



**VERİ TABANI FİLTRELEME TEKNOLOJİSİ İLE
DİZAYN EDİLEN TOAP2 TÜREVİNİN (LI-15)
PATOJEN MİKROORGANİZMALARA KARŞI
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ruhane TOSUNOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI

2025

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**VERİ TABANI FİLTRELEME TEKNOLOJİSİ İLE DİZAYN EDİLEN TOAP2
TÜREVİNİN (LI-15) PATOJEN MİKROORGANİZMALARA KARŞI
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ruhane TOSUNOĞLU

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

**VERİ TABANI FİLTRELEME TEKNOLOJİSİ İLE DİZAYN EDİLEN TOAP2
TÜREVİNİN (LI-15) PATOJEN MİKROORGANİZMALARA KARŞI
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Ayşenur YAZICI danışmanlığında, Ruhane TOSUNOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 09 / 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	: Doç. Dr. Melike KARAMAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 1001 kodlu 122Z741 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.

09 / 05 / 2025

İmzası

Ruhane TOSUNOĞLU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VERİ TABANI FİLTRELEME TEKNOLOJİSİ İLE DİZAYN EDİLEN TOAP2 TÜREVİNİN (LI-15) PATOJEN MİKROORGANİZMALARA KARŞI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ruhane TOSUNOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI

Antimikrobiyal peptitler (AMP), doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinden biri olup; bakteriler, funguslar, bitkiler ve hayvanlar tarafından sentezlenen, geniş antimikrobiyal spektruma sahip küçük moleküllerdir. Antibiyotik direncinin küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit haline gelmesi, yeni ve etkili antimikrobiyal ajanlara duyulan ihtiyacı artırmıştır. Bu doğrultuda AMP'ler, alternatif biyolojik ajanlar olarak ön plana çıkmaktadır. Ancak doğal AMP'lerin toksisite ve stabilite gibi sınırlayıcı özellikleri, sentetik olarak tasarlanan peptitlere olan ilgiyi artırmıştır. Son yıllarda gelişen biyoinformatik yaklaşımlar, hedefe yönelik, düşük toksisiteli ve yüksek etkinlikte AMP'lerin rasyonel tasarımına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada, "veri tabanı filtreleme teknolojisi" kullanılarak AMP tasarımı gerçekleştirilmiş ve antibiyofilik özellik gösteren ToAP2 peptidi analiz edilerek LI-15 peptidi tasarlanmıştır. LI-15'in antimikrobiyal, antibiyofilik ve sitotoksik özellikleri in vitro koşullarda değerlendirilmiş, sekonder yapısı FTIR ve CD spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi mikrodilüsyon ve öldürme kinetiği ile; antibiyofilik etkisi kristal viyole testi ve SEM analizleri ile test edilmiştir. Sitotoksikite analizi, insan fibroblast hücre hattı (HDFa) kullanılarak MTT ve LDH testleriyle yapılmıştır. Ayrıca, LI-15'in biyofilm oluşumuyla ilişkili virülens genleri üzerindeki etkisi qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, ilk kez tasarlanan LI-15 peptidinin antimikrobiyal ve antibiyofilik etkiler gösterdiği, ayrıca düşük sitotoksikite profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, LI-15'in yeni bir antibiyofilik peptit adayı olduğunu önermektedir.

2025, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal Peptit, Antibiyofilik Peptit, Veri Tabanlı Filtreleme Teknolojisi, ToAP2

ABSTRACT

MS. Thesis

VERİ TABANI FİLTRELEME TEKNOLOJİSİ İLE DİZAYN EDİLEN TOAP2 TÜREVİNİN (LI-15) PATOJEN MİKROORGANİZMALARA KARŞI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ruhane TOSUNOĞLU

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune system and are small molecules with a broad antimicrobial spectrum synthesized by bacteria, fungi, plants, and animals. The emergence of antibiotic resistance as a serious global health threat has increased the need for novel and effective antimicrobial agents, positioning AMPs as promising alternative biological molecules. However, certain limitations of natural AMPs, such as toxicity and stability, have increased interest in synthetically designed peptides. Recent advances in bioinformatics have enabled the rational design of AMPