂	(Brand et al. 2019)
NP_037498.1	Hs03	FLREFHKWIERVVGWLGVF-NH ₂	(Brand et al. 2019)
NP_055421.1	Hs04	LFNNYITAALKLLEKLYKV-NH ₂	(Brand et al. 2019)
NP_001137502.1	Hs05	LMGLFNRIIRKVVKLFN-NH ₂	(Mariano et al. 2021)
NP_001231695.1	Hs06	FMSVAKTILKRLFRVYAHY-NH ₂	(Mariano et al. 2021)
NP_000055.2	Hs10	KFDLKVTIK-NH ₂	(Santos et al. 2023)
NP_001003682.1	Hs11	LRVRARLRL-NH ₂	(Santos et al. 2023)
NP_000400.2	Hs12	KLRWYFKL-NH ₂	(Santos et al. 2023)
EAX10588.1	Hs13	RAKVKFNVN-NH ₂	(Santos et al. 2023)
NP_004658.3	Hs14	KVRVKASVT-NH ₂	(Santos et al. 2023)
NP_001317582.1	Hs15	TVLKRVLKELWRVVMN-NH ₂	(Costa et al. 2024b)

1. GİRİŞ

NP_001132960.1	Hs16	AEVITKFINVAKKLLQ-NH ₂	(Costa et al. 2024)
NP_005624.2	Hs17	GKAMKKWVEZITKIIQ-NH ₂	(Costa et al. 2024)
NP_003391.1	Hs18	WKFLKTVVNKLFEFMH-NH ₂	(Costa et al. 2024)
NP_071353.4	Hs19	LVSQVSLIHLLNRLQ-NH ₂	(Costa et al. 2024)
NP_001092741.1	Hs20	RTLLKKVWVWRSVVQK-NH ₂	(Costa et al. 2024)

1.8.3. Hs02 peptidi

Hs02, konvansiyonel olmayan miyozin 1H proteininden (NP_001094891.3) türetilen (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) IAP'lerden biridir. Murin makrofajlarında lipopolisakarit kaynaklı TNF- α salınımını inhibe ederek güçlü antiinflamatuvar aktivite gösterir. Hs02, değerlendirilen en düşük peptit konsantrasyonunda, 0,1 μ M'da bile LPS ile hazırlanmış hücrelerde TNF- α salınımını inhibe etmiştir. Vücutta lipopolisakarit kaynaklı proinflamatuvar mediatörlerin salınmasının potansiyel bir inhibitörüdür. Hs02 diğer Hs IAP'lerine kıyasla antimikrobiyal aktivitesi en güçlü olan peptittir. Ayrıca Hs02'nin *P. aeruginosa*'ya karşı önemli inhibitör aktiviteye sahip tek molekül olduğu ve geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür. Hs02 peptidi amfifilik α -heliks konformasyonuna sahiptir. Bakterisidal bir etkisi bulunur ve *P. aeruginosa* hem de *S. aureus* suşlarının zar akışkanlığını azaltma yeteneği bulunduğundan bu özellik zarı hedef alan bir antibakteriyel mekanizmayı düşündürür. Ayrıca bu peptit, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *S. aureus*, *S. epidermidis* gibi maya, mantar ve bakterilere karşı inhibe edici aktivite de göstermektedir (Bessa et al. 2019; Brand et al. 2019).



Şekil 1.11.Hs02 peptidinin üç boyutlu yapısı (uniprot.org).

1.9. Tez Çalışmasının Amacı

Günümüzde antibiyotiklere karşı direnç enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan küresel halk sağlığı sorunlarından biridir. Antibiyotik tüketimindeki yaygın ve bilinçsiz kullanım bakterilerin direnç kazanmasına neden olarak mevcut tedavi seçeneklerini etkisiz hale getirmektedir. Bu durum çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için yeni ve etkili antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, antibiyotik direncinin yol açtığı tedavi başarısızlıklarını önlemek ve buna alternatif olarak yeni bir antimikrobiyal peptitler geliştirerek çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların kontrol altına alınmasını sağlamaktır. HS02 adlı insan miyozin 1H proteininden ortaya çıkarılan intragenik antimikrobiyal peptidin belirli özellikleri modifiye edilerek yeni dizayn edilmiş türevlerinin (GV-13, VR-10), kronik enfeksiyonlara en fazla neden olan *P. aeruginosa* (PAO1) ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) bakterilerinin tek ve çift türlü biyofilm modellerine karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Brand ve arkadaşları (2012), *Glycine max* (soya fasulyesi) bitkisinden izole edilen protein parçalarını analiz ederek, bu küçük peptitlere IAP adını vermiştir. Fizikokimyasal özellikleri APD3 veri tabanındaki AMP'ler ile karşılaştırılan bu parçalar arasından, 15 peptit sentezlemişlerdir. Peptitlerin, fosfolipid veziküllerle (DMPC ve DMPC:DMPG LUV) etkileşimi termal analizle incelemiş ve bazı peptitlerin zar yapısını bozduğunu belirlemişlerdir. Dairesel Dikroizm (CD) analizleri sonucunda, nötr ve negatif yüklü zarlarla temas eden peptitlerin α -heliks yapısında artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Cluster 3 grubundaki peptitlerin en güçlü zar bozucu ve antimikrobiyal etkiyi sergilediğini rapor etmişlerdir. A5LDU0 (184-211) adlı peptidin MIC değerini, doğal antimikrobiyal peptitlerle benzer bulmuş, bazı peptitlerin ise bakteri ve bitki patojenlerine karşı etkili olduğu göstermişlerdir. Bitkinin doğal patojenlerine karşı direnç potansiyelini değerlendirmek için yapılan tolerans testlerinde, enfekte alanlarda %50'ye varan azalma gözlemlenmiştir (Brand et al. 2012)

Ramada ve arkadaşları (2017), *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis*, *Zea mays* ve *Gossypium raimondii* türlerinden elde edilen proteinler üzerinde Kamal yazılımını kullanarak fizikokimyasal özelliklerine dayalı IAP adaylarını belirlemişlerdir (Tc01-Tc11, At01-At04, Cs01-Cs03, Zm01, Gr01-Gr02). Sentezlenen bu peptitlerin model membranlarla etkileşimlerini değerlendirmiş ve 16 tanesinin insan ve bitki patojenlerine karşı 256 μ M konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir. Bazı peptitlerin, AMP'lerle karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek inhibisyon etkinliği gösterdiği ve geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tc02, Gr01 ve Gr02 peptitleri, en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi sergilemiş ancak 64 μ M konsantrasyonda %50 hemoliz oluşturduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu peptitlerin pamuk yapraklarında küf gelişimini engellediğini de deneysel olarak göstermişlerdir (Ramada et al. 2017)

Brand ve arkadaşları (2018), *T. cacao*, *A. thaliana*, *C. sinensis*, *Z. mays* ve *G. raimondii* türlerinden 21 adet IAP seçmiş ve 2017 yılında tanımlanan peptitleri de çalışmalarına dahil etmiştir. Peptitlerin fosfolipid membranlarla etkileşimini incelemek amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ve Dairesel Dikroizm (CD) analizleri

gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, membran bozulmasının peptitlerin ikincil yapısıyla doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Daha fazla heliks yapısı kazanan peptitlerin, membranın hidrokarbon çekirdeğine daha derinlemesine nüfuz ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca, peptitlerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere ve mayalara karşı $\geq 512 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenmiştir (Brand et al. 2018).

Brand ve arkadaşları (2019), insan proteinlerinden türetilen ve HS IAP olarak adlandırılan yeni bir peptit sınıfı (Hs01, Hs02, Hs03, Hs04) tanımlamıştır. Kamal yazılımı ile seçilen bu peptitleri, katı faz peptit sentezi yöntemiyle sentezlemiş ve MALDI-TOF/TOF ve RP-HPLC teknikleriyle karakterize etmişlerdir. Peptitlerin fosfolipid membranlarla olan etkileşimlerini incelemiş, bakteriler, mayalar ve funguslara karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteler sergilediklerini belirlemişlerdir. Hs02 peptidinin üç boyutlu yapısını Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemiyle çözmüş ve bu peptidin α -heliks yapısı kazanarak membranlara bağlandığını ve zar yapısında bozulmalara neden olduğunu göstermişlerdir. Hs IAP'lerin, düşük konsantrasyonlarda ($1 \mu\text{M}$ gibi) bile mikroorganizmaların büyümesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Özellikle Hs02'nin, $0,1 \mu\text{M}$ konsantrasyonda LPS ile uyarılmış hücrelerde TNF- α salınımını baskılayarak güçlü bir anti-inflamatuar etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Brand et al. 2019).

Bessa ve arkadaşları (2019), Hs02 peptidinin *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini incelemiştir. Tek ve çift türlü biyofilmlerde yapılan analizlerde, Hs02'nin MIC değerlerinin tüm suşlar için $2-16 \mu\text{g/ml}$ arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Peptidin, bazı suşlarda MIC altı konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu engelleyemediğini fakat, Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) görüntülerinin, peptidin mevcut biyofilmler üzerindeki etkisini ve bakteri hücrelerinin canlılığını azalttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, Hs02'nin hem *P. aeruginosa* hem de *S. aureus* membranlarında akışkanlığı azaltarak membran sertleşmesine yol açtığını göstermişlerdir (Bessa et al. 2019).

Mariano ve arkadaşları (2021), insan proteinlerinden türetilen iki yeni IAP (Hs05, Hs06) keşfetmiştir. Peptitleri sentezlemiş, saflaştırmış ve MALDI-TOF MS ile

karakterize etmişlerdir. Yapısal analizler sonucunda, her iki peptidin de α -heliks yapıda olduğunu ortaya koymuşlardır. Hs05 peptidini, sıvı ve katı matrise entegre ederek, matris üzerindeki homojen dağılımı MALDI görüntüleme tekniği ile değerlendirmişlerdir. Peptidin salınım hızını sıvı ortamda test etmiş ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinlik sergilediğini belirlemişlerdir. Ancak, katı matris ortamında bu peptidin inhibisyon etkisini gözlemlenmemişlerdir (Mariano et al. 2021).

Santos ve arkadaşları (2023), Hs10, Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 adlı yeni IAP'ler keşfetmiştir. Hs10, Hs11 ve Hs12 peptitlerinin, çeşitli bakterilerin büyümesini engellediğini belirtmiş, ancak Hs13 ve Hs14 için önemli bir aktivite tespit etmemişlerdir. Hs10'nun, Gram-negatif bakterilere karşı 32-128 μ M aralığında antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, Gram-pozitif bakterilere karşı etkisiz olduğunu bulmuşlardır. İnsan fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksikite testlerinde, 512 μ M gibi yüksek konsantrasyonlarda bile hücrelerin %70'inden fazlasının canlı kaldığı belirlenmiş, peptidin düşük toksisite ve yüksek seçicilik sergilediğini ortaya koymuşlardır. Yapısal analizlerde, Hs10'un çözeltide rastgele konformasyonda olduğunu, ancak *E. coli*'nin LPS yapısına bağlandığında β -tabaka yapısına dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. AFM analizleri sonucunda, Hs10 ile muamele edilen *E. coli* hücrelerinde boyut küçülmesi, sitoplazmik sızıntı ve hücre agregasyonu gibi morfolojik değişiklikler gösterdiğini, *S. aureus* hücrelerinde böyle bir değişiklik gözlenmediğini ortaya koymuşlardır (Santos et al. 2023).

Costa ve arkadaşları (2024), insan proteinlerinin yaklaşık %2'sinde IAP'ler ile uyumlu katyonik amfifilik segmentlerin bulunduğunu ve bu segmentlerin farklı biyolojik işlevlere sahip proteinlerin yapısal bileşenlerini oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Laboratuvar ortamında sentezlenen 6 sentetik peptit (Hs15, Hs16, Hs17, Hs18, Hs19, Hs20) üzerinde yapılan biyolojik aktivite testlerinde, peptitlerin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Hs18'in 2 μ M gibi düşük bir konsantrasyonda dahi etkili olduğunu, Hs16 ve Hs17'nin ise antimikrobiyal aktivite sergilerken sağlıklı hücrelere de zarar vermediğini gözlemlenmişlerdir. ConSurf ve Rate4Site algoritmaları ile yapılan analizler sonucu, segmentlerin amino asit dizilimlerinde genel olarak protein içindeki diğer bölgelerle benzer bir evrimsel korunum seviyesine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, Exportin-1 proteininde

yer alan Hs18 segmentinin yüksek düzeyde korunum gösterdiğini de tespit etmişlerdir (Costa et al. 2024).

Mota ve arkadaşları (2024), Hs02 peptidinin lösemi hücre hatları üzerindeki antikanser potansiyelini ilk kez araştırmıştır. K562 (KML), MEC-1 (KLL), HL-60 (AML), NB4 (AML) ve Jurkat (ALL) hücre hatlarında yapılan çalışmada, Hs02'nin HL-60 hücrelerinde IC50 değerinin (yarı maksimum inhibitör konsantrasyon) 5.16 μ M olarak belirlemiş ve bu değerin diğer hücre hatlarına göre daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Propidium iyodür (PI) boyama ve akış sitometrisi analizleri sonucunda, Hs02'nin HL-60 hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsünü duraklatarak hücre bölünmesini baskıladığını göstermişlerdir. Peptidin CDK2 gen ekspresyonunu inhibe ettiğini, ancak CDK1 üzerinde etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Annexin V/PI boyama ile erken ve geç apoptoz oranlarında artış gözlemlenmiştir. Laktat dehidrojenaz (LDH) salınım analizleri ile, Hs02'nin hücre membran hasarına yol açtığını ortaya koymuşlardır. CASP1, CASP3, GSDME ve NLRP1 gibi piroptozisle ilişkili genlerde Real-Time PCR ile yapılan analizlerde belirgin ekspresyon artışı saptamış, özellikle IL-1 β 'da gözlenen artışın, inflamatuvar hücre ölümü mekanizmasını destekler nitelikte olduğunu bildirmişlerdir (Mota et al. 2024).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Cihazlar ve bakteri suşları

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (YUTAM), laboratuvarlarında bulunmaktadır. Kullanılan cihazlar Çizelge 1.3'te verilmiştir. Kullanılan patojen suşlar ve kodları da Çizelge 1.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3.Cihazlar ve modelleri

Cihazlar	Modeller
Buzdolabı +4 °C	Profilo
Buzdolabı -20 °C	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Nükleon NSCI-55
Jel görüntüleme	Bio-Rad Chemidoc MP Imaging System
Faz-Kontrast Mikroskobu	Leica DM 750
Hassas Terazi	Weightlab instruments WSA-224
Homojenizatör	Qiagen TissuLyser LT
Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini	Bio Safety Cabinet
Mikropipetler	NICHIO Nichipet EX II
Mini santrifüj	Weightlab instruments WN-CM15
Otoklav	Hiramaya Hv 50-L
PCR Cihazı	SensoQuest Labcycler Gradient Fuses
qRT-PCR	Rotor Gene Q, Qiagen
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Statik İnkübatör	Memmert IN55
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q3W
Elektroforez Sistemi	Bio-rad Powerpac Basic

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Mikroplaka Spektrometrisi	BioTek Epoch instruments
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Taramalı elektron Mikroskobu	FEI Quanta 250

Çizelge 1.4.Kullanılan patojen suşlar ve kodları

Bakteri ve Maya Suşları	Kodları
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923, ATCC 43300 (MRSA), ATCC 6538
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1, ATCC 10145, ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, Çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip 1 klinik izolat (EC1)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC BAA-1605
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip 2 klinik izolat (KP1, KP2)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 220199
<i>Candida tropicalis</i>	KUEN 1025

3.1.2. Besiyerleri ve solüsyonların hazırlanışları

3.1.2.1. Mueller-hinton agar (MHA)

MHA, antimikrobiyal testlerde yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir. Bir litre için 17,5 g kazein, 2 g et özütü, 1,5 g nişasta ve 15 g agar içeren bu besiyeri, ticari formda 36 g olarak tartılıp 1 litre saf su içinde çözülmüştür. Çözeltinin sterilizasyonu, 121°C’de

15 dakika (dk) boyunca otoklavda gerçekleştirilmiştir. Ardından petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.2. Mueller-hinton broth (MHB)

MHA besiyerinin agar içermeyen formu olan MHB, MIC testlerinde kullanılmak üzere "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) tarafından önerilen bir sıvı besiyeridir (Yılmaz et al.). Ticari formda temin edilen MHB'den 26,5 g tartılarak 1 litre saf su içinde çözülmüş, ardından çözeltinin sterilizasyonu, 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.3. Patates dekstroza agar (PDA)

PDA, mantar ve maya izolasyonlarında sıkça kullanılan bir besiyeridir. Her litre için 20 g dekstroza, 15 g agar ve 4 g patates infüzyonu içeren bu besiyeri, ticari toz formda 39 g tartılarak 1 litre saf suya eklenmiştir. Çözeltinin sterilizasyonu, 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon sonrası, petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.4. Triptik-soy broth (TSB)

TSB, çeşitli mikroorganizmaların gelişimi için kullanılan genel amaçlı bir besiyeridir. Her litre için 17 g kazein, 3 g soya, 5 g sodyum klorür (NaCl), 2.5 g dipotasyom hidrojen fosfat, 2.5 g glikoz monohidrat içeren besiyeri ticari formda 30 g tartılarak 1 litre saf suya eklenmiştir. Triptik-Soy agar (TSA) besiyeri hazırlamak için ise, TSB besiyeri içine 15 g/L agar konulmuştur. Çözeltilerin sterilizasyonu, 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.5. Mannitol salt agar

Bu besiyeri patojenik stafilokokların izolasyonu için seçici bir ortam olarak kullanılır (Kampf et al. 1998). Her litre için 1g 'Lab-Lemco'tozu, 10 g pepton, 10 g

mannitol, 75 g NaCl, 0,025 g fenol kırmızısı ve 15 g agar içeren besiyeri ticari formda 111 g tartılarak 1 litre saf suya eklenmiştir. 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.6. *Pseudomonas* agar base

Bu besiyeri *Pseudomonas* türlerinin seçici izolasyonu için bir ortam olarak kullanılır (Gül Şeker 2021). Her 500 ml için 16 jelatin pepton, 10 g kazein, 10 g potasyum sülfat (K_2SO_4), 1.4 g magnezyum klorür ($MgCl$), ve 11 g agar içeren besiyeri ticari formda 24,2 g tartılarak 500 mL saf suya eklenmiştir. Ardından içerisine 5 mL gliserol eklenmiştir. 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. 50 °C'ye soğutulmuş 500 mL besiyerine *Pseudomonas* CN seçici takviye (şişe başına setrimid 100 mg ve sodyum nalidiksate 7,5 mg) 1 şişe eklenmiştir. Petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.7. Soft besiyerleri

Soft besiyerleri, MHB besiyerinin içerisine %0,5 agar eklenerek hazırlanmıştır. Bu besiyeri kaynaşma hareketliliği testinde kullanılmıştır. TSB besiyerinin için %0,15 agar eklenmiş bu besiyeri seğirme hareketliliği testinde kullanılmıştır.

3.1.2.8. RPMI 1640 ve morfolinopropansüfonik asit (MOPS) solüsyonu

Steril RPMI 140 içerisine 1,72 g steril MOPS eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 0.22 μM 'lik filtreden geçirilmiş mayalar için mikrodilüsyon testinde kullanılmıştır.

3.1.2.9. %0,1'lik kristal viyole (CV) boyası hazırlama

Toz haldeki CV boyasından 0,05 g olarak tartılarak 35 mL %96'lık etil alkolde çözülmüştür. Üzerine 15 mL saf su eklenmiş ve 24 saat karanlıkta inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda 0,22 μM 'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.1.2.10. %30'luk asetik asit

35 mL saf suyun üzerine yavaş yavaş %99,9'luk asetik asitten 15 mL eklenmiştir.

3.1.2.11. Agaroz jel hazırlama

İzole edilen RNA'ların görüntülenmesi için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 1 g agaroz tartılıp 100 mL 1X Tris Borat EDTA (TBE) içerisinde çözülmüştür. İçerisine 2 µL etidyum bromür eklenmiş ve tarak takılarak kasete jel dökülmüştür. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmıştır.

3.1.2.12. 10X TBE buffer

RNA örneklerini agaroz jelde yürütürken tampon olarak TBE Buffer kullanılmıştır. 1M Tris bazı 121,1 g, 1 M Borik asit 61,8 g, 0,02M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) 7,4 g tartılarak 100 mL RNaz içermeyen su içinde çözülmüş ve 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.2.13. %0,1 dietil pirokarbonat (DEPC)'li su hazırlama

Kapaklı bir şişe içerisine 1 mL DEPC (nükleaz içermeyen su) alınmış, saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiş ara sıra ağzı gevşetilmiştir. 121 °C'de 15 dk boyunca otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tek ve dual kültürlerin oluşturulması

3.2.1.1. Tek kültürler

Tek kültür olarak Çizelge 1.4'te verilen patojen suşlar kullanılmıştır. Bakteri suşları stok kültürlerden MHA besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Maya suşları ise PDA besiyerinde 30 °C'de 24-48 saatlik kültürler halinde geliştirilmiştir. Deneysel aşamalarda kullanmak için bakteriler ve mayalar sıvı besiyerlerine (MHB, PDB) inoküle edilmiş, 24-48 saatlik kültürler halinde geliştirilmiştir. Her deneysel aşama için taze hazırlanmış kültürler kullanılmıştır.

3.2.1.2. Dual kültürler

Dual kültür oluşturmak için *P. aeruginosa* (PA01) ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) bakterileri kullanılmıştır. MHB besiyerinde gece boyu gelişen bakteri hücreleri alınarak 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pelet besiyerinde çözölmüş, bakteriler bir araya getirilerek OD600=0,1'e ayarlanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda elde edilen dual ve tek kültürler diğer testlerin her birinde kullanılmıştır.

3.2.1.3. Dual kültürlerin optimize edilmesi

3.2.1.3.1. Büyüme kinetiği

PA01 ve MRSA bakterileri TSB besiyerinde 37 °C'de 24 saat boyunca geliştirilmiştir. 0,2,4,8 ve 24.saatlerde her bir bakteriden 100 µL örnek alınarak saf su ile 10⁻⁹ seyreltme yapılmış, 100 µL TSB besiyerine ekilmiştir. Ekimlerin ardından 24. saatlerde koloniler sayılmıştır. Aynı saatlerde bakterilerin spektrofotometrede absorbans değerleri OD600 'de ölçölmüştür. Bu petrilerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda oluşun koloniler sayılmış ve CFU/mL hesabı yapılmıştır.

$$\text{CFU/mL} = (\text{Koloni Sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü}) / \text{Petriye Yayılan miktar (mL)}.$$

3.2.1.3.2. Rekabet testi

P. aeruginosa'nın *S. aureus*'u öldürdüğü ve aralarında rekabetçi bir ortam olduğu bilinmektedir. Bakteriler, TSB besiyerinde 37 °C'de 24 saat boyunca geliştirilmiştir. MRSA, dökme plak yöntemi ile TSA besiyerine eklenmiş ve petrilere dökülmüştür. Petrinin tam ortasına 5 µL PAO1 hücresi damlatılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda inhibisyon zonu olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.1.3.3. Dual kültür besiyeri optimizasyonu

Dual kültürler için besiyeri optimizasyonuna gidilmiştir. Çizelge 1.6.'da bu besiyerleri verilmiştir. Kontrol olarak TSB besiyeri kullanılmıştır. MRSA ve PAO1 bakteri kültürleri MHB besiyerinde 37 °C'de, 24 saat boyunca geliştirilmiştir. 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, pelletler bu besiyerleri ile çözülmüştür. Ardından konsantrasyonu OD600=0,1'e ayarlanmıştır. 24 kuyulu plakların her bir kuyusuna konsantrasyonu ayarlanmış, 500 µL PAO1 ve 500 µL *S.aureus* bakterisi eklenmiştir. 24,48 ve 72.saatler ayrı ayrı çalışılmış 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından kuyuların her birinden 100 µL örnek alınarak saf su ile 10⁻¹² seyreltme yapılmış ve seçici olan *Pseudomonas* agar base ve Mannitol salt agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ardından sıvı kısım tamamen uzaklaştırılmış ve kuyulara 250 µL PBS+Triton X-100 eklenmiştir. 15 dk çalkalayıcı da çalkalanarak biyofilm kısmının çözünmesi sağlanmıştır. Tekrar 10⁻¹² seyreltme yapılarak seçici besiyerlerine ekilmiştir. 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar için de aynı adımlar tekrar edilmiştir. Ekimlerin ardından 24. saatlerde koloniler sayılmıştır. Besiyerlerindeki koloni sayıları incelenerek uygun ortam dual kültürlerin geliştirilmesi için seçilmiştir. Dual kültürleri geliştirmek için, MHB besiyerinde gece boyu gelişen bakteri hücreleri alınarak 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pellet dual besiyerinde çözülmüştür. Bakteriler 1:1 oranında olacak şekilde bir araya getirilip OD600=0,1'e ayarlanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 1.5. Dual Besiyeri Denemesi

Dual Kültür Besiyerleri
A)TSB
B)TSB + Fetal Sığır Serumı (FBS) (1:1)
C)TSB + Glikoz%1
D)TSB + Glikoz%1+NaCl%2.5 (TGN)
E)RPMI 1640
F)RPMI 1640 + Glikoz%1
G)RPMI 1640 + Glikoz%1+NaCl%2.5
H)TSB+FBS (1:1) + Glikoz%1+NaCl%2.5

3.2.1.3.4. Biyofilm oluşumu

Tek ve dual kültürlerin biyofilm yapısındaki farkları incelemek için bu test yapılmıştır. Cam tüpler steril edilmiştir. Tek kültürler için TSB besiyeri, dual kültürler için uygun besiyeri eklenerek üzerine 0,5 McFarland'a ayarlanmış bakteri kültürleri konulmuştur. 24 saat boyunca 37 °C'de statik inkübasyonda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm besiyeri içeriği kuyulardan atılarak ve 1 kez PBS ile kuyular yıkanmıştır. Tutunan hücreler %0,1'lik kristal viyole boyası ile 20 dk boyanmış, boyanın fazlası su ile temizlenerek, %30 asetik asit ile muamele edilmiş ve OD595 nm spektrofotometrede ölçüm alınmıştır.

3.2.2. Mikroskopik analizler

Dual kültürlerin oluşturulması, mikroskopik analizler ile de değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. Gram boyama

Deneyde kullanılacak yuvarlak lameller %70 etanol ile temizlenerek UV ile sterilize edilmiştir. 12 kuyulu plaklara yuvarlak lameller konulmuş ve 1 mL dual kültür için uygun besiyerinden eklenmiştir. Üzerine dual kültürler 1:1 oranında eklenerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından yuvarlak lameller cımbız yardımıyla alınarak havada kurutulmuştur. Kristal viyole boyası damlatılmış 30 saniye (sn) bekletilerek saf su ile yıkanmıştır. Gram iyodin solüsyonu eklenmiş 1 dk bekletilmiş

ve %96'lık etanol ile dekolere edilmiştir. Ardından saf su ile yıkanmıştır. Zıt boyama için safranin boyası eklenmiş 30 sn bekletilmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Ardından havada kurutulmuş ve ışık mikroskobunda 1000 kat büyütme ile incelenmiştir.

3.2.2.2. Floresan mikroskobu analizi

Deneyde kullanılacak lameller sterilize edilmiştir. SYTO 9 ve PI boyalarından 1,5 µL alınarak üzerine steril %0,85 NaCl eklenmiş boya konsantrasyonu 100X olarak hazırlanmıştır. Dual kültürler uygun besiyerleri ile 1:1 oranında ayarlanmış, 37°C'de 1 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda 10.000 g'de 2 dk santrifüj edilip pelet 1 mL %0,85 NaCl ile resüspense edilmiştir. Ardından 100 µL örnek alınarak üzerine 100X boyadan 1 µL eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5 µL alınıp mikroskop slaytına bırakılmış ve floresan mikroskobunda, 40X büyütmede görüntü alınmıştır. (Bu boyalar için uyarma/emisyon maksimumu, SYTO 9 boyaması için yaklaşık 480/500 nm ve PI için 490/635 nm'dir.)

3.2.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

6 kuyulu plaklara steril lamel üzerine olacak şekilde 3,5 mL uygun besiyeri ve 1,5 mL OD₆₀₀=0,1'e ayarlanmış dual kültürden ekilmiştir. 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyondan sonra lameller alınmış ve 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından tutunan hücreler %5'lik glutaraldehit ile 1 saat fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından sırası ile %20, %50, %80 ve %100 etil alkollere maruz bırakılarak susuzlaştırılmıştır. Ardından Erzurum Teknik Üniversitesi YUTAM'da bulunan Quanta FEG 250 elektron mikroskobu cihazı ile incelenmiştir.

3.2.3. Peptitlerin sentezi

Tez çalışmasında kullanılan antimikrobiyal peptitler, veri tabanı filtreleme teknolojisi ile Tübitak 122Z741 nolu proje kapsamında dizayn edilmiş ve mikrodalga destekli katı faz peptit sentezi yaklaşımı ile de sentezlenmiştir. Dizayn edilirken antibiyofilm özellik kazandırılmıştır. Hs02 intragenik antimikrobiyal peptidinden

türevlenen VR-10 ve GV-13 peptitleri HPLC ile saflaştırılmış ve Kütle Spektrometrisi (MS) ile analiz edilmiştir. Çizelge 1.5’te şablon peptit ve dizayn edilen peptitlerin birincil yapıları verilmiştir.

Çizelge 1.6.Peptitler ve birincil yapıları

Peptit Adı	Birincil Yapı
Hs02 (Şablon peptit)	KWAVRIIRKFIKGFIS-NH ₂
GV-13	GVKWAVRHIRKLLK-NH ₂
VR-10	VRHLRKFIIKK-NH ₂

3.2.3.1. Karakterizasyon

3.2.3.1.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

FTIR-ATR, Bruker VERTEX 70 V cihazı kullanılarak, fosfat tamponu içerisinde çözölmüş olan 5 µg/mL peptitleri 500-4000/cm⁻¹ frekans aralığında ölçömleri alınmıştır.

3.2.3.1.2. Circular dichroism (CD) spektrometresi

5 µg/mL fosfat tamponu içerisinde çözölmüş olan peptit örnekleri spektrumları, 50 nm/dk tarama hızında, 190-260 nm aralığında 25 °C sıcaklıkta ölçölmüştür Peptit konsantrasyonu olarak iki farklı değeri kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar 0,1 mg/mL ve 1 mg/mL değeri leridir. Elde edilen spektrumlar incelenerek, peptitlerin sekonder yapıları belirlenmiştir. CD spektroskopisi analizi, Gebze Teknik Üniversitesi’nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi

3.2.4.1. Mikrodilüsyon testi (MIC belirlenmesi)

İlk olarak, 96 kuyulu plaklara Çizelge 1.4’te verilen bakteriler için steril 100 µL MHB besiyeri ve dual kültür için ise 100 µL uygun besiyeri eklenmiştir. VR-10 ve GV-13 peptitlerinden 0-256 µg/mL konsantrasyon aralığında kuyulara eklenmiş ve ardından

konsantrasyonu OD600=0,08-0,1'e ayarlanmış (0,5 McFarland) dual ve tek türlü kültürlerden 100 µL eklenmiştir. Kuyular 200 µL'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak bakteri hücresi eklenmemiş bir grup, kontrol olarak da peptit eklenmemiş grup oluşturulmuştur. Bakteriler 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyonun ardından gelişme gözlenmeyen konsantrasyon MIC değeri olarak belirlenmiştir.

Mayalar için, MIC belirlenmesinde, 24 saat patates dekstrozu broth (PDB) besiyerinde geliştirilen mayalar, 1×10^6 - 5×10^6 hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. 96 kuyulu plaklara MOPS eklenmiş 100 µL RPMI 1640 besiyeri içerisine artan konsantrasyonlarda (0-256 µg/mL) ayarlanmış peptitler eklenmiştir. Üzerine maya hücrelerinden 100 µL eklenerek 24 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda gelişimin olmadığı konsantrasyon değeri MIC olarak belirlenmiştir.

3.2.4.2. Kristal viyole (CV) testi (MBIC belirlenmesi)

Peptitlerin dual ve tek türlü kültürlerle karşı antibiyofilm aktivitesi, kristal viyole testi ile değerlendirilmiştir. 96 well plate kuyularına steril 100 µL besiyeri MHB ve dual için uygun besiyeri eklenmiştir. Üzerine artan konsantrasyonlar da ayarlanmış (0-256 µg/mL) VR-10 ve GV-13 peptitlerinden eklenmiştir. Gece boyu sıvı kültüre alınmış bakteriler ve mayalar 0,5 McFarland hücre konsantrasyonuna ayarlanarak ve 100 µL kuyulara eklenmiş, total hacim 200 µL'ye tamamlanmıştır. Plate 37 °C'de 48 saat statik inkübasyonda inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından tüm besiyeri içeriği kuyulardan atılarak ve 2 kez PBS ile kuyular yıkanmıştır. Tutunan hücreler %0,1'lik kristal viyole boyası ile 20 dk boyanmış, boyanın fazlası su ile temizlenerek, %30 asetik asit ile muamele edilmiş ve OD595 nm spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Sadece besiyeri eklenmiş kuyular negatif kontrol olarak oluşturulmuştur. Biyofilm oluşumunun olmadığı konsantrasyon değeri minimum biyofilm inhibitör (MBIC) konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

3.2.4.3. Biyofilm eradikasyon testi (MBEC belirlenmesi)

Bu test, AMP'lerin önceden oluşmuş olan biyofilm tabakasını olan etkilerini belirlemek amacı ile uygulanmıştır. İlk olarak, 96 kuyulu plaklara 100 µL 0,5 McFarland konsantrasyonundaki MRSA, PA01 ve dual bakteri kültürleri ekilerek, 24 saat 37 °C'de statik olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda, tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması için tüm kuyular 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından kuyulara artan konsantrasyonlarda (0-256 µg/mL) VR-10 ve GV-13 peptitleri eklenmiş ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda, biyofilm miktarı, CV boyaması ile incelenmiştir. Boyamada, ilk olarak tüm kuyular 2 kez PBS ile yıkanıp, ardından %0,1'lik CV ile 20 dk boyanmıştır. Süre sonunda boyanın fazlası musluk suyu ile temizlenmiş, %30 asetik asit ile muamele edilerek, OD595 nm'de ölçüm alınmıştır. Biyofilm yapısının azaldığı konsantrasyon değeri, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon (MBEC) değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Mikroskopik analizler

3.2.5.1. Gram boyama

Deneyde kullanılacak yuvarlak lameller sterilize edilmiştir. 12 kuyulu plaklara yuvarlak lameller konulmuş üzerine dual kültür için uygun besiyerinden 1 mL eklenmiştir. Üzerine dual kültürler 1:1 oranında konulmuş ve GV-13, VR-10 peptitleri ½ MIC, MIC konsantrasyonlarında eklenmiştir. Ardından 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından yuvarlak lameller cımbız yardımıyla alınarak havada kurutulmuştur. Kristal viyole boyası damlatılmış 30 sn bekletilerek saf su ile yıkanmıştır. Gram iyodin solüsyonu eklenmiş 1 dk bekletilmiş ve %96'lık etanol ile dekolere edilmiştir. Ardından saf su ile yıkanmıştır. Zıt boyama için safranin boyası eklenmiş 30 sn bekletilmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Ardından havada kurutulmuş ve ışık mikroskopunda 100X büyütmede incelenmiştir. Kontrol olarak peptit eklenmeyen grup kullanılmıştır.

3.2.5.2. Floresan mikroskobu analizi

ABP Biosciences Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity kiti kullanılmıştır. Peptitlerin bakteri membranları üzerine etkilerini incelemek amacıyla bu analiz gerçekleştirilmiştir. SYTO 9 ve PI boyalarından 1,5 µL alınarak üzerine steril %0,85 NaCl eklenmiş boya konsantrasyonu 100X olarak hazırlanmıştır. MRSA, PA01 ve dual kültürler uygun besiyerleri 1:1 oranında ayarlanmış ve VR-10 ve GV-13 peptitleri 2 MIC konsantrasyonunda eklenerek 37 °C’de 1 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda 10.000 g’de 2 dk santrifüj edilip pellet 1 mL %0,85 NaCl ile resüspense edilmiştir. Ardından 100 µL örnek alınarak üzerine 100X boyadan 1 µL eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5 µL alınıp mikroskop slaytına bırakılmış ve floresan mikroskobunda, 400 kat büyütme ile görüntü alınmıştır. Peptit içermeyen grup kontrol olarak kullanılmıştır.

100x boya: 1,5 µL NucView Green (Component A) +1,5 µL Propidium Iodide (Component B) +7 µL %0,85 NaCl

3.2.5.3. SEM analizi

Bu analiz, peptitlerin bakteri suşları üzerinde meydana getirdiği morfolojik değişimleri ve bakteri tutunmasına olan etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. MRSA, PA01 ve dual kültürlerden, 6 kuyulu plaklara steril lamel üzerine olacak şekilde ekilmiştir. Üzerine VR-10 ve GV-13 peptit molekülleri ½ MIC, MIC ve kontrol grupları olacak şekilde eklenmiştir. Dual kültürlerde 37°C’de, 24 saatlik inkübasyonun ardından, tek kültürlerde 37 °C’de, 48 saat inkübasyondan sonra lameller alınmış ve 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından tutunan hücreler %5’lik glutaraldehit ile 1 saat fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından sırası ile %20, %50, %80 ve %100 etil alkollere maruz bırakılarak susuzlaştırılmıştır. Ardından Erzurum Teknik Üniversitesi YUTAM’da bulunan Quanta FEG 250 elektron mikroskobu cihazı ile incelenmiştir.

3.2.6. Bakteri hareketliliğinin incelenmesi

3.2.6.1. Seçirme hareketinin incelenmesi (twitching motility)

Steril mikroskop slaytı üzerine ¼ MIC ve ½ MIC VR-10 ve GV-13 peptitleri içeren TSA (%0,15 agar) besiyerinden 10 µL eklenmiştir. 16-20 saat katı kültürde geliştirilen PA01 hücrelerinden iğne uçlu öze ile 1 koloni alınmış ve bu slaytın üzerine bırakılmıştır. 3 saat 37 °C’de inkübe edilmiş ve faz-kontrast mikroskobu ile görüntüleri alınıp, hareket yetenekleri 1000 kat büyütme ile incelenmiştir.

3.2.6.2. Kaynaşma hareketinin incelenmesi (swarming motility)

16-20 saat MHB besiyerinde geliştirilen PA01 ve MRSA bakteri kültürleri 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Dual kültürler için bakteri hücreleri 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve pellet uygun besiyeri ile çözülmüştür. Bakteri hücreleri 1:1 oranında bir araya getirilip 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Ardından bu hücrelerden 5 µL alınarak ¼ MIC, ½ MIC ve MIC VR-10 ve GV-13 peptitleri içeren MHA (%0,5 agar) besiyerine damlatılmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bakterilerin koloni morfolojileri ve hareketliliği incelenmiştir. Peptit eklenmemiş MHA besiyerindeki gelişim durumu kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.7. Hücre canlılığı tespit kiti-8 (CVDK-8) testi

MRSA, PA01 ve dual kültürler 0,5 McFarland’a ayarlanmıştır. 96 well plate kuyularına 100 µL bakteri hücreleri konulmuştur. Ardından 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC konsantrasyonlarında VR-10 ve GV-13 peptit molekülleri eklenmiştir. 37 °C’de 1 saat statik olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerine 5 µL Ecotech CVDK8 solüsyonu eklenerek 1 saat 37 °C’de statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. OD450 nm spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Peptit eklenmemiş bakteri hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.8. Gen ekspresyon analizleri

3.2.8.1. Bakteri kültürlerinin hazırlanması

PAO1 ve MRSA hücreleri MHB besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de 16-20 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda dual (1:1) ve tek kültürler 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanarak ½ MIC oranında VR-10 ve GV-13 peptitleri eklenmiştir. 16-20 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak peptit eklenmeyen grup oluşturulmuştur.

3.2.8.2. RNA izolasyonu

Trizol yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından tek ve dual kültürlerden ½ MIC VR-10 ve GV-13 peptitleri içeren gruplar ve kontrol grupları 6000 rpm’de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırılmış, spin atılarak kalan kısım da tamamen uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 mL Trizol ile resüspense edilmiştir. Metal boncuk eklenerek 30 h/z’de 10 dk homojenize edilmiştir. Ardından 12.000 g’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınmıştır. 200 µL kloroform eklenerek alt üst edilmiş ve 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 10.000 g, 4 °C’de 15 dk santrifüj edilerek RNA içeren üst faz dikkatli bir şekilde alınmıştır. Soğuk izopropanol 250 µL eklenerek alt üst edilmiş oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Ardından 12.000 g, 4 °C’de 10 dk santrifüj edilerek pellet’e 1 mL soğuk %75 etanol eklenmiştir. 12.000 g, 4 °C’de 10 dk santrifüj edilmiş yıkama işlemi yapılmıştır. Pellet havada kurutulmuştur. Kurumanın ardından pellet 50-100 µL DEPC ile çözülmüş ve bu RNA’ların konsantrasyon ve saflıkları Epoch Mikroplate ile spektrofotometre’de ölçülmüştür. RNA örnekleri %1’lik agaroz jelde 90 walt’da 30 dk yürütülmüştür. RNA’lar deneylerde kullanılmaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.8.3. cDNA sentezi

İzole edilen RNA örnekleri 1 µg'a eşitlenmiş, ticari kit (A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit) yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 1.7'de gösterilen karışım hazırlanmış, üzerine 10 µL dH₂O ile konsantrasyonları eşitlenmiş RNA örneklerinden eklenmiştir. Total hacim 20 µL olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon şartları, 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk ve 4 °C'de ∞ olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 1.7.cDNA 2X RT-Master Mix

İçerik	Miktar (µL)
DEPC'li su	3,2
10X-RT Buffer	2
25X 100 mM dNTP Mix	0,8
10X-RT Random Primer	2
RNaz İnhibitör	1
Reverse transkriptaz	1
Toplam	10

3.2.8.4. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR)

Peptitlerin, bakterilerin virülans genleri üzerindeki etkilerini incelemek için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. *İcaA*, *hla*, *agrA*, *blaZ*, *pbp2a*, *gyrB*, *rpoD*, *lasB*, *pilA*, *algD*, *oprI* virülans genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim analiz edilecektir. Reaksiyonda, HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix 5x kullanılmıştır. qRT-PCR, 5x Master Mix (EvaGreen®) 2 µL, primerler 0,2 µL, cDNA 2 µL, dH₂O 5,6 µL toplam hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, 95 °C, 12 dk; 95 °C, 15 sn; 60 °C, 20 sn veya 60 sn (*rpoD*); 72 °C, 20 sn; 4 °C ∞ ve 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. Ct değerleri *gyrB* ve *rpoD*, housekeeping genleri ile normalize edilerek sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile analiz edilmiştir. One-way ANOVA analizi ile GraphPad (Prism 8.2) programında sonuçların anlamlılığı değerlendirilmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Çizelge 1.8 'de kullanılmış olan primerler ve dizileri verilmiştir.

Çizelge 1.8. qRT-PCR’da kullanılan primerler

	Genler	Primer Dizileri	Referanslar
<i>S. aureus</i>	<i>gyrB</i> (housekeeping)	F: 5’ATCTGGTCGTGACTCTAGAA3’R: 5’TGTACCAAATGCTGTGATCA3’	(Bezar et al. 2019)
	<i>hla</i>	F: 5’GTACAGTTGCAACTACCTGA3’R: 5’CCGCCAATTTTTCTGTATC3’	(Bezar et al. 2019)
	<i>agrA</i>	F: 5’ACGAGTCACAGTGAACCTAC3’R: 5’GACAACAATTGTAAGCGTGT3’	(Bezar et al. 2019)
	<i>blaZ</i>	F:5’TGCTTTAAATACTAAAAGTGGTA AGG3’R:5’AGCAACTATATCATCTTTG TTAATATG3’	(Alexander et al. 2020)
	<i>pbp2a</i>	F:5’ACTTAAAACAAGCAATAGAAATCA TCAG3’R:5’AATTTGAGCATTATAAAA TGGATAATCAC3’	(Alexander et al. 2020)
	<i>icaA</i>	F: 5’ACACTTGCTGGCGCAGTCAA- 3’R: 5’TCTGGAACCAACATCCAACA- 3’	(Ahn et al. 2018)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>rpoD</i> (housekeeping)	F:5’CATCCGCATGATCAACGACA3’R: 5’GATCGATATAGCCGCTGAGG3’	(Beaudoin et al. 2012)
	<i>lasB</i>	F:5’GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGA C3’R:5’TGGCGTCGACGAACACCTCG 3’	(Faraji et al. 2016)
	<i>pilA</i>	F:5’CAGAGGCGACTGGTGAAATC3’ R: 5’AGGGTAGAGTCAGCCGGAAT3’	(Panayidou et al. 2020)
	<i>algD</i>	F: 5’GCGACCTGGACCTGGGCT3’ R: 5’TCCTCGATCAGCGGGATC3’	(Béatrice et al. 2005)
	<i>oprL</i>	F: 5’AACAGCGGTGCCGTTGAC3’ R: 5’GTCGGAGCTGTCGTACTCGAA3’	(Béatrice et al. 2005)

3.2.9. Hemolitik ve sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.9.1. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi

Ticari olarak satın alınan kan örneği üzerine 1:1 oranında steril 1X PBS eklenmiştir. 1000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve yıkama işlemi yapılmıştır. Üst faz alınmış alınan üst faz kadar steril PBS eklenmiştir. Bu işlem üst faz şeffaf olana kadar devam etmiştir. Santrifüj sonunda alt faz alınıp üzerine 1:1 oranında PBS eklenerek örnek sayısı kadar tüplere bölünmüş üzerlerine 4-256 µg/mL oranlarında GV-13 ve VR10 peptitleri eklenmiştir. Ardından 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üst faz 96 kuyulu plaklara aktarılmıştır. OD405 nm spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Pozitif kontrol olarak %100 hemoliz oluşturan Tween-20, negatif kontrol olarak %0 hemoliz oluşturan PBS kullanılmıştır.

3.9.2. MTT testi

GV-13 ve VR-10 peptitlerinin HDFa hücre hattı (Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult) üzerindeki sitotoksik etkileri ticari hücre canlılığı analizleri ile incelenmiştir. 96 kuyulu plaklarda %80 ila %90 tutunma gerçekleştiren hücrelere artan konsantrasyonlarda (0,25-256 µg/mL) peptitler uygulanarak, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. 48 saat sonra 5mg/mL 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) solüsyonu 10 µL eklenmiş, 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda her kuyuya 100 µL DMSO eklenerek 570 nm'de ölçüm alınmıştır.

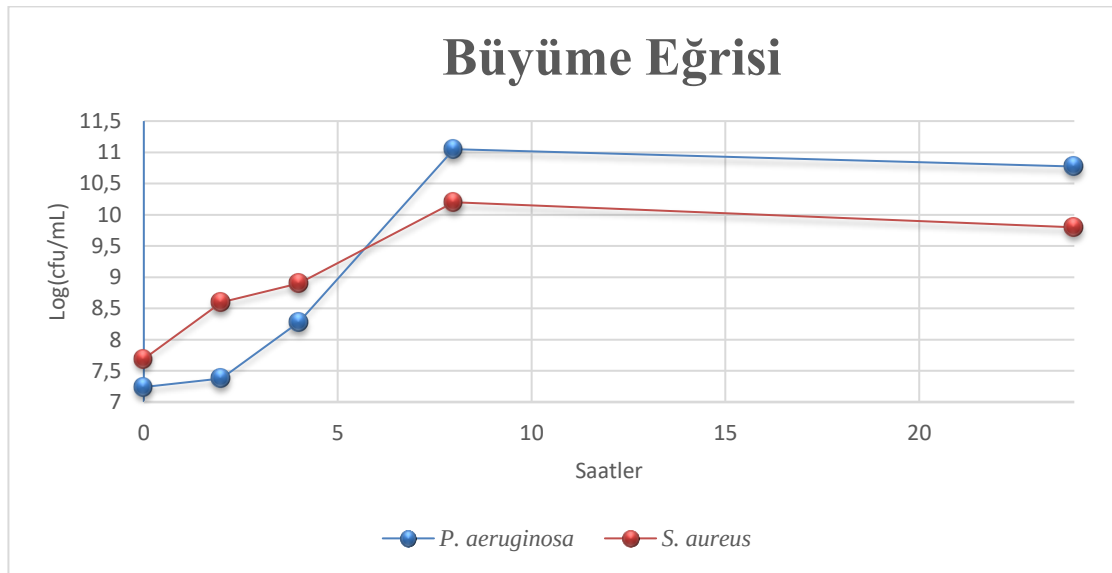
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Dual Kùltürlerin Optimize edilmesi

Peptitlerin dual kùltürler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi için dual kùltür optimizasyonu yapılmıştır. Dual kùltür elde etmek için *P. aeruginosa* (PA01) ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) bakterileri kullanılmıştır.

4.1.1. Büyüme eğrisinin oluşturulması

Bu deney her iki bakterinin büyüme dinamiklerini anlamak ve birlikte kùltürlendiklerinde gösterecekleri etkileşimleri doğru şekilde yorumlayabilmek için gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel büyüme eğrisi, bir bakterinin belirli koşullarda zaman içerisindeki populasyon değişimini gösterir ve genellikle dört evreden oluşur: lag evresi, log evresi, durağan evre ve ölüm evresi. şekil 4.1’de *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerinin bakteriyel büyüme eğrisi verilmiştir.



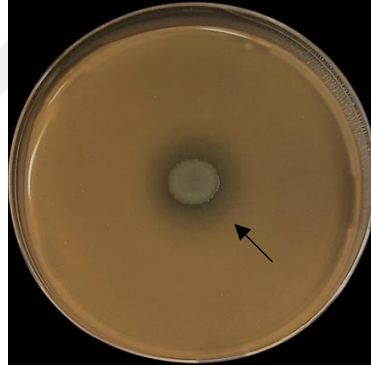
şekil 4.1. Bakteriyel büyüme eğrisi.

Lag evresinde, her iki bakteri türü ortam koşullarına adaptasyon sürecindedir. Özellikle *P. aeruginosa*’da bu faz daha belirgindir. Bu durum, hücrelerin çoğalmadan önce çevresel koşullara adaptasyon sürecinde olduklarını göstermektedir. Log evresine

bakıldığında her iki bakteri türünde de hızlı bir büyüme görülmüştür. Fakat *P. aeruginosa* *S. aureus* 'a kıyasla daha hızlı çoğalma göstermiştir. Her iki türde de 8.saatten sonra hücre yoğunluğunda artış durmuş ve hücre bölünmesi dengelenmiştir. 24.saate doğru bakterilerin hücre sayısında hafif bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak bu faz *P. aeruginosa* için daha az belirgin, *S. aureus*'ta ölüm fazı daha barizdir. Sonuç olarak *P. aeruginosa*'nın hem daha hızlı büyüdüğü hem de durağan fazda daha uzun süre canlı kalabildiği, *S. aureus*'un ise daha erken ölüm fazına geçtiği görülmüştür.

4.1.2. Rekabet testi

P. aeruginosa'nın *S. aureus*'a karşı inhibe edici etkisini belirlemek için bu test uygulanmıştır. *S. aureus*, dökme plak yöntemi ile besiyerine ekilmiş ve üzerine 5 µL PAO1 hücresi damlatılmıştır. 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan inhibisyon zonu şekil 4.2'de gösterilmiştir.

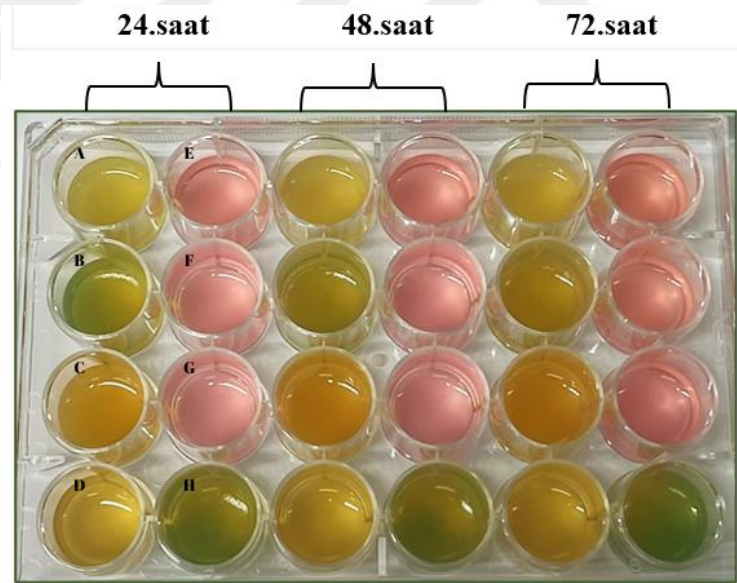


Şekil 4.2. *P. aeruginosa*'nın *S. aureus*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.

Besiyerinin ortasında bulunan *P. aeruginosa* kolonisi, inhibitör bileşiklerini salgılamış ve TSA besiyerinde rahatça difüze olarak çevredeki *S. aureus*'un büyümesini baskılamıştır. Bu da çevresinde büyümenin olmadığı bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu inhibisyon zonundan yola çıkarak bu iki bakterinin aynı ortamda yaşayabilmesi için uygun besiyeri ile *P. aeruginosa* bakterisinin gelişiminin baskılanması ve *S. aureus* bakterisinin kendini inhibitör bileşiklerinden koruması gerekmektedir.

4.1.3. Dual kültürler için besiyeri ortamının geliştirilmesi

Bakteri kültürleri 24 saat boyunca geliştirilmiştir. Santrifüj edilmiş, pelletler bu besiyerleri ile çözülmüştür. Uygun besiyerlerine 1:1 oranında eklenmiş bakteriler 24,48 ve 72 saat boyunca geliştirilerek seçici besiyeri olan mannitol salt agar ve pseudomonas agar base besiyerlerine ekilmiştir. 24,48 ve 72. saatler ayrı ayrı çalışılmıştır ve 8 besiyeri ortamı denenmiştir. Şekil 4.3'te bu besiyerlerine ait plate görüntüsü verilmiştir. Planktonik kısımdan ve biyofilm oluşturan kısımdan örnekler alınarak seyreltme yapılmış hangi besiyerinde ve hangi zaman aralığında bu bakterilerin eşit sayıda geliştiği incelenmiştir. Eşit koloni sayısı içeren besiyeri dual kültürlerin geliştirilmesi için seçilmiştir. Seçici besiyerlerinde gelişen toplam bakteri sayımının birimleri (CFU/mL) ve koloni morfolojileri Çizelge 1.9'da verilmiştir. Besiyeri optimizasyonu yapıldığı için bakteri oranlarında bir değişiklik yapılmamıştır.



Şekil 4.3.Dual kültür besiyeri denemesine ait plate görüntüsü. (A: TSB, B: TSB+FBS, C: TSB+%1 Glikoz, D: TSB+%1 Glikoz+%2,5 NaCl, E: RPMI 1640, F: RPMI 1640+%1 Glikoz, G: RPMI 1640+%1 Glikoz+%2,5 NaCl, H: TSB+FBS (1:1) + Glikoz%1+NaCl%2.5)

Çizelge 1.9. Seçici besiyerlerinde gelişen bakteri koloni sayıları ve morfolojileri.

24.saat				
BESİYERLERİ	Planktonik (Pseudomonas Agar Base Besiyeri) (CFU/ml)	Planktonik (Mannitol Salt Agar Besiyeri) (CFU/ml)	Biyofilm (Pseudomonas Agar Base Besiyeri) (CFU/ml)	Biyofilm (Mannitol Salt Agar Besiyeri) (CFU/ml)
1)RPMI	 9,1x10 ¹⁴ CFU/ml	 Koloni yok.	 1,17x10 ¹³ CFU/ml	 1x10 ¹³ CFU/ml
2)TBS+FBS (1:1) %1 glikoz ve %2,5 NaCl	 3,15x10 ¹³ CFU/ml	 2x10 ¹³ CFU/ml	 Sayılmıyor.	 2x10 ¹³ CFU/ml
3)TSB+%1 glikoz	 Sayılmıyor.	 2x10 ¹³ CFU/ml	 Sayılmıyor.	 Koloni yok.
4)TSB+%1 glikoz+ %2,5 NaCl	 1,6x10 ¹⁴ CFU/ml	 1,6x10 ¹⁴ CFU/ml	 6,2x10 ¹⁴ CFU/ml	 5,9x10 ¹⁴ CFU/ml
5)TSB	 8,1x10 ¹⁴ CFU/ml	 Koloni yok.	 5,03x10 ¹³ CFU/ml	 Koloni yok.
6)RPMI %1 glikoz	 Sayılmıyor.	 Koloni yok.	 5,03x10 ¹³ CFU/ml	 Koloni yok.
7)RPMI %1 glikoz+ %2,5 NaCl	 Sayılmıyor.	 Koloni yok.	 2,65x10 ¹³ CFU/ml	 Koloni yok.
8)TBS+FBS (1:1)	 Sayılmıyor.	 Koloni yok.	 Sayılmıyor.	 Koloni yok.

48 ve 72. saatlik inkübasyonlar sonucunda besiyerlerinde *S. aureus* kolonileri görülmemiştir. 24.saatın sonunda TSB+%1 Glikoz+ %2,5 NaCl besiyerinde bakterilerin yakın koloni sayısına eriştiği gözlemlenmiştir. Bu besiyerin de ki planktonik kısım alınarak seçici besiyerlerine ekilmiş, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* kolonileri sayıldığında iki bakterinin de aynı koloni sayısına sahip olduğu her bakteriden 16 adet koloni olduğu gözlemlenmiştir. Biyofilm tabakası çözündürülüp ekildiğinde ise bu iki bakterinin birbirine yakın koloni sayısı geliştirdiği, *P. aeruginosa* bakterisinin 62 koloni, *S. aureus*'un 59 koloni oluşturduğu belirlenmiştir. Şekil 4.4'te TSB+%1 Glikoz+ %2,5

NaCl besiyerinde gelişen bakterilerin petrideki görüntüleri verilmiştir. Dual kültür için TSB+%1 Glikoz+ %2,5 NaCl besiyeri ve inkübasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir.



Şekil 4.4.TSB+%1 Glikoz+ %2,5 NaCl besiyerinde gelişen bakterilerin petri görüntüleri (**A:** Pseudomonas agar base planktonik, **B:** Mannitol salt agar planktonik, **C:** Pseudomonas agar base biyofilm, **D:** Mannitol salt agar biyofilm).

Gounani ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, *P. aeruginosa* (PA01), *S. aureus* (ATCC 25923)'un birlikte kültürlenmesiyle, enfekte yaralarda oluşan biyofilmleri daha iyi taklit edebilecek bir sistem kurmayı hedeflemiştir. Besiyeri optimizasyonuna gitmişler ve TSB/FBS, TSB/FBS+NaCl %1, TSB/FBS+ NaCl %2,5, TSB/FBS+ Glikoz %1+NaCl %1, TSB/FBS+ Glikoz %1+NaCl %2,5 besiyerlerini tarayarak bu iki bakterinin birlikte yaşayıp biyofilm oluşturabileceği en uygun ortamı seçmişlerdir. En uygun ortamın TSB/FBS+ Glikoz %1+NaCl %2,5 besiyeri ortamı olduğunu bularak mikroskopik görüntüler ile bunu desteklemişlerdir. Bakteri suşları bu besiyerlerine 10:1 oranında eklenmiştir.

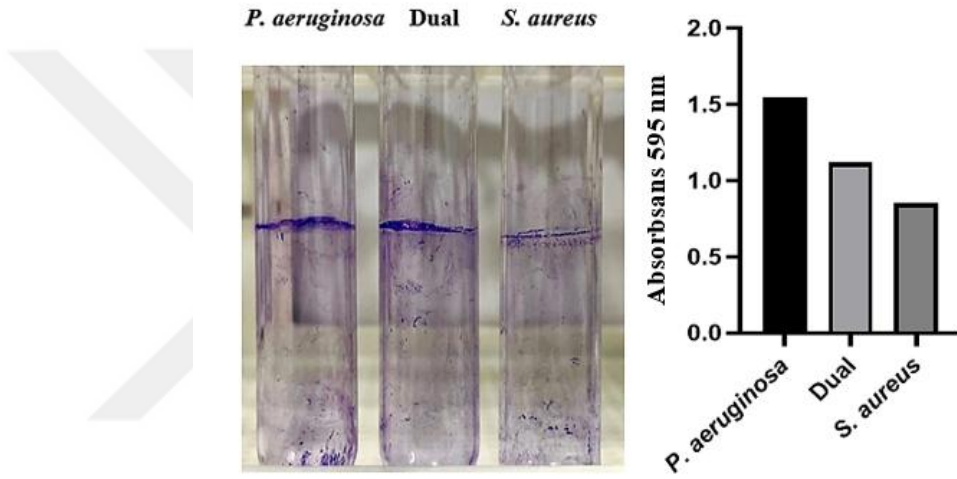
%1 Glikoz, *S. aureus*'da ica operonunu (özellikle *icaA* genini) aktive eder ve bu şekilde biyofilm üretimini teşvik eder. Glikoz sayesinde *S. aureus*, *P. aeruginosa* baskısına rağmen biyofilm formunda hayatta kalabilir. %2,5 NaCl, osmotik stres oluşturarak *S. aureus*'ta biyofilmle ilgili genlerin ekspresyonunu uyarır. Aynı zamanda glikozun etkisini sinerjik biçimde artırarak biyofilm oluşumunu kuvvetlendirir. NaCl bazı durumlarda *P. aeruginosa*'nın büyümesini kısmen baskılayabilir (Gounani et al. 2020).

Bu çalışmadan yola çıkarak tez çalışmasında besiyerleri optimize edilmiş TSB/FBS+Glikoz %1+NaCl %2,5 besiyeri ortamından ziyade FBS içermeyen ortam olan TSB+Glikoz %1+NaCl %2,5 ortamında bakteri suşlarının daha iyi hayatta kalabildiği bulunmuştur. Bakterilerin 10:1 oranında değil de eşit sayıda eklenerek sadece besiyeri optimizasyonu ile bakteri sayıları eşit tutularak *P. aeruginosa*'nın *S. aureus*'a karşı

inhibitör etkisi baskılanmıştır. *S. aureus*'un biyofilm oluşumu artırılmıştır. Sonuçlar bu tez çalışmasının özgün değerini oluşturmuştur.

4.1.4. Biyofilm oluşumu

Cam tüplere tek ve dual kontrol grupları eklenerek biyofilm oluşumları incelenmiş ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.5'te tek ve dual kültürlerde biyofilm oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Tek ve dual kültürlerde biyofilm oluşumu.

P. aeruginosa, TSB ortamında tek başına yüksek düzeyde biyofilm oluşturmuştur. Buna karşın, *S. aureus*'un aynı ortamda oluşturduğu biyofilm miktarı belirgin şekilde daha düşüktür. Ancak zenginleştirilmiş ortamda (TSB + %1 glikoz + %2.5 NaCl) elde edilen sonuçlar, biyofilm miktarının ne *P. aeruginosa*'nın TSB'deki seviyesine kadar yükseldiğini ne de *S. aureus*'un seviyesine kadar düştüğünü göstermiştir. Bu durum, glikoz ve NaCl varlığının *S. aureus*'un biyofilm oluşumunu artırdığını, ancak aynı ortamda *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma kapasitesinin baskılandığını düşündürmüştür.

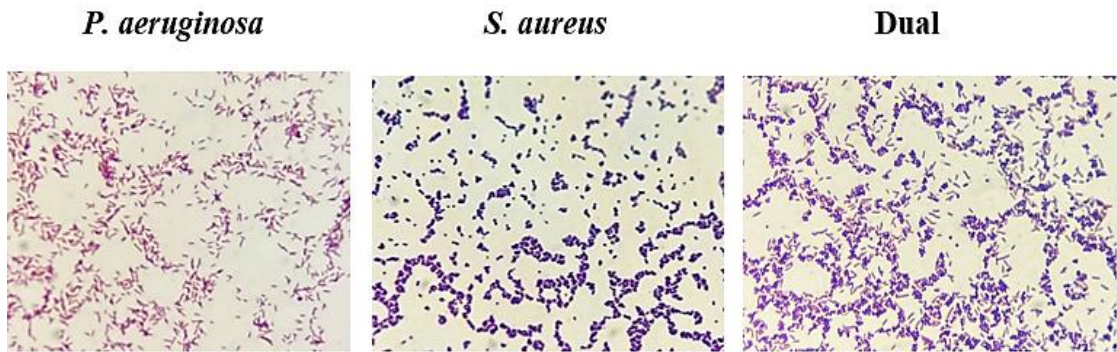
Trizna ve arkadaşları tarafından 2020 yılında gerçekleştirilen çalışmada, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un birlikte oluşturduğu (dual) biyofilmlerde, antibiyotik duyarlılığında çift yönlü değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir. Araştırmada, dual

kültür biyofilmlerinin monokültürlere kıyasla daha yoğun ve kompleks bir yapı sergilediği, CV boyama yöntemiyle biyofilm miktarının her iki bakteri türü için de arttığı rapor edilmiştir (Trizna et al. 2020).

Buna karşın, bu tez çalışmasında elde edilen veriler, CV boyamasıyla değerlendirilen dual biyofilm oluşumunun, tekli kültürlerde gözlenen biyofilm düzeylerine kıyasla daha orta seviyede kaldığını ortaya koymuştur. Bu durum, her iki bakterinin aynı ortamda aşırı biyofilm oluşturmaktan kaçınarak daha dengeli bir yapı geliştirdiğini düşündürmektedir. Böyle bir biyofilm organizasyonu, polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde tedaviye yanıtın farklılaşmasına neden olabileceği için klinik açıdan dikkat çekicidir.

4.1.5. Gram boyama

Gram boyama yöntemi ile tek ve dual kültürler incelenmiştir. Dual kültürlerin oluşturulması mikroskopik analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Dual için TSB + %1 Glikoz + %2,5 NaCl besiyeri kullanılmış ve bakteri sayıları 1:1 oranında eklenmiştir. Tek kültürler için TSB besiyeri kullanılmıştır. Uygun adımlarla boyama işlemleri yapılarak 1000 kat büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 4.6'da gram boyama sonucunda incelenen örneklerle ait görüntüler verilmiştir.



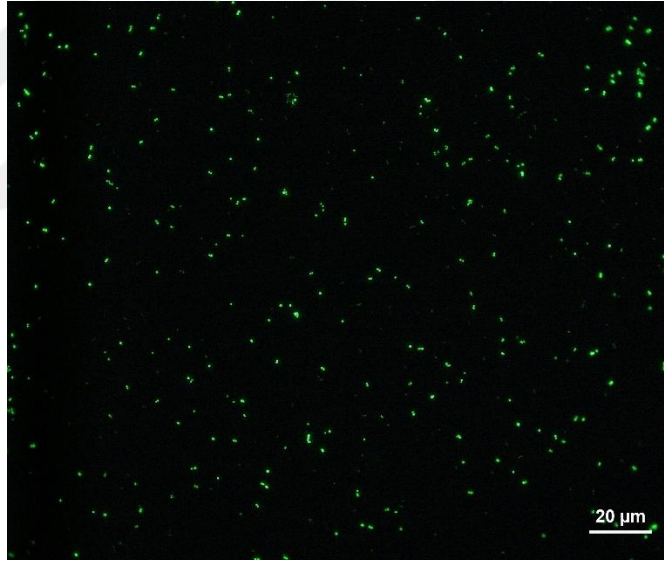
Şekil 4.6. Tek ve dual kültürlerin gram boyama sonuçları (Büyütme;100X).

P. aeruginosa gram-negatif olduğu için safranin boyasını alarak pembe renkte, ince, kısa veya uzun basiller şeklinde görülmüştür. *S. aureus*, gram-pozitif olduğu için

kristal viyole boyasını tutarak mor renkte görülmüştür. Dual kültürde mor renkli *S. aureus* yapıları, pembe renkli *P. aeruginosa* çubukları açıkça ayırt edilmiştir. Bu, her iki bakterinin de kültürde birlikte hayatta olduğunu, yani ikili kültürün başarılı olduğunu göstermiştir.

4.1.6. Floresan mikroskopu analizi

Dual kültürlerin oluşturulmasındaki bir diğer mikroskopik analiz yöntemi de floresan mikroskopu analizidir. Dual kültürler uygun besiyerleri ile 1:1 oranında ayarlanmış, 1 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Syto 9/PI boya ile boyanarak floresan mikroskopunda 400 kat büyütme ile canlılıkları incelenmiştir. 4.7’de dual kültürün farklı kanallarda floresan mikroskopunda incelenen görüntüleri verilmiştir.



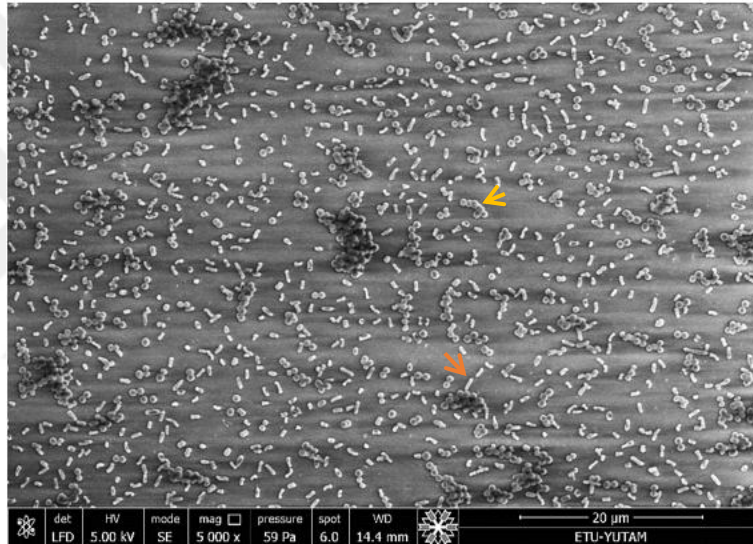
Şekil 4.7.Dual kültür Syto 9/PI boyama sonucu (Büyütme;40X).

Floresan mikroskopisi görüntülerinde yapılan incelemeler, dual kültürdeki bakterilerin büyük çoğunluğunun canlı olduğunu ortaya koymuştur. Yeşil floresan sinyallerin yoğunluğu, kültürde yüksek oranda canlı hücre bulunduğunu göstermiştir. Çubuk ve yuvarlak hücre morfolojileri net bir şekilde ayırt edilmiştir.

4.1.7. SEM analizi

Dual kültürlerin oluşturulmasındaki bir diğer mikroskopik analiz yöntemi de SEM analizidir. Dual kültürler 24 saat inkübe edilmiş sonra lameller alınmış ve yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından tutunan hücreler glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından farklı oranlarda etil alkollere maruz bırakılarak susuzlaştırılmış ve taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 4.8’de dual SEM analizi görüntüsü verilmiştir.

Dual Kültür



Şekil 4.8. Dual kültür SEM analizi görüntüsü (Büyütme; 50.000X, Sarı ok: *S. aureus*’u Turuncu ok: *P. aeruginosa*’yı göstermektedir).

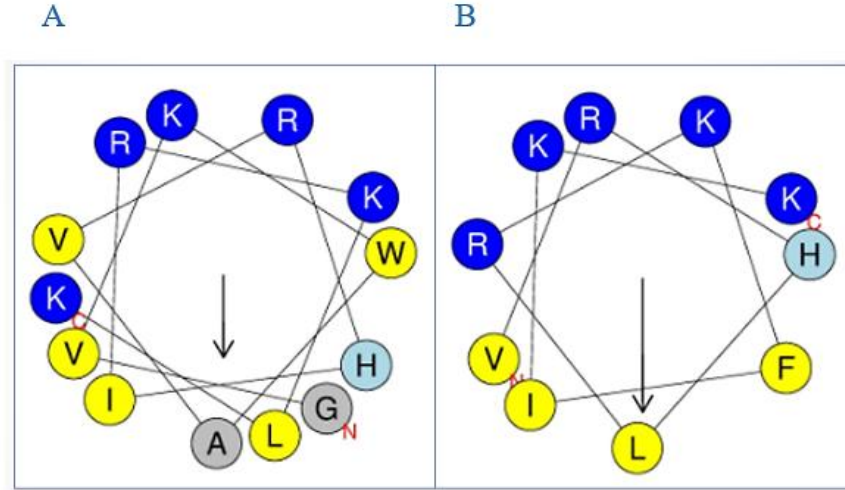
SEM analizin de *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’nın birlikte yer aldığı dual kültür sisteminde iki türün yüzey üzerindeki morfolojik dağılımları ve etkileşimleri net bir şekilde gözlemlenmiştir. Elde edilen görüntülerde, küresel morfolojiye sahip *S. aureus* hücrelerinin belirgin agregasyonlar oluşturduğu, çubuk formdaki *P. aeruginosa* hücrelerinin ise yüzey boyunca daha dağınık ve homojen şekilde yayıldığı tespit edilmiştir. *S. aureus*’un oluşturduğu bu agregatlar, hücreler arası etkileşimlerin ve muhtemel biyofilm başlangıcının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, *P. aeruginosa*’nın yüzeyde daha yaygın bir yerleşim göstermesi, bu türün hareket yeteneği ve QS mekanizmaları aracılığıyla farklı bir kolonizasyon stratejisi izlediğine işaret etmektedir. İki türün bir arada bulunabilmesi dual kültürün başarılı olduğunu göstermiştir.

4.2. Peptitlerin Sentezi

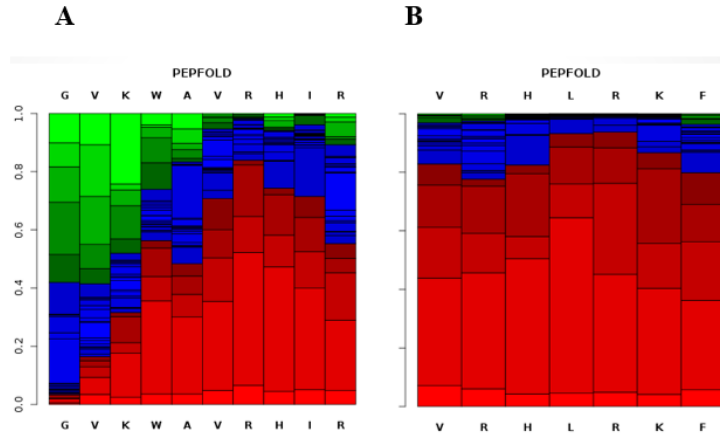
Antibiyofilm etkili küçük katyonik ABP moleküllerinin tasarımı amacıyla veritabanı tabanlı bir karşılaştırma ve filtreleme yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda, APD3 veri tabanında yer alan toplam 72 antibiyofilm peptit referans alınarak; tasarlanan ABP'lerin hidrofobik içerikleri, üç boyutlu yapıları, net yükleri, Boman indeksleri ve amino asit sayıları hesaplanmıştır. Her bir parametre için ortalama değerlere en yakın özellikler gösteren peptitler belirlenmiş ve analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. *Homo sapiens* kaynaklı bir ABP molekülü olan Hs02, şablon peptit olarak seçilmiştir. ABP dizilerinin antibiyofilm etkinliğini artırmak amacıyla, amino asit sayıları azaltılarak çeşitli mutasyonlar uygulanmıştır. Tasarlanan varyantlar arasından, hemolitik ve antijenik potansiyele sahip olmayan diziler belirlenerek seçim sürecine dahil edilmiştir. Ayrıca, hücre penetrasyon kabiliyeti gösterdiği öngörülen diziler de değerlendirilmiştir. Uygun bulunan peptit dizilerine, stabilizeyi ve biyolojik aktiviteyi artırmak amacıyla uç modifikasyonları uygulanmıştır. Şekil 4.9'da dizayn edilen peptit dizilerine ait sarmal tekerlek grafiği verilmiştir. VR-10 ve GV-13 adını vermiş olduğumuz peptitlerin sentezinde >%95 saflık oranı belirlenmiştir. Çizelge 1.10.'da dizayn edilen ABP moleküllerinin özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.10.ABP moleküllerinin özellikleri.

Peptit Adı	Moleküler Ağırlığı (Da)	Hidrofobik Oranı	Net Yük	Elde Edilme Saflığı
GV-13	1590.972	%46	+5,25	95.5%
VR-10	1324.672	%40	+5,25	95.2%



Şekil 4.9. Dizayn edilen peptit dizilerine ait sarmal tekerlek grafiği. Biyoinformatik araçlarla yapılan tahminlerde bu peptit dizilerinin amfipatik ve α -heliks yapısında olduğu tahmin edilmiştir. Oklar, hidroforik momentin yönünü göstermektedir. Mavi renkli amino asitler, pozitif yüklü olanları, sarı renkli olanlar, hidrofobik amino asitleri, griler, küçük ve nötr amino asitleri göstermektedir (A: GV-13, B: VR-10).



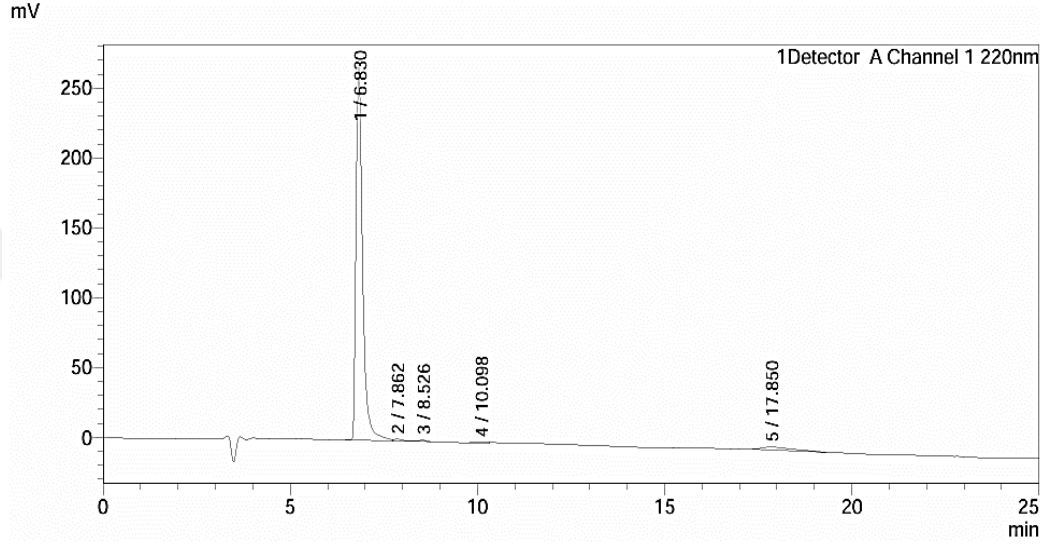
Şekil 4.10. Peptitlerin pepfold analizi sonuçları (A: GV-13, B: VR-10).

Tahmini olarak yapılan bu analizde de kırmızı bölgeler Alfa-heliksi, mavi β -yapıları, yeşil düzensiz yapıları göstermektedir. GV-13'ün ilk birkaç amino asidi sarmal yapıdan sapmış, ancak orta ve son bölgesinin güçlü şekilde heliks eğilimli olduğu ön görülmüştür. VR-10 peptidinin neredeyse tamamen alfa-heliks formunda yapısının olduğu tahmin edilmiştir.

HPLC ve kütle spektrometrisine ait veriler şekil 4.11-4.14 arasında sunulmuştur. Bu sonuçlar hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir.

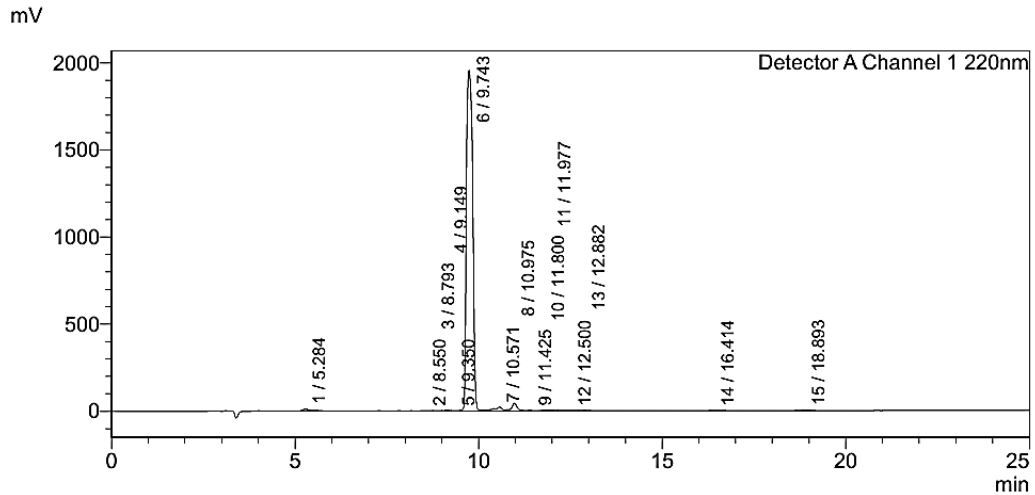
4.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

220 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır, bu da genellikle peptitlerin amid bağları tarafından iyi absorbe edilen bir dalga boyudur. Grafikte en belirgin tek bir ana pik örneğin büyük ölçüde saf bir peptit (VR-10) içerdiğini göstermiştir.



Şekil 4.11.VR-10 peptidinin sentez sonucu.

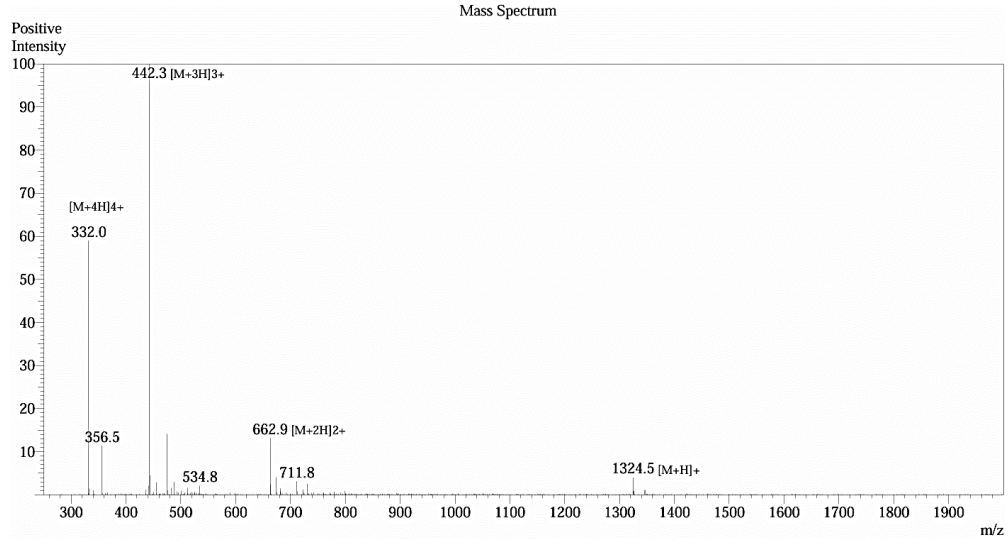
VR-10 peptidine kıyasla, GV-13 peptidin de daha yüksek bir absorbans, birkaç farklı pik gözlemlenmiş ve yoğun bir pik olduğu görülmüştür. Grafikte en belirgin tek bir ana pik örneğin büyük ölçüde saf bir peptit (GV-13) içerdiğini göstermiştir.



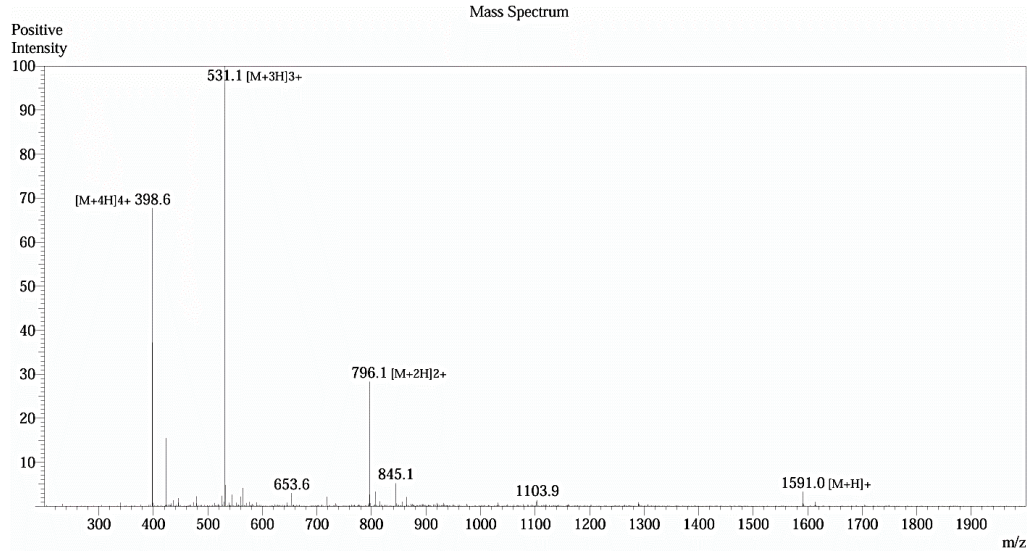
Şekil 4.12.GV-13 peptidinin sentez sonucu.

4.2.2. Kütle spektrometrisi (MS)

Sonuçlarımız, peptitlerin beklenen başarıyla sentezlendiği ve MS analizi ile doğrulandığı göstermiştir. Analiz sonuçlarımız, peptidin saflığı hakkında bilgi vererek sonraki biyolojik uygulamalar için uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.13.VR-10 sentez sonucu.

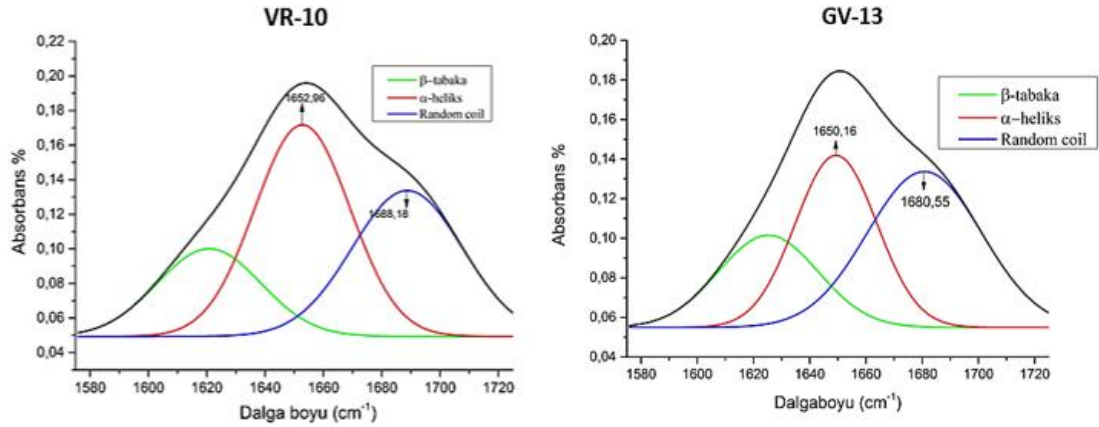


Şekil 4.14.GV-13 sentez sonucu.

4.3. Karakterizasyon

4.3.1. FTIR analizi

Peptitlerin sekonder yapılarının belirlemek için bu analiz yöntemi gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik olarak peptitlerin sekonder yapıları belirlenmiş fakat bu analiz ile peptitlerin su içerisinde çözündüğünde hangi formlarda olabileceği incelenmiştir. 1 mg peptit örnekleri ile çalışılmıştır. FTIR analizlerinde 500-4000 cm^{-1} dalgaboyu aralığında ölçüm alınmış; analizler ise, amid I bağına karşılık gelen 1600-1700 cm^{-1} aralığı için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15'te FTIR analizi sonuçları verilmiştir.



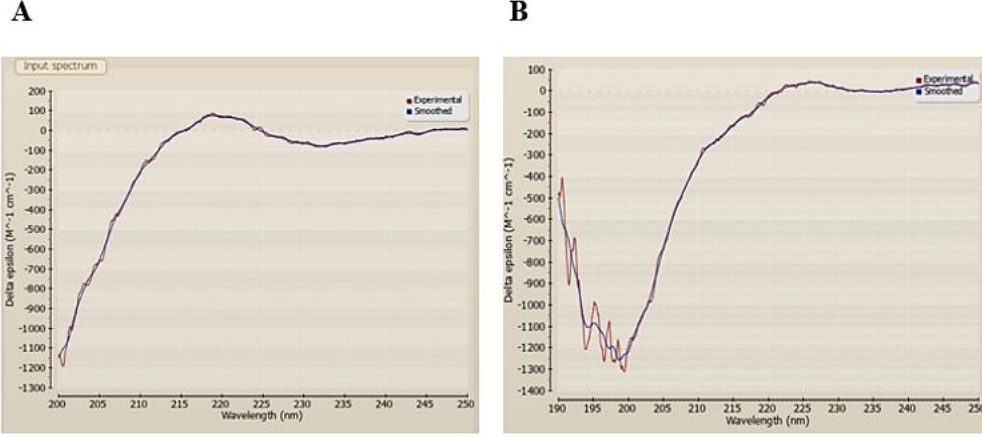
Şekil 4.15.VR-10 ve GV-13'ün FTIR analizi sonuçları.

Analizler sonucunda, VR-10 peptidinin α -heliks ve random coil yapısına sahip olduğu, β -tabaka içeriğinin düşük olduğu görülmüştür. GV-13 peptidin de ise baskın yapının α -heliks olduğu, random coil içeriğinin VR-10'a göre biraz daha düşük, ancak yine de bulunduğu görülmüştür. β -tabaka yapısının ise düşük olduğu belirlenmiştir.

4.3.2. CD spektroskopisi

CD spektroskopisi peptitlerin sekonder yapılarının tespit edilmesi için kullanılmıştır. CD spektroskopisinden alınan sonuçlar FTIR analizini desteklemektedir. Bu iki yöntem birlikte kullanıldığında, sonuçların doğruluğunu da arttırmaktadır. Peptit konsantrasyonu olarak 0,1 mg/mL ve 1 mg/mL değerleri kullanılmıştır. Şekil 4.16'da CD

analiz sonuçları verilmiştir. Çizelge 1.11’de ise peptitlerin sekonder yapılarının % oranları verilmiştir.



Şekil 4.16.VR-10 ve GV-13 peptitlerinin CD analiz sonuçları (A: VR-10, B: GV-13).

Çizelge 1.11.CD spektroskopisi analiz sonuçları.

	Peptid Adı	Sekonder Yapılarının Tahmini
1	VR-10	%34,1 Heliks, %65,9 Antiparalel, %0 Diğer
2	GV-13	%66,1 Heliks, %33,9 Turn, %0 Diğer

VR-10 spektrumu, VR-10 peptidinin ağırlıklı olarak düzensiz (random coil) yapıda olduğunu göstermiştir. GV-13 spektrumu ise, peptidin belirgin şekilde α -heliks yapı içerdiğini göstermiştir. Pepfold analizi sonucunda VR-10 peptidinin neredeyse α -heliks yapıda olduğu belirlenmesine rağmen FTIR ve CD sonuçlarında heliks yapı içerdiği fakat düzensiz yapının daha çok olduğu belirlenmiştir. GV-13 peptidinin de tahmin edilen veriler ile analiz sonuçları uyumlu olup α -heliks içeriğinin fazla olduğu belirlenmiştir.

4.4. Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi

4.4.1. Mikrodilüsyon testi (MIC belirlenmesi)

VR-10 ve GV-13 peptitlerinin Çizelge 1.4’te verilen bakteriler ve maya suşlarına karşı mikrodilüsyon testi ile MIC değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 1.12 ve Çizelge 1.13’te verilmiş olan MIC değerlerine bakıldığında, GV-13 ve VR-10 peptitlerinin 12 farklı bakteri suşu ve dual kültür üzerinde, türe bağlı olarak farklı MIC değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Candida suşları üzerindeki etkinliği incelendiğinde ise, Candida suşlarına karşı etkinliğin çok az veya olmadığını görülmüştür.

Çizelge 1.12.GV-13 peptidinin tek ve dual bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.

GV-13		
<i>Bakteri Suşları</i>	MIC (µg/mL)	MBIC (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	64	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	64	16
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	128	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	>256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32	64
<i>Escherichia coli</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(EC1)	8	32
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP1)	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP2)	8	128

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300+	128	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (Dual kültür)		
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	128	>256
<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1025	64	>256
<i>Candida propilosis</i> ATCC 22019	256	>256
<i>Candida dupliniensis</i> CBS 7987	>256	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	>256	>256

Çizelge 1.13.VR-10 peptidinin tek ve dual bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.

VR-10		
Bakteri Suşları	MIC (µg/mL)	MBIC (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>256	>256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	256	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	>256	>256
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	256	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64	128
<i>Escherichia coli</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(EC1)	32	64
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP1)	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP2)	>256	>256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300+	128	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (Dual kültür)		
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>256	>256
<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1025	>256	>256
<i>Candida propilosis</i> ATCC 22019	>256	>256
<i>Candida dupliniensis</i> CBS 7987	>256	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	>256	>256

GV-13 peptidi *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı etkinlik göstermiştir. Fakat MBIC sonucunda bir anlamlılık görülmemiştir. VR-10 peptidi *Candida* suçlarına karşı herhangi bir etkinlik göstermemiştir. Bundan dolayı diğer deneysel aşamalara *Candida* suşları dahil edilmemiştir.

Santos ve arkadaşları tarafından 2023 yılında Hs10 adlı IAP bulunmuş ve bu peptidin gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı vurgulanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda Hs02'den türevlenerek dizayn edilen peptitlerin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu görülmüştür (Santos et al. 2023).

Park ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada, PS1-2, PS1-5 ve PS1-6 adlı sentetik antimikrobiyal peptitlerin hem ilaç duyarlı hem de dirençli *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşlarına karşı MIC değerleri belirlenmiştir. *P. aeruginosa* için MIC değerleri 1–4 µg/mL arasında değişmektedir. *S. aureus* için, MIC değerleri 2–32 µg/mL arasında değişmektedir (Park et al. 2019).

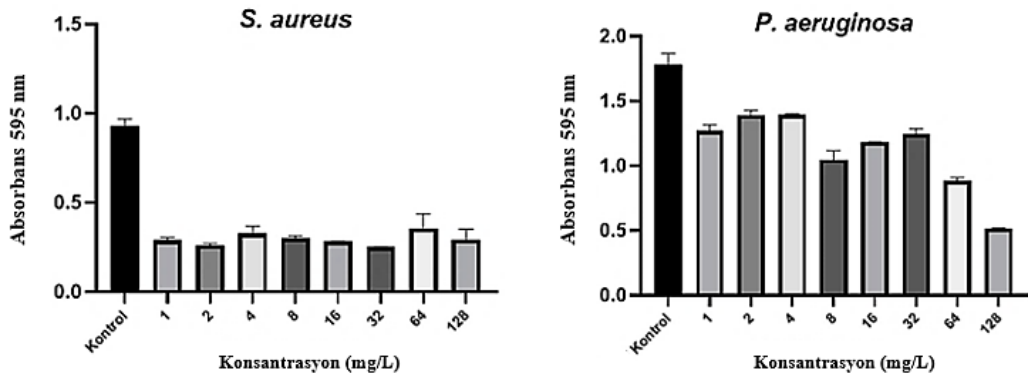
Bessa ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada HS02 peptidinin PAO1 bakterisine karşı 8 µg/mL konsantrasyonunda antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuş fakat MRSA bakterisine karşı etkinliği araştırılmamıştır. Dual kültür çalışması yapılmış *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un farklı suşları kullanılmış dual kültürlerde antimikrobiyal etki çalışılmamıştır. HS02'den türevlenen GV-13 peptidinin 64 µg/mL konsantrasyonunda antimikrobiyal etki gösterdiği yapılan deneyler sonucu bulunmuştur. PA01 ve MRSA bakterilerinden dual kültür oluşturarak bunların MIC değerlerinin her iki peptit içinde 128 µg/mL olduğu bulunmuştur (Bessa et al. 2019).

4.4.2. Kristal viyole (CV) testi (MBIC belirlenmesi)

MIC testinden iyi sonuç aldığımız PAO1 ve MRSA bakterileri ile diğer deneylere devam edilmiştir. Bu iki bakterinin 1:1 oranında karıştırılması ile de dual kültür olarak deneyler devam etmiştir.

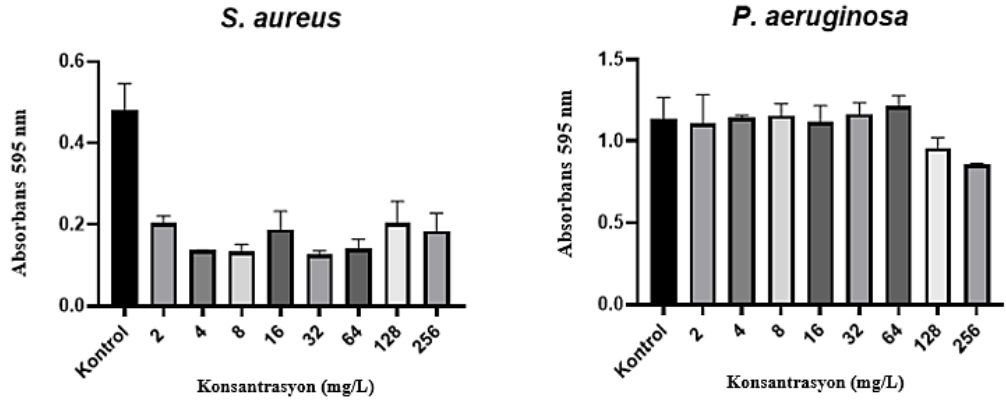
MBIC belirlenmesinde tek kültürlerde 48 saat dual kültürlerde 24 saat statik inkübasyonun ardından kristal viyole boyaması yapıp absorbans değeri (OD595) alınmıştır. PAO1, MRSA suşlarının ve dual kültürün antibiyofilm aktivitesine ait konsantrasyona bağlı grafikler Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19’da verilmiştir. Bu grafiklerde CV testi sonucu alınan absorbans değerleri verilmiştir. Her deney grubu, deneye başlanılan hücre sayısını sabit tutmak amacı ile ayrı kontroller kullanılarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerden MBIC değeri belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak, bakteri ekilmemiş kuyuların absorbansı alınmış ve buna göre MBIC değeri hesaplanmıştır. Sonuçlar, MIC değerleri ile karşılaştırmalı olması için Çizelge 1.12 ve Çizelge 1.13’te verilmiştir.



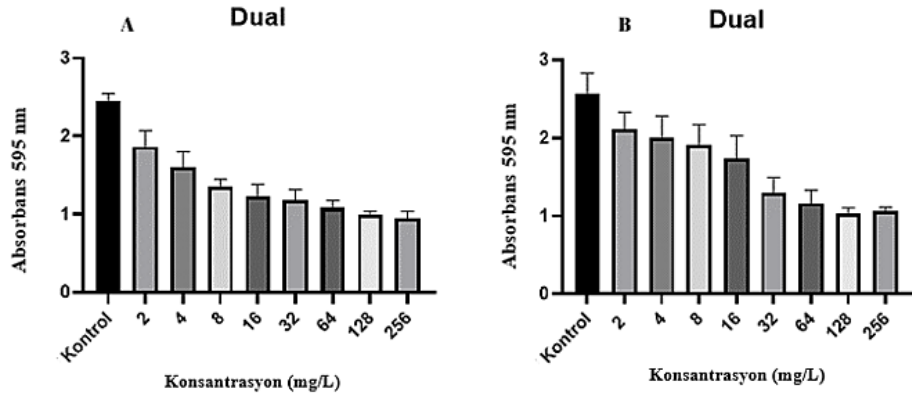
Şekil 4.17.GV-13’ün *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi.

S. aureus için, GV-13 uygulamasıyla birlikte biyofilm miktarında belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Tüm uygulanan konsantrasyonlarda absorbans değerlerinin anlamlı şekilde düştüğü belirlenmiştir. MBIC değerinin 2 µg/mL olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa* için, 1–8 mg/L arasındaki düşük konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunda belirgin bir azalma gözlenmezken, 16 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda absorbans değerlerinde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Özellikle 64 mg/L ve 128 mg/L konsantrasyonlarında biyofilm oluşumunda azalma tespit edilmiştir. MBIC değeri 128 µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18.VR-10'nun *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi.

S. aureus suşunda, VR-10 uygulamasının ardından özellikle 4–16 mg/L konsantrasyon aralığında biyofilm miktarında anlamlı azalma meydana gelmiştir. MBIC değeri 8 mg/L olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa* için elde edilen sonuçlar, peptidin bu türde düşük konsantrasyonlarda anlamlı bir antibiyofilm etkisi göstermediğini ortaya koymuştur. 2–64 mg/L absorbans değerleri kontrol grubuna benzer seyretmiş, ancak 128 ve 256 mg/L konsantrasyonlarında biyofilm oluşumunda belirgin azalma meydana gelmiştir. MBIC değeri 256 mg/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.19.Peptitlerin dual biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi (A: GV-13, B: VR-10).

Her iki peptidin de artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. GV-13 peptidi, 4 mg/L konsantrasyondan itibaren kontrole kıyasla biyofilm oluşumunda belirgin bir azalmaya neden olmuştur. VR-10 peptidinde ise benzer bir durum görülmekle birlikte, anlamlı azalma 16 mg/L'den itibaren başlamış ve absorbans değeri 256 mg/L'ye kadar kademeli olarak azalmıştır. Elde edilen

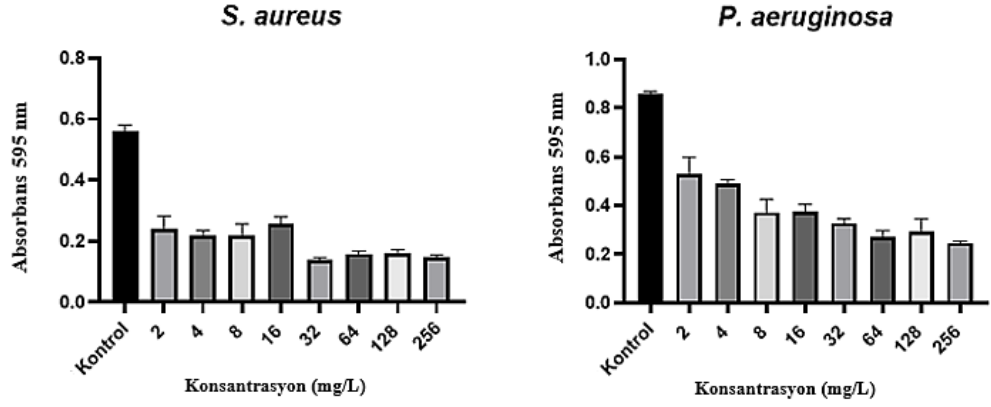
veriler doğrultusunda GV-13 peptidinin VR-10'a kıyasla dual biyofilm oluşumunu daha düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği görülmüştür. GV-13 peptidinin MBIC değeri 16 mg/L, VR-10 peptidinin ise 32 mg/L olarak belirlenmiştir.

Bessa ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada Hs02 peptidinin MIC altı konsantrasyonlarda tek ve çift türlü *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un biyofilm oluşumunu engelleyemediğini vurgulamışlardır (Bessa et al. 2019). Bu bilgiden yola çıkarak Hs02 peptidinin dizayn edilen türevlerinin (GV-13 ve VR-10) kristal viyole testi ile güçlü antibiyofilm aktivite sergiledikleri bulunmuştur.

Chen ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada Dermaseptin-AC adlı antimikrobiyal peptidin, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) biyofilmlerine karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Kristal Viyole boyama yöntemiyle yapılan MBIC ve MBEC testlerinde, peptidin hem biyofilm oluşumunu inhibe ettiği hem de olgun biyofilmleri eradike ettiği belirlenmiştir (Chen et al. 2021).

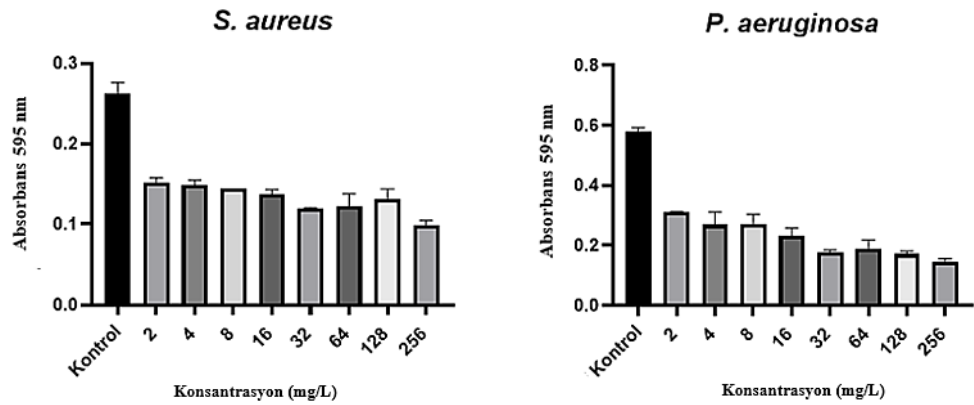
4.4.3. Biyofilm eradikasyon testi (MBEC belirlenmesi)

Bu test, ABP'lerin önceden oluşmuş olan biyofilm yapılarına etkilerini belirlemek amacı ile uygulanmıştır. ABP'lerin biyofilm miktarına etkisi, CV boyaması ile incelenmiştir. OD595 nm'de ölçümleri alınmıştır. Biyofilm yapısının azaldığı konsantrasyon değeri, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon (MBEC) değeri olarak belirlenmiştir. PAO1, MRSA suşlarının ve dual kültürün oluşmuş biyofilm bozulmasına olan etkilerine ait konsantrasyon bağlı grafikler Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.20.GV-13'in oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi.

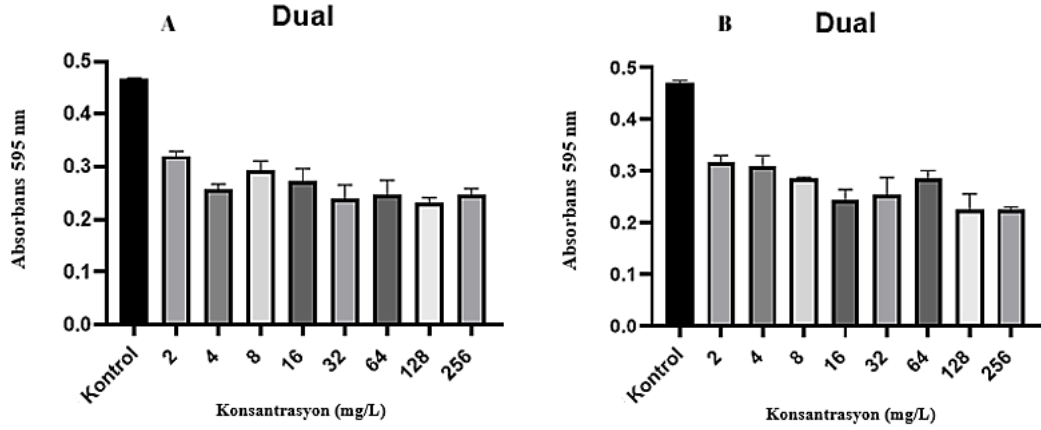
S. aureus biyofilmi için kontrole kıyasla GV-13 uygulanan gruplarda doza bağlı olarak bu değer anlamlı şekilde azalmıştır. Özellikle 2 mg/L gibi düşük konsantrasyonda dahi biyofilm oluşumunun baskılandığı görülmüş, 32 mg/L konsantrasyonunda biyofilm miktarının minimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* biyofilmi için kontrole kıyasla GV-13 uygulamasıyla biyofilm oluşumunda kademeli bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma *S. aureus*'a kıyasla daha sınırlı düzeyde gerçekleşmiştir. Özellikle 64 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda biyofilm inhibitör etkisinin daha belirgin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21.VR-10'nun oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi.

S. aureus için kontrole göre VR-10 uygulanan gruplarda bu değer hafif düzeyde azalmıştır. Özellikle 128 ve 256 mg/L konsantrasyonlarında biyofilm miktarında gözle görülür bir azalma izlenmiş olsa da genel olarak peptidin *S. aureus* biyofilmi üzerindeki etkisi sınırlı kalmıştır. Öte yandan, *P. aeruginosa* biyofilmi üzerinde VR-10 peptidinin

daha belirgin bir inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrole göre VR-10 uygulaması ile konsantrasyona bağlı olarak değerler kademeli biçimde azalmış, 32 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda biyofilm miktarında anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. Peptitlerin oluşmuş biyofilmin bozulmasına olan etkisi (A: GV-13, B: VR-10).

GV-13 peptidinin uygulandığı grupta, düşük konsantrasyonlarda biyofilm üzerinde sınırlı bir azalma gözlemlenirken, 32 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda biyofilm miktarında bir düşüş kaydedilmiştir. Benzer şekilde, VR-10 peptidinin uygulandığı grupta, biyofilm miktarında konsantrasyon artışına paralel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

Hirt ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada GL13K, sentetik bir peptidin *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı güçlü antibiyofilm aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. 24 saatlik biyofilmler, 64 µg/mL peptitle tedavi edilmiş ve biyofilm eradikasyonu gözlemlenmiştir (Hirt and Gorr 2013).

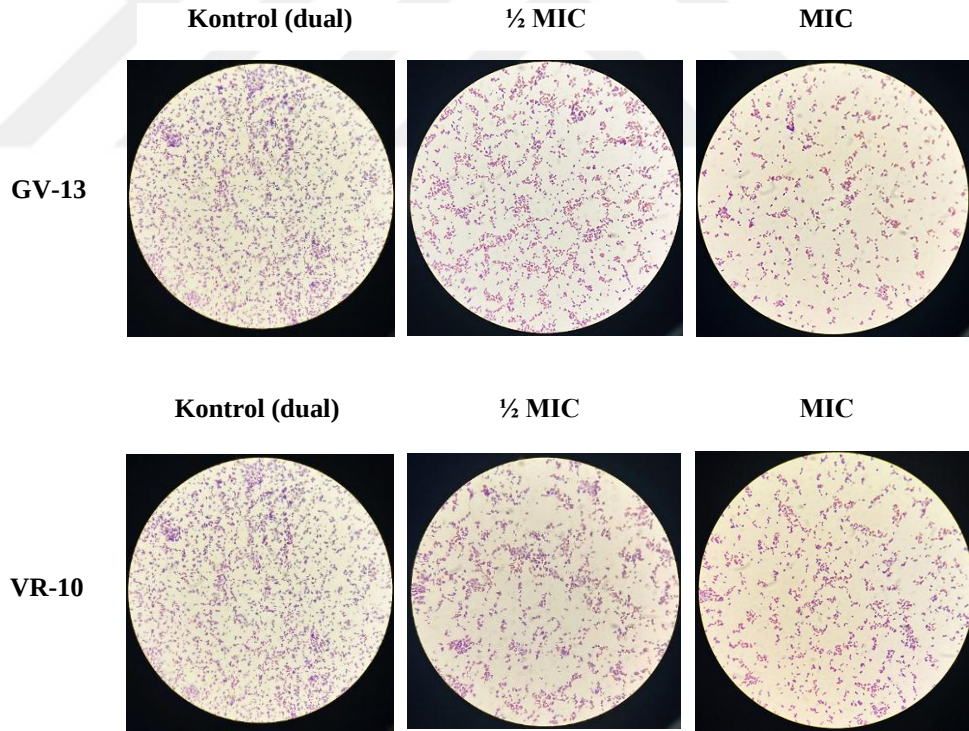
Fei ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada kurbağa türevli OG9c-De-NH₂ peptidinin, MRSA dahil olmak üzere *S. aureus* biyofilmlerine karşı 1 µM konsantrasyondan daha yüksek eradikasyon kapasitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Biyofilm matris bileşenlerini azaltarak MBEC düzeyinde etki sağlamıştır (Fei et al. 2023).

GV-13 peptidinin her iki şuş içinde oluşmuş biyofilm miktarında azalma meydana getirdiği fakat VR-10 peptidinin *P. aeruginosa* için daha anlamlı sonuç verdiği görülmüştür.

4.5. Mikroskopik Analizler

4.5.1. Gram boyama

Peptitlerin dual kültürlerle olan etkisi gram boyama yöntemi ile incelenmiştir. 12 kuyulu plaklara lamel konulup dual kültürler ekilerek, GV-13 ve VR-10 peptitlerinden $\frac{1}{2}$ MIC ve MIC konsantrasyonunda eklenmiş, 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda gram boyama adımları uygulanmıştır. Kontrol olarak peptit eklenmeyen gruplar kullanılmıştır. Şekil 4.23'te gram boyama sonuçları verilmiştir.



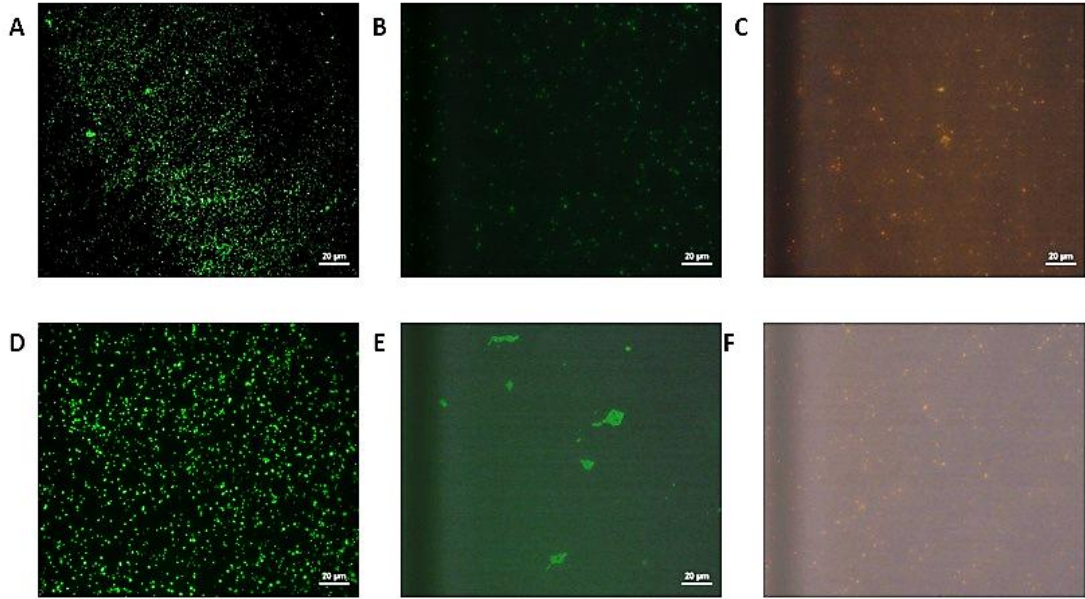
Şekil 4.23. Peptitlerin dual kültüre karşı etkinliği (Büyütme; 100X).

Gram boyama sonucunda, her iki peptidin de doza bağlı olarak bakteriyel hücre yoğunluğunu azalttığı gözlemlenmiştir. GV-13 peptidi, özellikle MIC konsantrasyonunda, hücre sayısını belirgin şekilde azaltarak daha güçlü bir

antimikrobiyal etki göstermiştir. VR-10 ise benzer etki göstermiş olsa da, aynı konsantrasyonda GV-13'e göre daha az baskılayıcı olmuştur.

4.5.2. Floresan mikroskopisi

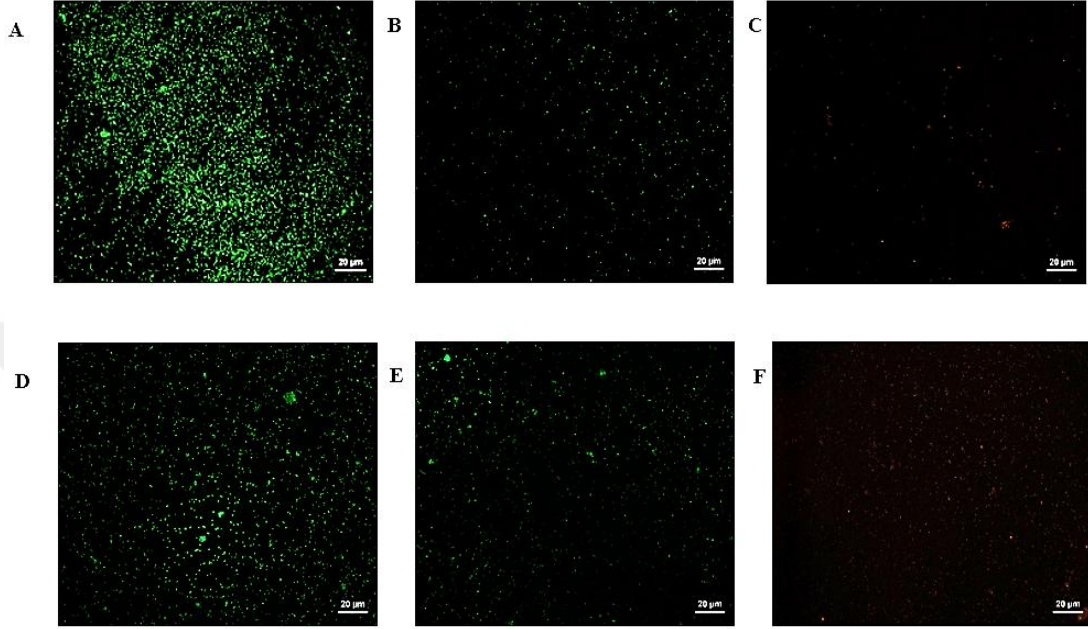
Peptitlerin bakteri membranları üzerine etkilerini incelemek amacıyla bu analiz gerçekleştirilmiştir. SYTO 9 ve PI boya konsantrasyonu 100X olarak hazırlanmıştır. Tek ve dual kültürler uygun besiyerleri 1:1 oranında ayarlanmış ve VR-10 ve GV-13 peptitleri 2 MIC konsantrasyonunda eklenerek 1 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından örnek alınarak üzerine boyadan eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopunda, 400 kat büyütme ile görüntü alınmıştır. Şekil 4.24, 4.25, 4.26'da floresans mikroskobu ile alınan görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.24. 2MIC konsantrasyonundaki GV-13'ün *P. aeruginosa*'ya (A, B, C) ve *S. aureus* (D, E, F)'ye karşı canlılık değerlendirmesi. Floresans mikroskobu ile alınan görüntüler. A ve D: kontrol grupları. B ve E: GV-13 muamelesi ile canlı kalan hücreler (yeşil renkli). C ve F: GV-13 muamelesi ile ölü olan hücreler (kırmızı renkli).

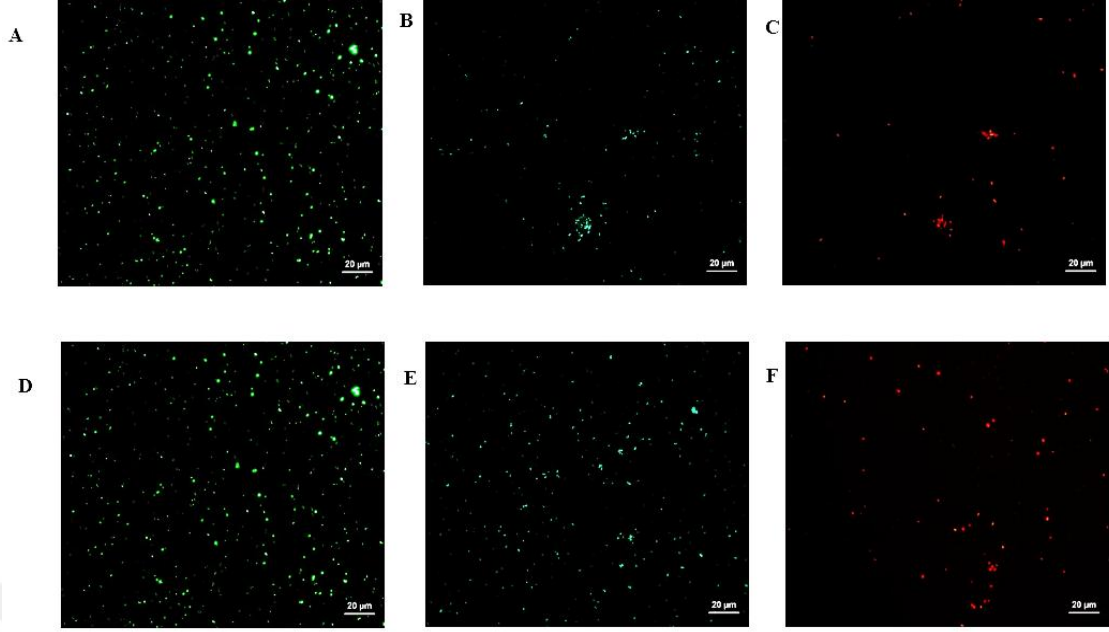
Kontrol gruplarında, bakterilerin canlılığını sürdürdüğü ve yoğun bir gelişim olduğu görülmüştür. GV-13 uygulaması sonrası kontrole kıyasla canlı hücre sayısının belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Kırmızı floresan ile işaretlenmiş ölü hücreler GV-

13 peptidinin bakteriyel membranı bozarak hücre ölümüne neden olduğunu ve hem Gram-negatif (*P. aeruginosa*) hem de Gram-pozitif (*S. aureus*) bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.25. 2MIC konsantrasyonundaki VR-10'nun *P. aeruginosa*'ya (A, B, C) ve *S. aureus* (D, E, F)'ye karşı canlılık değerlendirmesi. Floresans mikroskobu ile alınan görüntüler. A ve D: kontrol grupları. B ve E: VR-10 muamelesi ile canlı kalan hücreler (yeşil renkli). C ve F: VR-10 muamelesi ile ölü olan hücreler (kırmızı renkli).

Kontrol gruplarında, bakterilerin canlılığını sürdürdüğü ve yüksek oranda canlı hücre bulunduğu görülmüştür. VR-10 uygulaması sonrasında kontrol gruplarına kıyasla yeşil floresan sinyalinde anlamlı bir azalma söz konusu olmuştur. Kırmızı floresan ile işaretlenmiş ölü hücreler VR-10 peptidinin hem Gram-negatif (*P. aeruginosa*) hem de Gram-pozitif (*S. aureus*) bakteriler üzerinde membran bozucu ve öldürücü etkiler oluşturduğunu açıkça ortaya koymuştur.



Şekil 4.26. 2MIC konsantrasyonundaki VR-10'nun (A, B, C) ve GV-13'ün (D, E, F)'ye dual kültüre karşı canlılık değerlendirmesi. Floresans mikroskobu ile alınan görüntüler. A ve D: kontrol grupları. B: VR-10 muamelesi ile canlı kalan hücreler, E: GV-13 muamelesi ile canlı kalan hücreler (yeşil renkli). C: VR-10 muamelesi ile ölü olan hücreler ve F: GV-13 muamelesi ile ölü olan hücreler (kırmızı renkli).

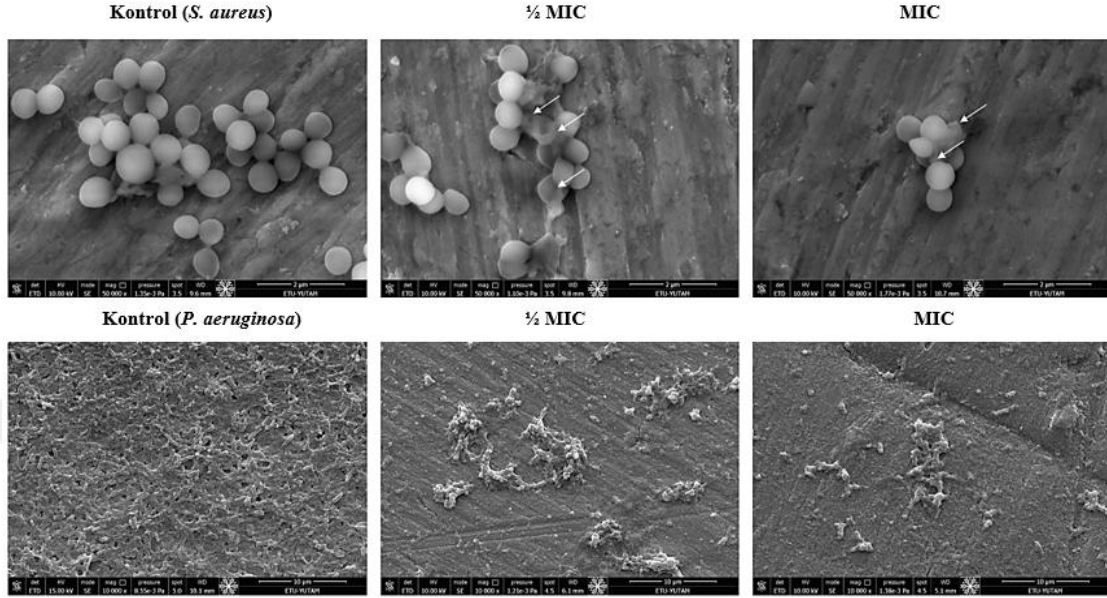
Kontrol gruplarında yoğun olarak gözlenen yeşil floresan sinyali, dual kültürlerin canlılığını koruduğunu doğrularken, peptid uygulanan örneklerde hem canlı hücre sayısında belirgin bir azalma hem de kırmızı floresan sinyallerinde artış gözlemlenmiştir. Ancak GV-13 peptidinin ölü hücre oranını artırma açısından daha belirgin bir etki gösterdiği görülmüştür. Bu durum, GV-13'ün dual kültür sistemlerinde VR-10'a göre daha güçlü bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

4.5.3. SEM analizi

Bu analizde, peptitlerin bakteri suşları üzerinde meydana getirdiği morfolojik değişimler ve bakteri tutunmasına olan etkileri incelenmiştir. 6 kuyulu plakların içindeki lamlara tek ve dual kültürler ekilerek $\frac{1}{2}$ MIC ve MIC konsantrasyonunda peptitler eklenmiş ve dual kültürler 24 saat, tek kültürler 48 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak her mikroorganizma için peptit eklenmeyen grup kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda glutaraldehit ile fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyon biyofilm morfolojisinin değişimlerini en aza indirmek için yapılmıştır. Ardından farklı alkol oranları ile ortam

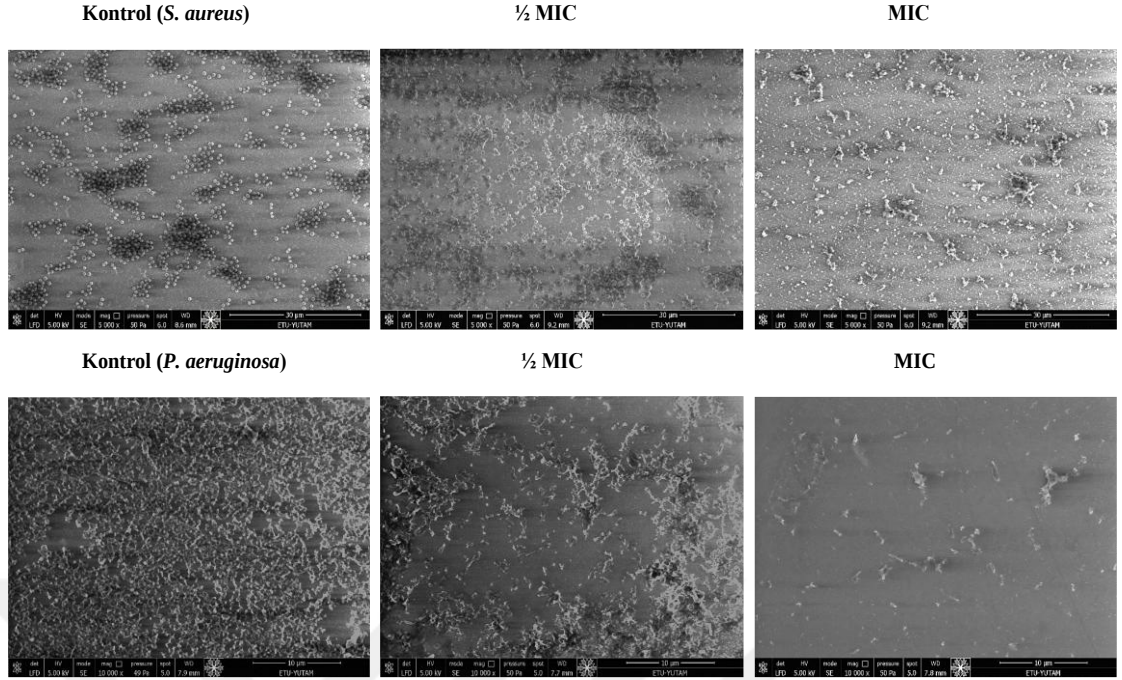
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

susuzlaştırılmıştır. SEM cihazında farklı büyütme oranlarında görüntüler incelenmiştir. Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29’da sem analiz görüntüleri verilmiştir.



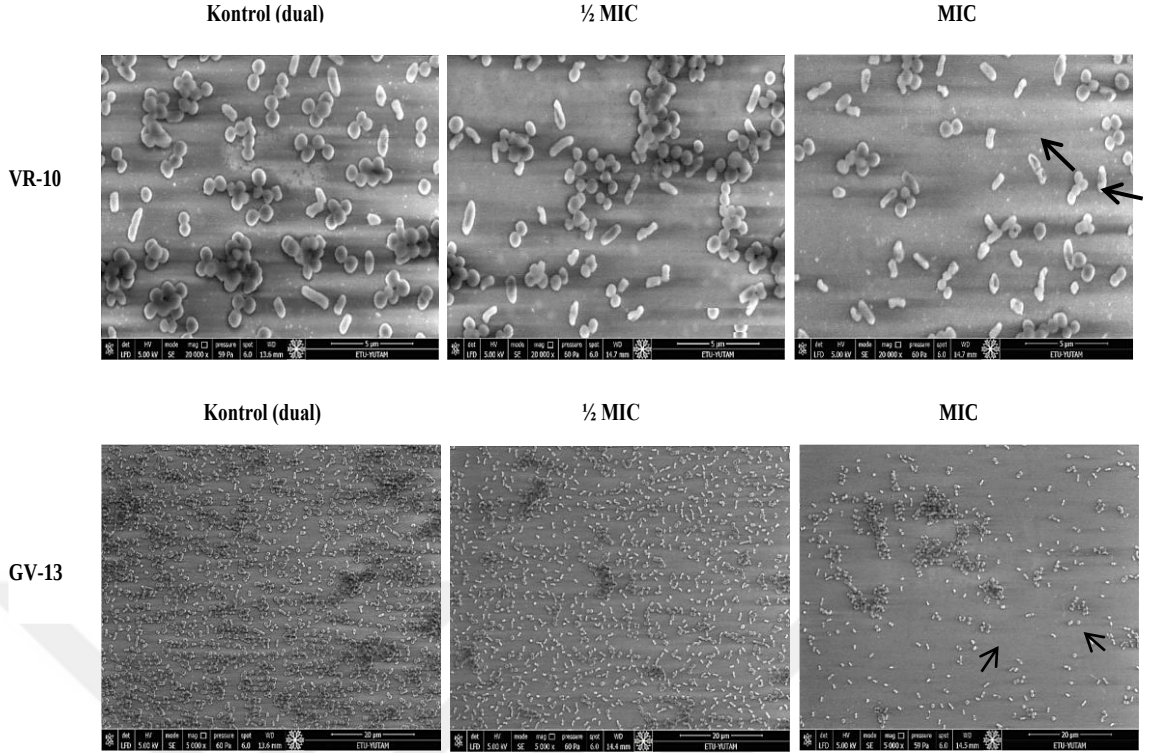
Şekil 4.27.GV-13’ün *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’ya karşı 1/2 MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri (Büyütme; MRSA 50.000X, PAO1 10.000X).

SEM görüntüleri, GV-13 peptidinin hem *S. aureus* hem de *P. aeruginosa*’ya karşı doz bağımlı olarak morfolojik bozulmalara ve biyofilm inhibisyonuna yol açtığını ortaya koymuştur. *S. aureus* üzerinde, özellikle MIC konsantrasyonunda ok ile gösterilen yerlerde hücre bütünlüğünde bozulma ve yapısal deformasyonlar dikkat çekerken, *P. aeruginosa*’da biyofilm matrisinin ciddi şekilde dağılmış olduğu ve hücresel yoğunluğun belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.28.VR-10'nun *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı 1/2 MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri (Büyütme; MRSA 5.000X, PAO1 10.000X).

Her iki bakteri türü için de kontrol gruplarında yüzeyde, biyofilm yapılarının oluştuğu ve mikroorganizma agregasyonlarının belirgin olduğu gözlemlenmiştir. VR-10 peptidinin 1/2 MIC konsantrasyonunda uygulanması sonucunda her iki bakteride de biyofilm yapısında düzensizlikler meydana gelmiş; hücre yoğunluğu azalmış ve bakterilerin yüzeydeki tutunma düzeni bozulmuştur. Özellikle MIC düzeyinde yapılan uygulamalarda ise hem *S. aureus* hem de *P. aeruginosa* için yüzeydeki bakteriyel tutunmanın neredeyse tamamen engellendiği, biyofilm oluşumunun büyük ölçüde inhibe edildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.29. Peptitlerin dual kültüre karşı ½ MIC ve MIC değerlerinde uygulanması ile alınan SEM analizi görüntüleri (Büyütme; VR-10 20.000X, GV-13 5.000X).

VR-10 peptidinin ½ MIC düzeyinde uygulanması ile bakterilerin yüzeye tutunma yoğunluğunda azalma görülmüştür. MIC konsantrasyonunda ise bakteri sayısında daha belirgin bir azalma meydana gelmiş, hücrelerin dağınık halde ve düşük yoğunlukta yüzeye tutunduğu tespit edilmiştir.

GV-13 peptidi ile yapılan uygulamalarda ise kontrol grubuna kıyasla ½ MIC düzeyinde biyofilm oluşumunun azaldığı, bakterilerin yüzey üzerindeki dağılımının bozulduğu ve agregasyon miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. MIC düzeyinde ise bakteri sayısında belirgin azalma ile birlikte, özellikle agregatların daha az ve dağınık hale geldiği görülmüştür.

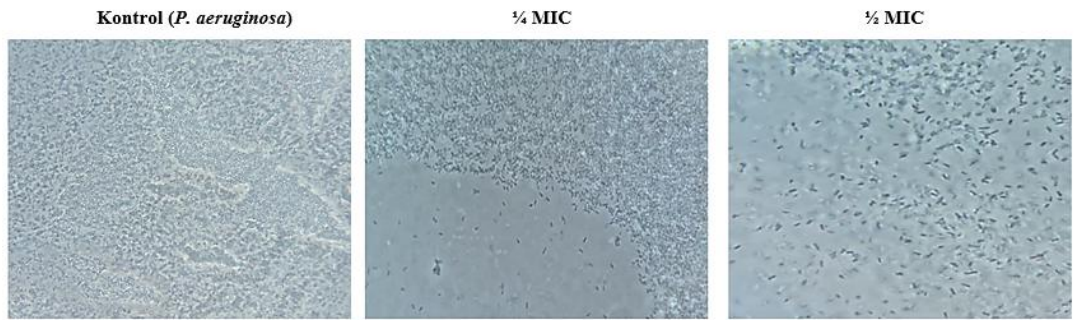
Sonuç olarak, hem VR-10 hem de GV-13 peptidleri tek ve dual kültürlerde biyofilm oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak azaltma yeteneğine sahip olup, özellikle MIC düzeylerinde biyofilm oluşumunun önemli ölçüde baskılandığı SEM görüntüleri ile desteklenmiştir.

4.6. Bakteri Hareketliliğinin İncelenmesi

4.6.1. Seğirme hareketinin incelenmesi (twitching motility)

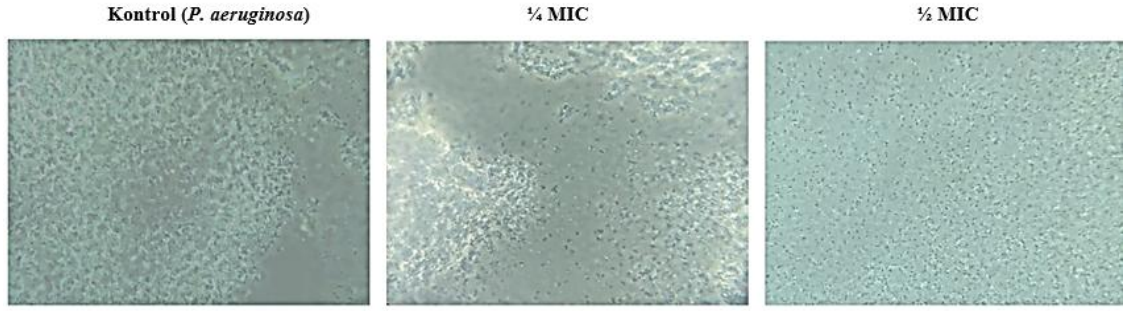
Twitching hareketliliği, yüzeylere tutunup ardından geri çekilebilen özel bir Tip IV pilus türüne bağlıdır. *P. aeruginosa*'da bu seğirme hareketi Tip IV pili'ler aracılığıyla sağlanır ve bu yapıların biyofilm oluşumunda önemli bir yeri vardır. Tip IV pili'ler, ökaryotik hücre yüzeylerine yapışma, kolonizasyon ve biyofilm gelişimi açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle patojenitenin önemli bir bileşeni olarak değerlendirilmektedir (Mah et al. 2003; Gomez et al. 2023).

Seğirme hareketliliği tip IV pili aracılığı ile gerçekleştirildiği için, bu hareketlilik tipi *P. aeruginosa*'da gözlenmiştir. İlk olarak %0,15 agar şeklinde hazırlanan besiyeri steril edilmiş lamalar üzerine alınmış ve ardından steril iğne ucu ile tek koloni olacak şekilde *P. aeruginosa* ekimleri gerçekleştirilmiştir. 3 saat inkübasyonun ardından örnekler, faz kontrast mikroskobu ile 1000 kat büyütme ile incelenmiştir. Şekil 4.30,4.31'de peptitlerin seğirme hareketliliği görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.30.GV-13'ün *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliği (Büyütme;100X).

Kontrol gruplarında bakterilerin yüzeye yayılımı ve hareket durumları çok net görülmüştür. GV-13 uygulanan örneklerde, kontrol grubuna kıyasla ¼ MIC ve ½ MIC konsantrasyonlarında bakteri koloni yayılımının belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. Özellikle ½ MIC seviyesinde, agregasyon seviyesi düşmüştür.



Şekil 4.31.VR-10'nun *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliği (Büyütme;100X).

Benzer şekilde, VR-10 peptidi uygulanan örneklerde de seğirme hareketinde konsantrasyona bağlı bir azalma gözlemlenmiştir. $\frac{1}{4}$ MIC konsantrasyonunda hareketliliğin kısmen engellendiği, $\frac{1}{2}$ MIC seviyesinde ise hareketin büyük ölçüde baskılandığı ve hareketliliğin bir yöne doğru değil de daha homojen olduğu görülmüştür.

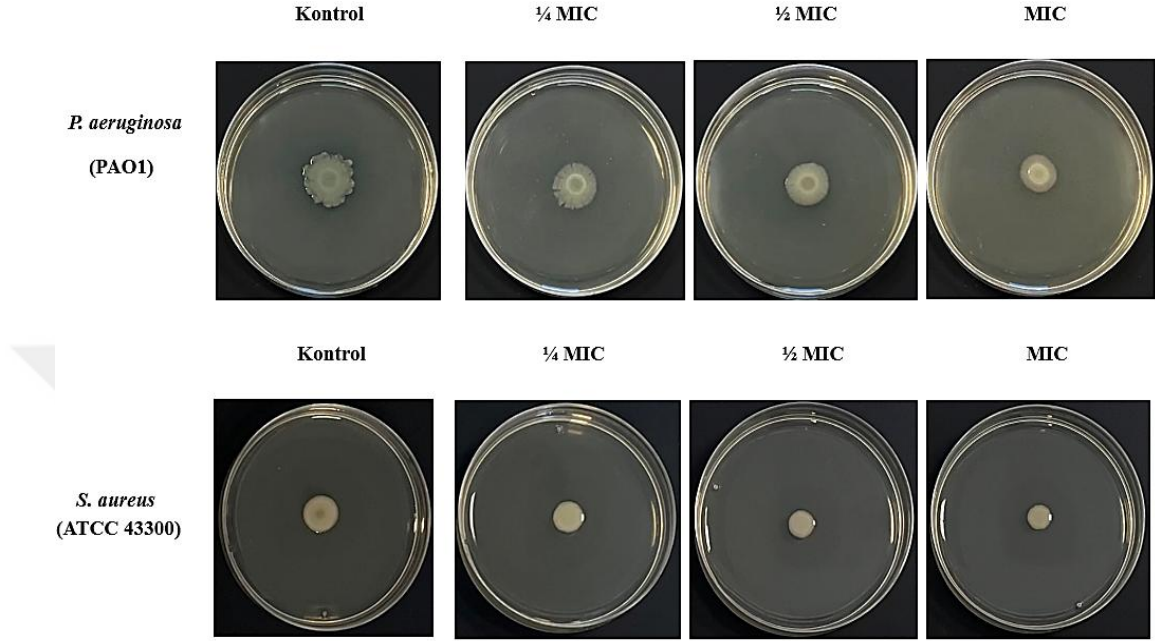
Dean ve arkadaşları 2011 yılında yapılan bir çalışmada, insan kaynaklı antimikrobiyal peptit LL-37 ve onun D-enantiomeri D-LL-37'nin *P. aeruginosa*'nın seğirme hareketi ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Her iki peptit de seğirme hareketini artırarak bakterilerin yüzeyde hareketini etkilemiş ve bu sayede biyofilm oluşumunu yaklaşık %50 oranında azaltmıştır. Bu tez çalışmasında ise peptitlerimizin bakterinin seğirme hareketini azaltarak kolonizasyonu ve biyofilm oluşumunu etkilemiştir (Dean et al. 2011).

4.6.2. Kaynaşma hareketinin incelenmesi (swarming motility)

Mikroorganizmalar, flagellaları sayesinde yarı katı yüzeylerde toplu halde hareket edebilirler. Bu hareket biçimi, bir tür sürü davranışı olarak kabul edilir ve insan patojenlerinde artan virülans faktörleri ile antibiyotik direnciyle ilişkilendirilmektedir. Özellikle *P. aeruginosa*, %0,5 agar içeren yarı katı ortamlarda kaynaşma (swarming) hareketi sergiler. Bu hareketlilik, bakterinin flagella yapısının işlevselliğine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Rütschlin and Böttcher 2020).

Tek ve dual kültürler 24 saat boyunca geliştirilmiştir. Ardından 0,5 McFarland'a ayarlanmış bu hücrelerden 5 μ L alınarak $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC ve MIC VR-10 ve GV-13

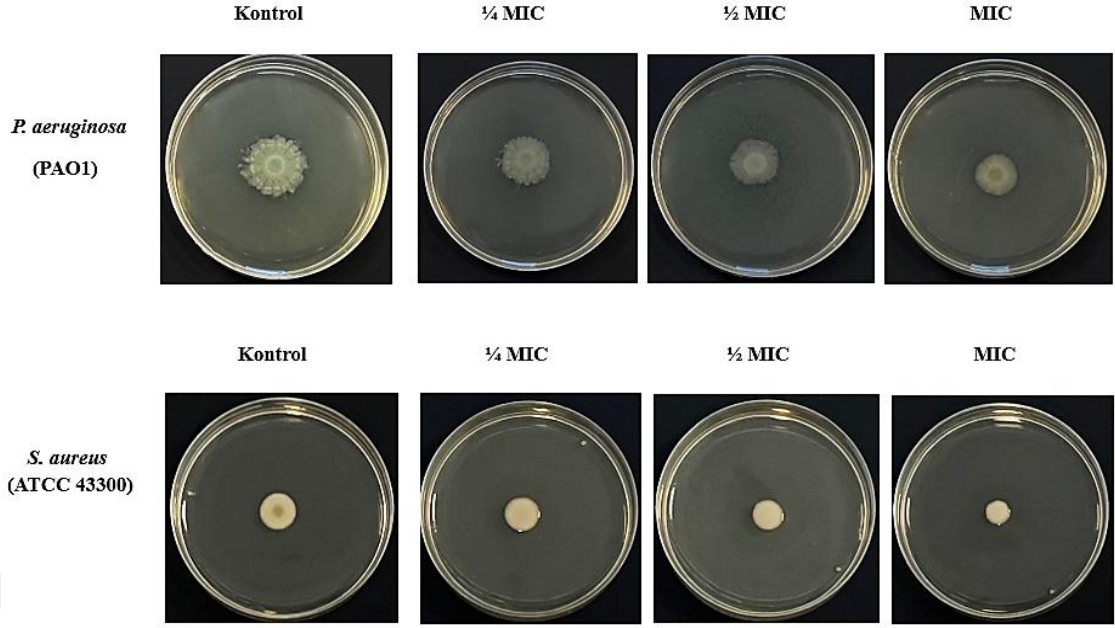
peptitleri içeren MHA (%0,5 agar) besiyerine damlatılmıştır. 24 saat sonra hareketlilikleri incelenmiştir. Bakterilerin koloni morfolojileri ve hareketliliğine petri görüntüleri Şekil 4.32, 4.33, 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.32.GV-13'ün *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliği.

P. aeruginosa için kontrol grubunda yaygın ve belirgin bir kaynaşma hareketi gözlemlenmiş olup, bu durum bakterinin yüzey üzerinde hızlı ve organize bir şekilde hareket ettiğini göstermiştir. GV-13 peptidinin 1/4 MIC konsantrasyonunda dahi hareketlilik ve büyümesinde azalma meydana gelmiş, 1/2 MIC ve özellikle MIC seviyesinde ise bu hareket daha da azalmıştır. MIC seviyesinde kaynaşma hareketinin neredeyse tamamen inhibe edildiği görülmektedir. Bu durum, GV-13'ün *P. aeruginosa*'nın motilitesini önemli derecede baskılayabildiğini göstermektedir.

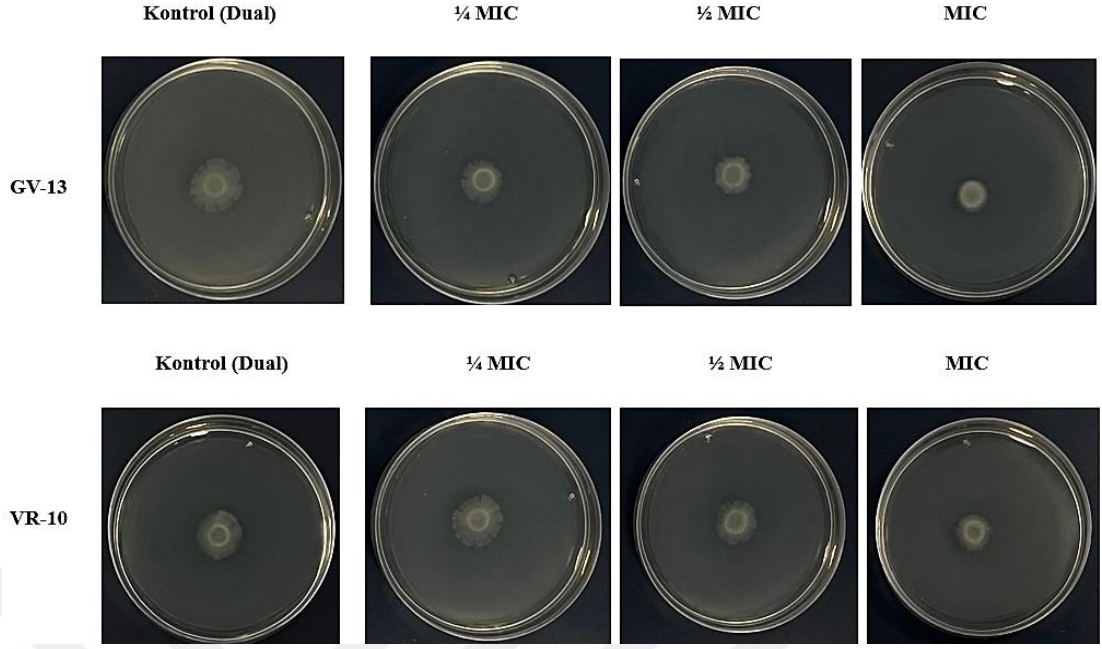
S. aureus'ta bir hareketliliğin olmadığı ve kontrol grubunda yüzey yayılımının belirgin olduğu görülmüştür. GV-13 uygulamasına bağlı olarak bu yayılımın da konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.33.VR-10'nun *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliği.

P. aeruginosa, kontrol grubunda belirgin bir yayılma ve kaynaşma hareketi gözlemlenmektedir. Ancak, VR-10 peptidinin uygulandığı özellikle MIC konsantrasyonunda, kaynaşma hareketliliğinde belirgin bir azalma ve neredeyse tamamen inhibisyon söz konusudur. $\frac{1}{4}$ MIC ve $\frac{1}{2}$ MIC konsantrasyonlarında da kontrole kıyasla kaynaşma hareketinde bir düşüş görülmüştür.

S. aureus için, kontrol grubunda bu bakteri türün de yayılma görülmektedir, ancak *P. aeruginosa*'ya kıyasla daha sınırlı bir yayılma göstermiştir. VR-10 peptidi uygulandığında artan konsantrasyonlarla yayılımının azaldığı izlenmiştir. MIC konsantrasyonunda, büyüme baskılanmıştır.



Şekil 4.34. Peptitlerin dual kültür üzerindeki etkinliği.

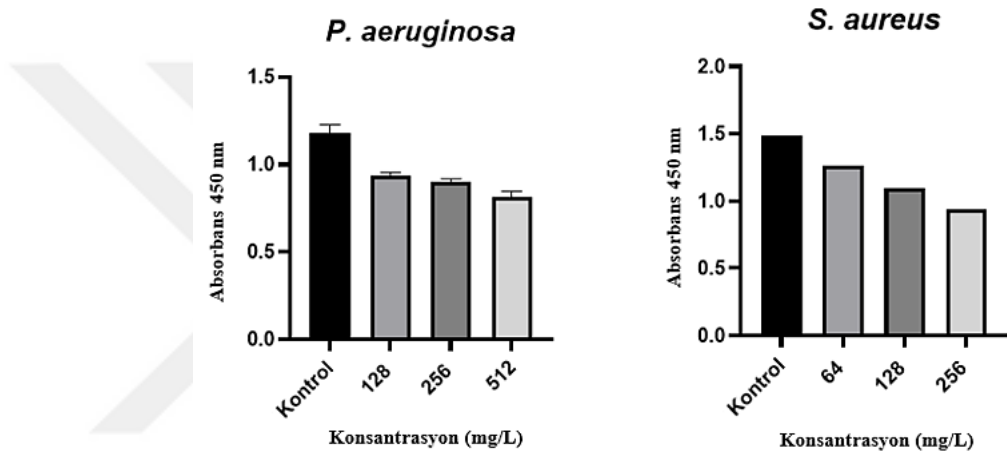
GV-13, kontrol grubunda her iki bakteri türünün de etkileşimiyle oluşan bir kaynaşma hareketi gözlemlenmiştir. GV-13 peptidinin uygulandığında özellikle MIC konsantrasyonuna doğru gidildikçe, bu kaynaşma hareketliliğinde belirgin bir azalma ve inhibisyon görülmüştür. MIC konsantrasyonunda, kaynaşma neredeyse tamamen durmuştur.

VR-10, kontrol grubunda gözlemlenen kaynaşma hareketi, GV-13 kontrolündekiyle benzerdir. VR-10 peptidi uygulandığında, artan konsantrasyonlarla birlikte kaynaşma hareketliliğinde belirgin bir düşüş izlenmektedir. MIC konsantrasyonunda, kaynaşma aktivitesi önemli ölçüde inhibe olmuştur.

de la Fuente-Núñez ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada sentetik katyonik peptit 1037'nin, *P. aeruginosa*'nın kaynaşma hareketini konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği göstermiştir. Bu inhibisyon, bakterilerin yüzeylere yayılma yeteneklerini sınırlamıştır. Bu tez çalışmasında benzer şekilde dizayn ettiğimiz peptitlerimizin *P. aeruginosa*'nın kaynaşma hareketini peptit konsantrasyonuna bağlı şekilde inhibe ettiği görülmüştür (de la Fuente-Núñez et al. 2012).

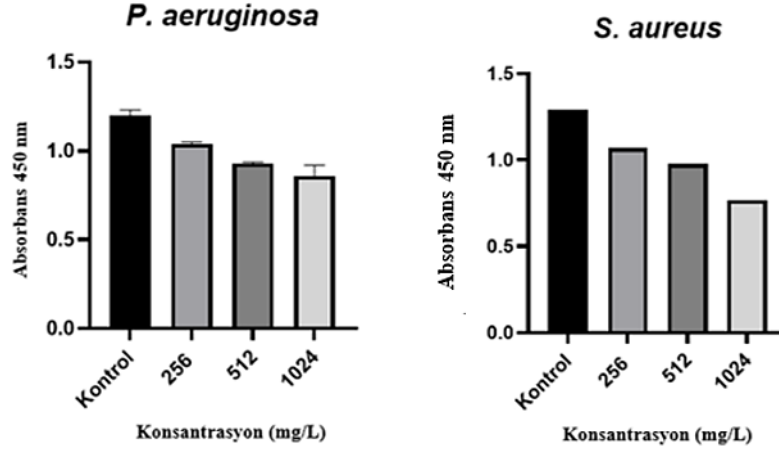
4.7. CVDK-8 Testi

Bakterilerdeki hücre canlılığını ölçmek için Ecotech CVDK-8 kiti kullanılmıştır. Tek ve dual kültürler 96 kuyulu plaklara konulmuş, Ardından MIC, 2 MIC, 4 MIC konsantrasyonlarında peptitler eklenmiştir. 1 saat inkübe edilmiş, süre sonunda üzerine 5 µL Ecotech CVDK-8 solüsyonu eklenerek 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.35, 4.36, 4.37’de peptitlerin hücre canlılığına olan etkilerini gösteren grafikler verilmiştir.



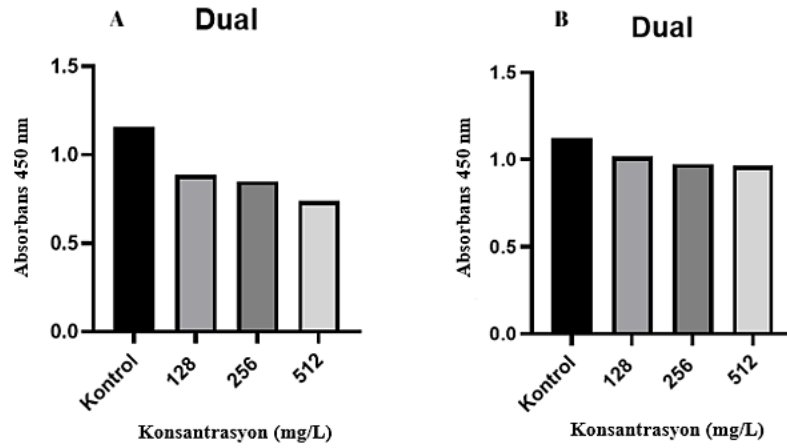
Şekil 4.35.GV-13 uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları.

P. aeruginosa için kontrol grubunda yüksek absorbans değeri gözlemlenmektedir, bu da yüksek hücre canlılığını göstermektedir. GV-13 peptidinin uygulandığı gruplarda ise, konsantrasyon arttıkça absorbans değerlerinde kademeli bir düşüş meydana gelmiştir. Benzer şekilde, *S. aureus* için de kontrol grubunda yüksek absorbans değeri ölçülmüştür. GV-13 uygulanan gruplarda, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında azalma eğilimi görülmektedir.



Şekil 4.36.VR-10 uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları.

P. aeruginosa için kontrol grubunda yüksek absorbans değeri gözlemlenmektedir, bu da yüksek hücre canlılığını göstermektedir. VR-10 peptidinin uygulandığı gruplarda ise, konsantrasyon arttıkça absorbans değerlerinde kademeli bir düşüş meydana gelmiştir. Benzer şekilde, *S. aureus* için de kontrol grubunda yüksek absorbans değeri ölçülmüştür. VR-10 uygulanan gruplarda, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında belirgin bir azalma eğilimi görülmüştür.



Şekil 4.37.Peptitlerin uygulanması ile hücre canlılık testi sonuçları (A: GV-13, B:VR-10).

Hücre canlılığı testi sonuçları, hem GV-13 hem de VR-10 peptitlerinin dual kültürdeki bakteri topluluğunun hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Her iki peptit için de konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında bir azalma eğilimi

gözlemlenmiştir. GV-13 peptidinin, test edilen konsantrasyon aralığında dual kültürün hücre canlılığı üzerinde VR-10'a göre daha belirgin bir düşüşe neden olduğu görülmüştür.

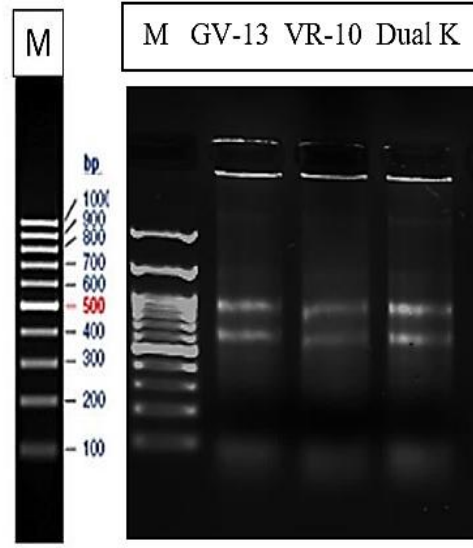
Farrag ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada antimikrobiyal peptitlerin *E. coli*'ye karşı WST-8 kullanılarak test edildiği ve peptitlerin, membran bozulması ve metabolik baskı yoluyla bakteriyel hücre canlılığını azalttığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler bu bulgularla uyumlu olup, test edilen peptitlerin bakterilere karşı yüksek biyolojik etki potansiyeli taşıdığını göstermektedir (Farrag et al. 2020).

4.8. Gen Ekspresyon Analizleri

4.8.1. RNA izolasyonu

Tek ve dual kültürlerden Trizol reaktifi kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve dual kültürler ½ MIC değerinde peptitler uygulanmış ve konsantrasyonları mikropilaya okuyucusunda spektrofotometrede ölçülmüştür. RNA konsantrasyonları *P. aeruginosa* GV-13 için; kontrol 887,92 ng/µL, uygulama grubu 789,2 ng/µL, *S. aureus* kontrol 668,64 ng/µL, uygulama grubu 825,92 ng/µL şeklinde ölçülmüştür.

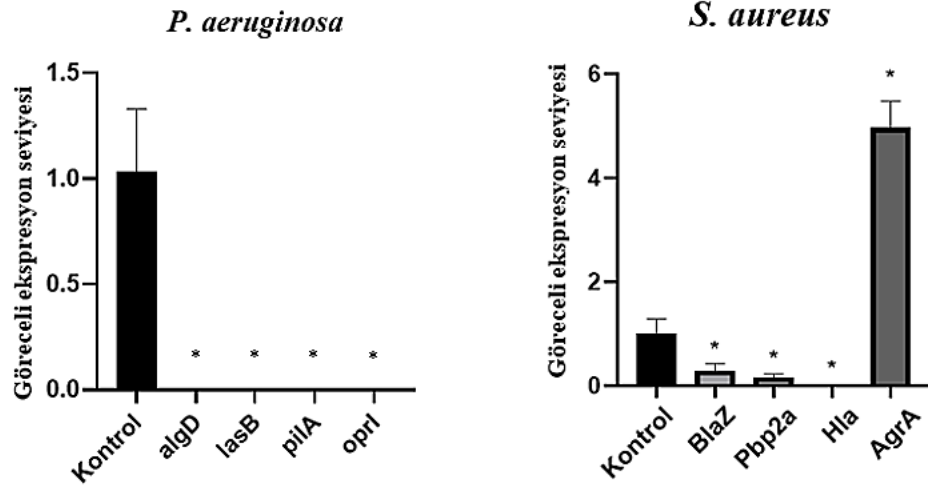
VR-10 için; *S. aureus* kontrol 152,6 ng/µL, uygulama grubu 153,4 ng/µL, *P. aeruginosa* kontrol 931,8 ng/µL, uygulama grubu 857,16 ng/µL olarak ölçülmüş, dual kültürlerde; kontrol 108,16 ng/µL, GV-13 uygulanmış 81,84 ng/µL, VR-10 uygulanmış 60,56 ng/µL şeklinde ölçülmüştür. RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmiştir. Şekil 4.38'da dual kültürlerin agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Ardından RNA örnekleri tek kültürler için 1 µg'a dual kültürler için 500 ng cDNA'ya çevrilerek eşitleme yapılmıştır.



Şekil 4.38. Dual RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü (M: Marker).

4.8.2. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında dilüe edilerek, qRT-PCR reaksiyonu kurulmuştur. Tek kültürlerde *P. aeruginosa* için, *algD*, *lasB*, *pilA* ve *oprI* genleri, *S. aureus* için, *blaZ*, *pbp2a*, *hla*, *agrA* virülans genlerinin, dual kültürde ise, *icaA*, *pbp2a*, *agrA*, *algD*, *pilA* ve *lasB* genlerinin ekspresyon seviyeleri housekeeping genler ile normalize edilerek incelenmiştir. Housekeeping gen olarak *gyrB* ve *rpoD* genleri kullanılmıştır. Peptitlerin dual ve tek kültürlerde seçilen virülans genleri üzerindeki göreceli ifadeleri şekil 4.39, 4.40, 4.41'de verilmiştir. Sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile analiz edilmiş, sonuçların anlamlı olup olmadığı one-way ANOVA analizi ile GraphPad (Prism 8.2) programında değerlendirilmiştir.

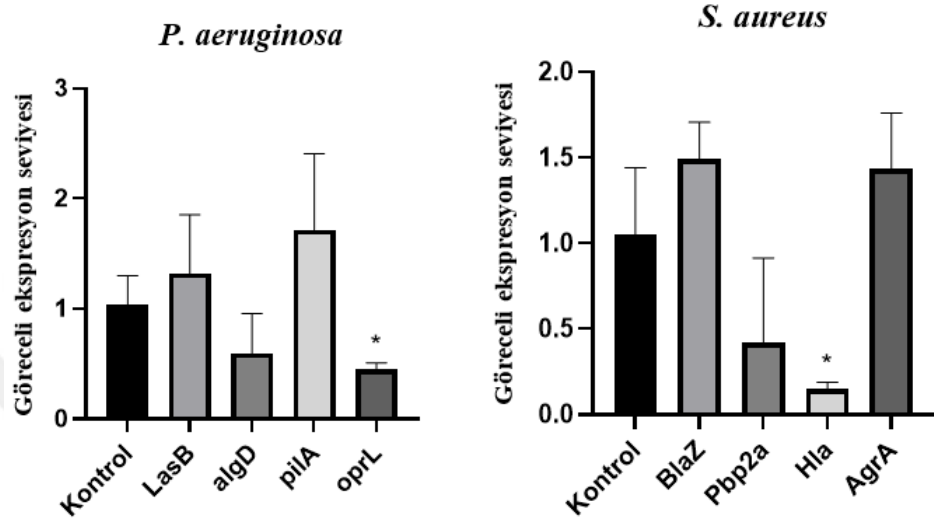


Şekil 4.39. GV-13'ün *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'da seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi.

GV-13 peptidi uygulanan grupta *algD*, *lasB*, *pilA* ve *oprL* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Özellikle *algD* geninin ekspresyonundaki belirgin düşüş, GV-13 peptidinin, *P. aeruginosa*'nın alginat üretimi ve biyofilm oluşum kapasitesi üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürmüştür (Jassim et al. 2025). Benzer şekilde, *lasB* geninin (proteolitik enzim olan elastaz üretimi ile ilişkili) ve *pilA* geninin (pilus oluşumu ve yüzey tutunmasıyla ilişkili) ekspresyonlarındaki düşüş, peptidin bakterinin invazyon ve adezyon gibi virülans mekanizmalarını da zayıflattığını göstermektedir (Rust et al. 1996; Liu et al. 2014). Ayrıca, dış membran stabilitesinde rol oynayan *oprL* geninde de ciddi bir ekspresyon azalması olması, GV-13 peptidinin hücresel bütünlüğü etkileyebileceği ihtimalini desteklemiştir (Chand et al. 2021). Sonuç olarak, GV-13 peptidinin, *P. aeruginosa*'nın önemli virülans genlerinin ekspresyonunu baskılayarak patojenik potansiyelini azalttığı görülmüştür.

GV-13 uygulaması ile antibiyotik direnç genleri olan *blaZ* ve *pbp2a* ile virülans faktörü kodlayan *hla* (hemolizin alfa) genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı düzeyde azalma gözlemlenmiştir. *blaZ* ve *pbp2a* beta-laktam grubu (metisilin oksasilin) antibiyotiklere karşı direnç oluşumunu sağlayan ve antibiyotik direnci ile ilişkili bir genlerdir (Fishovitz et al. 2014; Kilani et al. 2024). *hla*, Alfa-hemolizin toksini, *S. aureus*'ta en çok vurgulanan ve karakterize edilen virülans faktörüdür (Xiao et al. 2016). GV-13 peptidinin hem antibiyotik direncini hem de patojeniteyi baskılayıcı potansiyelle

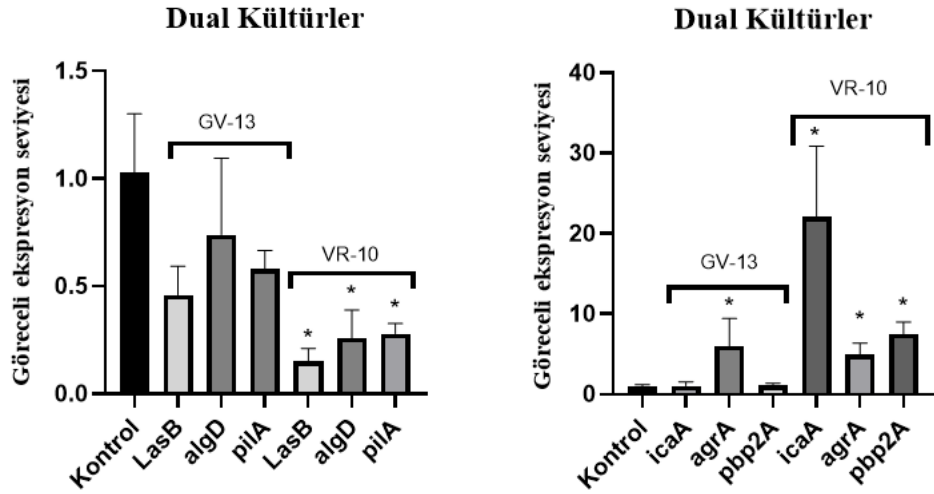
sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, virülans düzenleyici bir gen ve QS mekanizması ile ilişkili olan *agrA* 'nın ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış saptanmıştır (Koenig et al. 2004). *agrA*'daki bu artış, peptidin bakteriyel düzenleyici sistemler üzerinde etkisinin olabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.40. VR-10'nu *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'da seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi.

P. aeruginosa'da *pilA*, *algD* ve *lasB* genlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir, bu genlerin ekspresyon seviyeleri anlamlı değildir. *oprL* geni ise VR-10 peptidi uygulaması sonrası anlamlı şekilde baskılanmıştır. Bu sonuç, VR-10 peptidinin, *P. aeruginosa*'nın hücre duvarı stabilitesi ve porin yapısında önemli rol oynayan *oprL* proteinini kodlayan geni inhibe ettiğini düşündürmüştür (Chand et al. 2021).

S. aureus için, *blaZ*, *pbp2a* ve *agrA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. *hla* geni ise VR-10 peptidi uygulaması sonrasında anlamlı derecede baskılanmıştır. Bu durum, VR-10 peptidinin *S. aureus*'un önemli bir virülans faktörü olan hemolizin A üretimini inhibe ederek patojenitesini azaltabileceğini düşündürmüştür (Xiao et al. 2016).



Şekil 4.41. Peptitlerin dual kültür için seçilen virülans genlerinin göreceli ifadesi üzerine etkisi.

Dual kültür ortamında GV-13 peptidi uygulaması sonrasında *P. aeruginosa* 'nın virülans gen ekspresyon profilinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. VR-10 peptidi uygulaması sonrası ise *lasB*, *algD* ve *pilA* genlerinde anlamlı düzeyde ekspresyon düşüşü gözlenmiştir. *lasB* geni, elastaz üretiminden sorumludur ve doku tahribine neden olur. VR-10 uygulaması sonrası bu genin baskılanması, bakterinin doku invazyon kapasitesinin azaldığını düşündürmüştür (Liu et al. 2014). *algD* geni, biyofilm oluşumunun anahtar düzenleyicilerindendir. VR-10'un *algD* ekspresyonunu anlamlı şekilde düşürmesi, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma yeteneğinin zayıflatıldığını işaret etmektedir (Jassim et al. 2025). *pilA* geni, tip IV pilus oluşumunda görev alır ve yüzey tutunması ile ilişkilidir. Bu genin baskılanması, bakterinin adezyon ve hareketlilik kapasitesinin azalabileceğini göstermektedir (Rust et al. 1996).

GV-13 peptidi uygulaması sonrası, *icaA* ve *pbp2a* genlerinde anlamlı ekspresyon düşüşü gözlenmemiştir. *agrA* geni, quorum sensing sisteminde önemli bir rol oynar ve virülans genlerinin koordinasyonunda etkilidir, *agrA*'daki bu artış, peptidin bakteriyel düzenleyici sistemler üzerinde etkisinin olabileceğini düşündürmüştür (Koenig et al. 2004).

VR-10 peptidi uygulaması sonrası, özellikle *icaA* geninde ciddi bir ekspresyon artışı gözlemlenmiştir. *icaA* geni, biyofilm oluşumundan sorumludur ve bu biyofilm kapasitesinin arttığına işaret etmektedir (Yuksekdag and Baltacı 2015). Bu durum, VR-

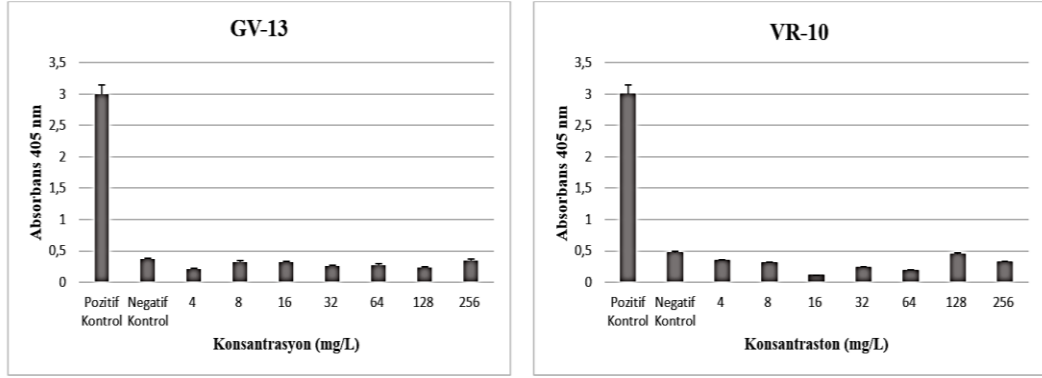
10 peptidinin dual kültür ortamında beklenmedik bir şekilde *S. aureus* biyofilm potansiyelini artırabileceğini düşündürmektedir. *agrA* ve *pbp2a* genlerinde VR-10 uygulamasıyla da anlamlı ekspresyon artışı devam etmiştir. *agrA*'nın ekspresyonun artması quorum sensing mekanizmasının etkilendiğine işaret etmiştir (Koenig et al. 2004). *pbp2a* ekspresyonundaki artış, antibiyotik direncinin arttığını göstermiştir.

Dual kültür ortamı, bakteriler arasında farklı bir gen ekspresyon profiline yol açmaktadır. VR-10 peptidi, *P. aeruginosa*'da güçlü bir virulans baskılayıcı etki gösterirken, *S. aureus*'da quorum sensing ve direnç genlerini de biyofilm geni olan *icaA*'yı artırmıştır. GV-13 peptidi ise her iki bakteri için de baskılayıcı etki göstermemiştir. Daha çok tek kültürlerde anlamlı iken dual kültür de *agrA* geninde bir anlamlılık görülmüştür ve ekspresyon seviyesi artmıştır. Bu durum da peptidin bakteriyel düzenleyici sistemler üzerinde etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Tek kültürde VR-10, özellikle *oprL* üzerinde etkiliyken; dual kültürde *lasB*, *algD*, *pilA* genlerinde baskılanma gözlenmiştir. Bu durum, dual kültürde *S. aureus* varlığının *P. aeruginosa*'nın özellikle *lasB* ve *pilA* gibi doku invazyonu ve hareketlilikle ilişkili genlerini daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Yani *S. aureus* varlığı, *P. aeruginosa*'nın virulans genlerini düzenleme şeklini değiştirmiş ve bazı genlerin VR-10'a olan hassasiyetini artırmıştır. Tek kültürde VR-10'un etkisi daha çok hemolizin üretimi (*hla*) üzerinde etkilidir. Ancak, dual kültürde *icaA* geninde belirgin bir artış gözlenmiştir (biyofilm geninde). Bu durum, *P. aeruginosa* varlığının *S. aureus*'u biyofilm oluşturmaya teşvik ettiğini göstermektedir. Yani bakteriler arasında bir savunma stratejisi değişimi olmuş: *S. aureus*, rekabet ortamında hayatta kalmak için biyofilm oluşturmaya yönelmiş, biyofilm üretimini kontrol eden *icaA* geninin ekspresyonunu artırarak *S. aureus*'un biyofilm moduna geçmesine neden olmuştur. *P. aeruginosa*, *S. aureus*'un quorum sensing ve antibiyotik direnç sistemlerinin ekspresyonunu da artırmış ve ayrıyeten *S. aureus* hayatta kalabilmek için biyofilm oluşumunu artırmıştır.

4.9. Hemolitik ve Sitotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi

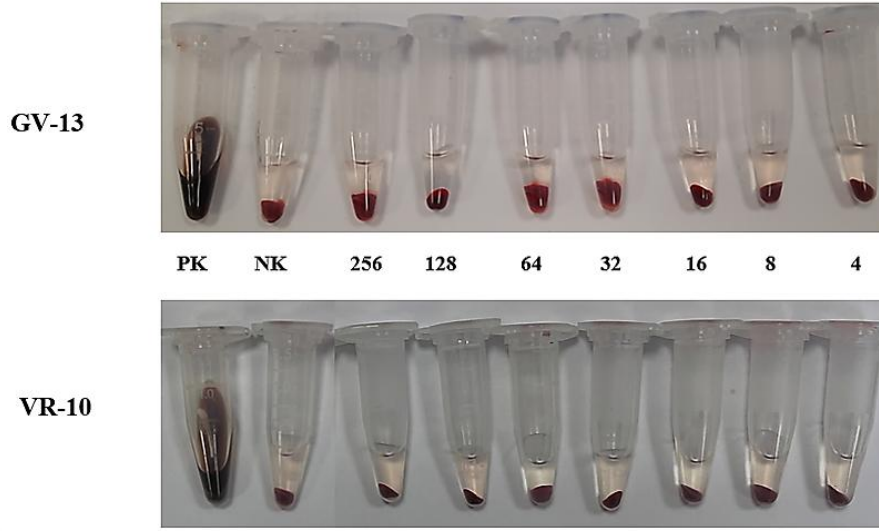
4.9.1. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi

Peptitlerin potansiyel hemolitik aktivitelerini değerlendirmek amacıyla, kırmızı kan hücreleri üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde analiz edilmiş ve hemoliz oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir. Ticari olarak satın alınan kan örneğine 4-256 µg/mL oranlarında peptitler eklenmiştir. Ardından 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan görüntü şekil 4.43'te verilmiştir. Üst sıvıların absorbans değerleri ölçülmüş şekil 4.42'de hemolitik aktivite sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.42. Peptitlerin hemolitik aktivite sonuçları.

Hemolitik aktivite sonuçları, GV-13 ve VR-10 peptitlerinin test edilen konsantrasyon aralığında kırmızı kan hücreleri üzerinde düşük hemolitik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Negatif kontrole yakın absorbans değerleri, bu peptitlerin kan hücrelerinin bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğunu ve anlamlı düzeyde hemolize neden olmadığını desteklemiştir. Pozitif kontrolün yüksek absorbans değeri ise testin hemolizi tespit etme yeteneğini doğrulamıştır.

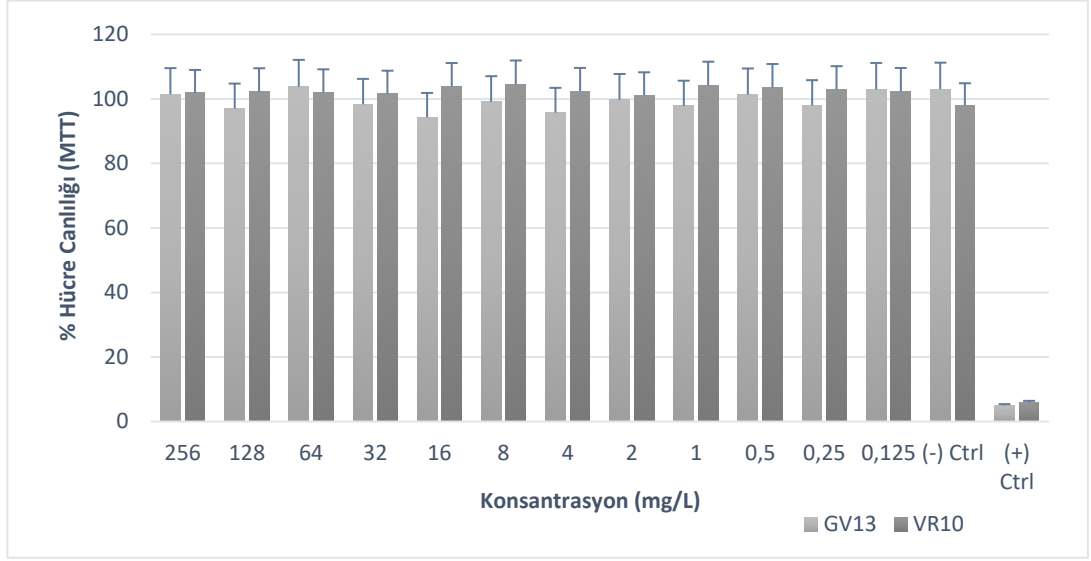


Şekil 4.43.Peptitlerin hemolitik aktivitesinin belirlenmesi (PK: Tween 20, NK: PBS).

Ramada ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, bitkilerden elde edilen IAP'lerin 64 μ M konsantrasyonunda kanda %50 oranına hemoliz oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (Ramada et al. 2017). Bu tez çalışmasında dizayn edilen peptitlerin hemoliz oluşturmadığı yapılan deneyler sonucu belirlenmiştir.

4.9.2. MTT testi

ABP moleküllerinin HDFa hücre hattına olan toksik etkileri incelenmiştir. Peptitlerin hücre sağlığını veya canlılığını potansiyel olarak tehlikeye atabilecek herhangi bir sitotoksik özellik barındırıp barındırmadığı belirlenmiştir. MTT testi, MTT'nin mitokondriyal enzimler tarafından formazana indirgenmesine dayanır ve böylece hücre canlılığı ölçülür (Jain et al. 2018). Hücrelere artan konsantrasyonlarda (0,25-256 μ g/mL) peptitler uygulanmış, 48 saat sonra MTT solüsyonu eklenmiştir. 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her kuyuya 100 μ L DMSO eklenerek 570 nm'de ölçüm alınmıştır. Şekil 4.44'te MTT ölçümleri verilmiştir.



Şekil 4.44.Hücre canlılığına peptitlerin etkisi.

GV-13 ve VR-10 peptitlerinin geniş bir konsantrasyon aralığında insan hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Her iki peptit de en yüksek test edilen konsantrasyonlarda bile hücre canlılığını büyük ölçüde korumuş ve negatif kontrol grubuyla benzer sonuçlar vermiştir.

α -heliks yapıya sahip antimikrobiyal peptitler, bakteriyel membranlarla güçlü etkileşimleri sayesinde etkili antibakteriyel ajanlar olarak öne çıkmaktadır. Zhang ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada bu yapısal özelliğin aynı zamanda memeli hücre membranlarıyla da etkileşime girerek toksik etkilere yol açabileceği ve mellitin benzeri peptitin yüksek α -helikal ve amfipatik yapısı sayesinde güçlü bakterisidal aktivite gösterdiği, aynı zamanda insan eritrositleri üzerinde hemolitik etki ve diğer memeli hücrelerinde sitotoksikite sergilediğini vurgulamışlardır. Verilerimiz doğrultusunda α -heliks yapısı içeren peptitlerimizin hemolitik aktivite ve memeli hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı bulunmuştur (Zhang et al. 2016).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yeni antibiyotiklerin keşfi, kritik patojenlerle mücadelede literatürde de vurgulanan önemli bir çalışma alanıdır. Bilgisayar kaynaklı olarak yeni peptitlerin tasarımı, etkinliklerinin biyoinformatik araçlarla tespit edilmesi, ardından in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi önem arz etmektedir. Antibiyotik dirençliliğinin dünya genelinde büyük bir problem olduğu da göz önüne alındığında, yeni ilaç adayı moleküllerin ortaya koyulması ve klinik denemelere girmesi oldukça önemlidir. Bunlardan biri de antimikrobiyal peptitlerdir. Antimikrobiyal peptitler planktonik mikroorganizmaları öldürmeye karşı geliştirilmişlerdir. Fakat enfeksiyonel hastalıkların çoğunun tedavi edilememesindeki sebep polimikrobiyal biyofilm yapılarıdır. Son yıllarda bakteriyel biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmek için yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir. Bunlardan biri de antibiyofilm peptitlerdir.

Bu doğrultuda, Hs02 peptidine dayalı olarak yeni dizayn edilen VR-10 ve GV-13 peptitleri uygun parametreler ile sentezlenmiştir. Antibiyofilm etkinliğini, stabilizeyi ve biyolojik aktiviteyi artırmak amacıyla modifikasyonlar uygulanmış, ardından peptitler saflaştırılarak, karakterizasyonları yapılmıştır.

Peptitlerin yapısal özellikleri FTIR ve CD spektroskopisi ile karakterize edilmiş, her iki peptitin de α -helikal yapı içerdiği belirlenmiştir. Bu yapı, antimikrobiyal peptitlerin hücre zarları ile etkileşimini kolaylaştırması açısından biyolojik aktivite için kritik öneme sahiptir.

S. aureus ve *P. aeruginosa*'nın birlikte biyofilm oluşturabilmesi için uygun bir besiyeri geliştirilmiş ve çift türlü biyofilm modeli başarıyla elde edilmiştir. VR-10 ve GV-13 peptitlerinin hem tekli hem de çiftli kültür sistemlerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri detaylı biçimde incelenmiştir. Bu analizler sonucunda, her iki peptitin de özellikle biyofilm oluşumunu inhibe etmede etkili olduğu, hücre morfolojisini bozduğu ve canlılık oranlarını anlamlı düzeyde azalttığı gözlemlenmiştir.

Ayrıca, MTT testi sonucunda peptitlerin insan hücrelerine karşı sitotoksik etkilerinin olmadığı, hemoliz testinde ise hemolitik aktivite göstermediği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular, VR-10 ve GV-13 peptitlerinin güçlü antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklerinin yanı sıra düşük sitotoksosite açısından da güvenli olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle çift türlü biyofilm modellerine karşı etkili olmaları, bu peptitleri polimikrobiyal enfeksiyonlara karşı potansiyel tedavi ajanları haline getirmektedir.

Sonuç olarak VR-10 ve GV-13 peptitleri, gelecekte yapılacak in vivo çalışmalarla desteklenerek klinik uygulamalara kazandırılacak umut verici adaylar olarak görülmektedir. İleriki çalışmalarda bu ABP'lerin farklı dual biyofilm modellerine karşı antibiyofilm aktivitesi ve in vivo deneylerde etkileri değerlendirilmelidir.

Bu tez çalışması ile sentezlenen GV-13 ve VR-10 peptitlerinin klinikte kullanılabilmesi için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılması gereken çalışmalar maddeler halinde gösterilmiş ve sonraki çalışmalar için önerilmiştir.

1. Peptitlerin in vivo modellerde etkinliği test edilmelidir.
2. Peptitlerin stabilitesini ve aktivitesini artıracak stratejiler geliştirilmelidir.
3. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda kullanılabilecek kombinasyon tedaviler kapsamında, bu peptitlerin antibiyotiklerle birlikte sinerjik etkileri incelenmelidir.
4. Peptitlerin taşıyıcı sistemlerle hedefe yönelik uygulanabilirliği ele alınmalıdır.
5. Model membran sistemlerinde etkileşim analizleri ile peptitlerin zar düzeyindeki etkileri moleküler düzeyde aydınlatılmalıdır.
6. Klinik izolatlarla karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri araştırılarak spektrum genişliği belirlenmelidir.
7. Farklı dual modellerine karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri incelenmelidir.

KAYNAKLAR

- Ahn KB, Baik JE, Yun C-H, Han SH (2018) Lipoteichoic Acid Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Front Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00327>
- Ahsan SM, Choi HW, Injamum-Ul-Hoque Md, et al (2024) Valorization of Agro-food Wastes and Byproducts into Bioactive Peptides. In: Saha SP, Mazumdar D, Roy S, Mathur P (eds) *Agro-waste to Microbe Assisted Value Added Product: Challenges and Future Prospects: Recent Developments in Agro-waste Valorization Research*. Springer Nature Switzerland, Cham, pp 61–92
- Aka ST (2015) Killing efficacy and anti-biofilm activity of synthetic human cationic antimicrobial peptide cathelicidin hCAP-18/LL37 against urinary tract pathogens. *J Microbil Infect Dis* 5:15–20. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2015.01.0168>
- Alexander JAN, Radaeva M, King DT, et al (2020) Structural analysis of avibactam-mediated activation of the bla and mec divergons in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 295:10870–10884. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013029>
- Allkja J, Goeres DM, Azevedo AS, Azevedo NF (2023) Interactions of microorganisms within a urinary catheter polymicrobial biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* 120:239–249. <https://doi.org/10.1002/bit.28241>
- Anunthawan T, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW, Klaynongsruang S (2015) Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848:1352–1358. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.021>
- Arslan E, Coşkun MK, Çobanoğlu Ş, et al (2023) Effects of four antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* motility, biofilm formation, and biofilm-specific antibiotic resistance genes expression. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 106:115931. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115931>
- Batoni G, Casu M, Giuliani A, et al (2016) Rational modification of a dendrimeric peptide with antimicrobial activity: consequences on membrane-binding and biological properties. *Amino Acids* 48:887–900. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2136-5>
- Béatrice J, Maud P, Stéphane A, et al (2005) Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung

infection in rats. FEMS Microbiology Letters 243:271–278.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.012>

Beaudoin T, Zhang L, Hinz AJ, et al (2012) The Biofilm-Specific Antibiotic Resistance Gene *ndvB* Is Important for Expression of Ethanol Oxidation Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. J Bacteriol 194:3128–3136.
<https://doi.org/10.1128/JB.06178-11>

Bessa LJ, Manickchand JR, Eaton P, et al (2019) Intragenic Antimicrobial Peptide Hs02 Hampers the Proliferation of Single- and Dual-Species Biofilms of *P. aeruginosa* and *S. aureus*: A Promising Agent for Mitigation of Biofilm-Associated Infections. International Journal of Molecular Sciences 20:3604.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143604>

Bezar IF, Mashruwala AA, Boyd JM, Stock AM (2019) Drug-like Fragments Inhibit *agr*-Mediated Virulence Expression in *Staphylococcus aureus*. Sci Rep 9:6786.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42853-z>

Bhat RAH, Thakuria D, Tandel RS, et al (2022) Tools and techniques for rational designing of antimicrobial peptides for aquaculture. Fish & Shellfish Immunology 127:1033–1050. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.055>

Bionda N, Fleeman RM, de la Fuente-Núñez C, et al (2016) Identification of novel cyclic lipopeptides from a positional scanning combinatorial library with enhanced antibacterial and antibiofilm activities. European Journal of Medicinal Chemistry 108:354–363. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.032>

Bose B, Downey T, Ramasubramanian AK, Anastasiu DC (2022) Identification of Distinct Characteristics of Antibiofilm Peptides and Prospection of Diverse Sources for Efficacious Sequences. Front Microbiol 12:783284.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.783284>

Brand GD, Magalhães MTQ, Tinoco MLP, et al (2012) Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. PLOS ONE 7:e45848.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045848>

Brand GD, Ramada MHS, Genaro-Mattos TC, Bloch C (2018) Towards an experimental classification system for membrane active peptides. Sci Rep 8:1194.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19566-w>

Brand GD, Ramada MHS, Manickchand JR, et al (2019) Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. PLOS ONE 14:e0220656.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>

- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Cao J, de la Fuente-Nunez C, Ou RW, et al (2018) Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. *ACS Synth Biol* 7:896–902. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00396>
- Chalmers RM, Robertson LJ, Dorny P, et al (2020) Parasite detection in food: Current status and future needs for validation. *Trends in Food Science & Technology* 99:337–350. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.011>
- Chan Y, Wu XH, Chieng BW, et al (2021) Superhydrophobic Nanocoatings as Intervention against Biofilm-Associated Bacterial Infections. *Nanomaterials* 11:1046. <https://doi.org/10.3390/nano11041046>
- Chand Y, Khadka S, Sapkota S, et al (2021) Clinical Specimens are the Pool of Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* Harboring *oprL* and *toxA* Virulence Genes: Findings from a Tertiary Hospital of Nepal. *Emerg Med Int* 2021:4120697. <https://doi.org/10.1155/2021/4120697>
- Cheigh C-I, Pyun Y-R (2005) Nisin Biosynthesis and its Properties. *Biotechnol Lett* 27:1641–1648. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2721-x>
- Chen J, Hao D, Mei K, et al (2021) In Vitro and In Vivo Studies on the Antibacterial Activity and Safety of a New Antimicrobial Peptide Dermaseptin-AC. *Microbiology Spectrum* 9:e01318-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01318-21>
- Chen N, Li Y, Liang X, et al (2024) Bacterial extracellular vesicle: A non-negligible component in biofilm life cycle and challenges in biofilm treatments. *Biofilm* 8:100216. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100216>
- Costa ISD, Junot T, Silva FL, et al (2024) Occurrence and evolutionary conservation analysis of α -helical cationic amphiphilic segments in the human proteome. *The FEBS Journal* 291:547–565. <https://doi.org/10.1111/febs.16997>
- De Brucker K, Delattin N, Robijns S, et al (2014) Derivatives of the Mouse Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide (CRAMP) Inhibit Fungal and Bacterial Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58:5395–5404. <https://doi.org/10.1128/aac.03045-14>
- de la Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, et al (2012) Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide.

- Dean SN, Bishop BM, Van Hoek ML (2011) Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front Microbiol* 2:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00128>
- Di Somma A, Moretta A, Canè C, et al (2020) Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* 10:652. <https://doi.org/10.3390/biom10040652>
- Dong N, Wang C, Zhang T, et al (2019) Bioactivity and Bactericidal Mechanism of Histidine-Rich β -Hairpin Peptide Against Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 20:3954. <https://doi.org/10.3390/ijms20163954>
- Dostert M, Belanger CR, Hancock REW (2018) Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application. *Journal of Innate Immunity* 11:193–204. <https://doi.org/10.1159/000491497>
- Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, et al (2016) Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. *Microb Pathog* 99:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.013>
- Farrag HN, Metwally K, Ikeno S, Kato T (2020) Design and Synthesis of a New Amphipathic Cyclic Decapeptide with Rapid, Stable, and Continuous Antibacterial Effects. *JST* 28:. <https://doi.org/10.47836/pjst.28.s2.15>
- Fei F, Wang T, Jiang Y, et al (2023) A frog-derived antimicrobial peptide as a potential anti-biofilm agent in combating *Staphylococcus aureus* skin infection. *J Cell Mol Med* 27:1565–1579. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17785>
- Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S (2014) Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life* 66:572–577. <https://doi.org/10.1002/iub.1289>
- Fleming A OBSERVATIONS ON A BACTERIOLYTIC SUBSTANCE ("LYSOZYME") FOUND IN SECRETIONS AND TISSUES.
- Fuente-Núñez C de la, Reffuveille F, Haney EF, et al (2014) Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLOS Pathogens* 10:e1004152. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004152>

- Fuente-Núñez C de la, Reffuveille F, Mansour SC, et al (2015) D-Enantiomeric Peptides that Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Chemistry & Biology* 22:196–205. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.002>
- Goel N, Fatima SW, Kumar S, et al (2021) Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports* 30:e00613. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00613>
- Gomez S, Bureau L, John K, et al (2023) Substrate stiffness impacts early biofilm formation by modulating *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility. *eLife* 12:e81112. <https://doi.org/10.7554/eLife.81112>
- Gounani Z, Şen Karaman D, Venu AP, et al (2020) Coculture of *P. aeruginosa* and *S. aureus* on cell derived matrix - An *in vitro* model of biofilms in infected wounds. *Journal of Microbiological Methods* 175:105994. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105994>
- Gül Şeker M (2021) Sülfonilüre Grubu Herbisit Kullanılan Tekirdağ Tarım Alanlarından İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Karakterizasyonu. *ANADOLU JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES* 10–19. <https://doi.org/10.7161/omuanajas.670435>
- Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, et al (2021) Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. *iScience* 24:102443. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>
- Hancock REW, Alford MA, Haney EF (2021) Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. *Nat Rev Microbiol* 19:786–797. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00585-w>
- Hirt H, Gorr S-U (2013) Antimicrobial Peptide GL13K Is Effective in Reducing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4903–4910. <https://doi.org/10.1128/AAC.00311-13>
- Hou J, Long X, Wang X, et al (2023) Global trend of antimicrobial resistance in common bacterial pathogens in response to antibiotic consumption. *Journal of Hazardous Materials* 442:130042. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130042>
- Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H (2020) Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

- Jain AK, Singh D, Dubey K, et al (2018) Chapter 3 - Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: Dhawan A, Kwon S (eds) In Vitro Toxicology. Academic Press, pp 45–65
- Jassim AA, Mahdi WM, Khalaf Al-Obaidi OR (2025) Identification of *algD* and *oprL* genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from multiple environments and different local sources in Iraq. Kuwait Journal of Science 52:100302. <https://doi.org/10.1016/j.kjs.2024.100302>
- Jung Y, Kong B, Moon S, et al (2019) Envelope-deforming antiviral peptide derived from influenza virus M2 protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 517:507–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.088>
- Kampf G, Lecke C, Cimbal A-K, et al (1998) Evaluation of Mannitol Salt Agar for Detection of Oxacillin Resistance in Staphylococcus aureus by Disk Diffusion and Agar Screening. J Clin Microbiol 36:2254–2257. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.8.2254-2257.1998>
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T (2020) Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. Trends in Microbiology 28:668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Kilani AM, Alabi ED, Adeleke OE (2024) Coexistence of the bla_Z gene and selected virulence determinants in multidrug-resistant Staphylococcus aureus: insights from three Nigerian tertiary hospitals. BMC Infectious Diseases 24:1269. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-10171-z>
- Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, et al (2004) Staphylococcus aureus AgrA Binding to the RNAIII-agr Regulatory Region. J Bacteriol 186:7549–7555. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7549-7555.2004>
- Kulshrestha A, Gupta P (2022) Polymicrobial interaction in biofilm: mechanistic insights. Pathogens and Disease 80:ftac010. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftac010>
- Kvich L, Crone S, Christensen MH, et al (2022) Investigation of the Mechanism and Chemistry Underlying Staphylococcus aureus' Ability to Inhibit Pseudomonas aeruginosa Growth In Vitro. Journal of Bacteriology 204:e00174-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00174-22>
- Landa G, Clarhaut J, Buyck J, et al (2024) Impact of mixed Staphylococcus aureus-Pseudomonas aeruginosa biofilm on susceptibility to antimicrobial treatments in a 3D in vitro model. Sci Rep 14:27877. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79573-y>

- Le C-F, Fang C-M, Sekaran SD (2017) Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61:10.1128/aac.02340-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02340-16>
- Lee JH, Cho KS, Lee J, et al (2001) Dipterecin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene* 271:233–238. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00515-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00515-7)
- Lei J, Sun L, Huang S, et al (2019) The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res* 11:3919–3931
- Li C, Zhu C, Ren B, et al (2019) Two optimized antimicrobial peptides with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 183:111686. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111686>
- Lin Z, Yuan T, Zhou L, et al (2021) Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment. *Environ Geochem Health* 43:1741–1758. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00759-0>
- Liu X, Henriques ST, Craik DJ, Chan LY (2023) Unlocking the Potential of the Antimicrobial Peptide Gomesin: From Discovery and Structure-Activity Relationships to Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci* 24:5893. <https://doi.org/10.3390/ijms24065893>
- Liu X, Tremblay P-L, Malvankar NS, et al (2014) A *Geobacter sulfurreducens* Strain Expressing *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili Localizes OmcS on Pili but Is Deficient in Fe(III) Oxide Reduction and Current Production. *Applied and Environmental Microbiology* 80:1219–1224. <https://doi.org/10.1128/AEM.02938-13>
- Loss G, Simões PM, Valour F, et al (2019) *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00363>
- Luo A, Wang F, Sun D, et al (2022) Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms. *Front Microbiol* 12:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.757327>
- Ma S, Moser D, Han F, et al (2020) Preparation and antibiofilm studies of curcumin loaded chitosan nanoparticles against polymicrobial biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers* 241:116254. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116254>

- Madanchi H, Shoushtari M, Kashani HH, Sardari S (2020) Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases. *New Microbes and New Infections* 34:100627. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100627>
- Magalhães AP, Jorge ,Paula, and Pereira MO (2019) *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* communication in biofilm infections: insights through network and database construction. *Critical Reviews in Microbiology* 45:712–728. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1700209>
- Mah T-F, Pitts B, Pellock B, et al (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426:306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Mardirossian M, Grzela R, Giglione C, et al (2014) The Host Antimicrobial Peptide Bac71-35 Binds to Bacterial Ribosomal Proteins and Inhibits Protein Synthesis. *Chemistry & Biology* 21:1639–1647. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.009>
- Mariano GH, Gomes de Sá LG, Carmo da Silva EM, et al (2021) Characterization of novel human intragenic antimicrobial peptides, incorporation and release studies from ureasil-polyether hybrid matrix. *Materials Science and Engineering: C* 119:111581. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111581>
- Mattiuzzo M, Bandiera A, Gennaro R, et al (2007) Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology* 66:151–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x>
- Migoń D, Neubauer D, Kamysz W (2018) Hydrocarbon Stapled Antimicrobial Peptides. *Protein J* 37:2–12. <https://doi.org/10.1007/s10930-018-9755-0>
- Min KH, Kim KH, Ki M-R, Pack SP (2024) Antimicrobial Peptides and Their Biomedical Applications: A Review. *Antibiotics* 13:794. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090794>
- Mishra B, Golla RM, Lau K, et al (2016) Anti-Staphylococcal Biofilm Effects of Human Cathelicidin Peptides. *ACS Med Chem Lett* 7:117–121. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00433>
- Mitra S, Banka ,Nagapriya, Basu ,Soumyava, and Rao T (2025) Ultrastructural polymicrobial *Staphylococcus aureus*–*Pseudomonas aeruginosa* interactions and antimicrobial resistance in ex vivo cornea model. *Future Microbiology* 20:117–135. <https://doi.org/10.1080/17460913.2024.2417617>

- Mohaideen NSMH, Vaani S, Hemalatha S (2023) Antimicrobial Peptides. *Curr Pharmacol Rep* 9:433–454. <https://doi.org/10.1007/s40495-023-00342-y>
- Mota I de S, Cardoso M, Bueno J, et al (2024) Intragenic antimicrobial peptide Hs02 toxicity against leukemia cell lines is associated with increased expression of select pyroptotic components. *Toxicology in Vitro* 101:105945. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105945>
- Nishikawa M, Kobayashi K (2021) Calcium Prevents Biofilm Dispersion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 203:10.1128/jb.00114-21. <https://doi.org/10.1128/jb.00114-21>
- Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, et al (2020) Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
- Onyango LA, Dunstan RH, Roberts TK, et al (2013) Phenotypic Variants of *Staphylococci* and Their Underlying Population Distributions Following Exposure to Stress. *PLOS ONE* 8:e77614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077614>
- Orazi G, Ruoff KL, O'Toole GA (2019) *Pseudomonas aeruginosa* Increases the Sensitivity of Biofilm-Grown *Staphylococcus aureus* to Membrane-Targeting Antiseptics and Antibiotics. *mBio* 10:10.1128/mbio.01501-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01501-19>
- Panayidou S, Georgiades K, Christofi T, et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence. *Sci Rep* 10:9505. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66194-4>
- Park S-C, Lee M-Y, Kim J-Y, et al (2019) Anti-Biofilm Effects of Synthetic Antimicrobial Peptides Against Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Planktonic Cells and Biofilm. *Molecules* 24:4560. <https://doi.org/10.3390/molecules24244560>
- Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE (2016) Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current Opinion in Microbiology* 33:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
- Price CE, Brown DG, Limoli DH, et al (2020) Exogenous Alginate Protects *Staphylococcus aureus* from Killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 202:10.1128/jb.00559-19. <https://doi.org/10.1128/jb.00559-19>

- Puchakayala HC, Bhatnagar P, Nambiar P, et al (2023) Design of a machine learning-aided screening framework for antibiofilm peptides. *Digital Chemical Engineering* 8:100107. <https://doi.org/10.1016/j.dche.2023.100107>
- Ramada MHS, Brand GD, Abrão FY, et al (2017) Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Sci Rep* 7:13263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13685-6>
- Rather MA, Gupta K, Mandal M (2021) Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol* 52:1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24:536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Rogers LA (1928) THE INHIBITING EFFECT OF STREPTOCOCCUS LACTIS ON LACTOBACILLUS BULGARICUS. *J Bacteriol* 16:321–325. <https://doi.org/10.1128/jb.16.5.321-325.1928>
- Rollins-Smith LA (2009) The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788:1593–1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>
- Rust L, Pesci EC, Iglewski BH (1996) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (lasB) regulatory region. *J Bacteriol* 178:1134–1140. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1134-1140.1996>
- Rütschlin S, Böttcher T (2020) Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior. *Chemistry – A European Journal* 26:964–979. <https://doi.org/10.1002/chem.201901961>
- Santos MA, Silva FL, Lira BOV, et al (2023) Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1867:130265. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130265>
- Sharma D, Sreekrishnan TR, Ahammad SZ (2022) Modeling biofilm and development of rate law expressions for biofilm kinetics. *Chemical Engineering Journal Advances* 12:100419. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100419>
- Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, et al (2023) Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative

Tang S-S, Prodhan ZH, Biswas SK, et al (2018) Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry* 154:94–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.002>

Trizna EY, Yarullina MN, Baidamshina DR, et al (2020) Bidirectional alterations in antibiotics susceptibility in *Staphylococcus aureus*—*Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm. *Sci Rep* 10:14849. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71834-w>

Vilcinskas A (2013) Evolutionary plasticity of insect immunity. *Journal of Insect Physiology* 59:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.018>

Walrant A, Bauzá A, Girardet C, et al (2020) Ionpair- π interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862:183098. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183098>

Wang G (2014) Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 7:545–594. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>

Wani NA, Gazit E, Ramamoorthy A (2024) Interplay between Antimicrobial Peptides and Amyloid Proteins in Host Defense and Disease Modulation. *Langmuir* 40:25355–25366. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c03123>

Wu D, Gao Y, Qi Y, et al (2014) Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Letters* 351:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.002>

Xiao M, Zhao R, Zhang Q, et al (2016) Genotypic Diversity of *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Gene (hla) and Its Association with Clonal Background: Implications for Vaccine Development. *PLoS One* 11:e0149112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149112>

Yasir M, Willcox MDP, Dutta D (2018) Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel)* 11:2468. <https://doi.org/10.3390/ma11122468>

Yilmaz U, Danişmani T, Ünlü DGV TEZ DANIŞMANI PROF. DR. GÜLHAN VARDAR ÜNLÜ

Yuksekdag ZN, Baltaci N (2015) Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler. TMCD 43:77–83. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2013.077>

Zea L, McLean RJC, Rook TA, et al (2020) Potential biofilm control strategies for extended spaceflight missions. Biofilm 2:100026. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100026>

Zhang S-K, Song J, Gong F, et al (2016) Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. Sci Rep 6:27394. <https://doi.org/10.1038/srep27394>

Zupin L, Santos-Silva CA dos, Al Mughrbi ARH, et al (2022) Bioactive Antimicrobial Peptides: A New Weapon to Counteract Zoonosis. Microorganisms 10:1591. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081591>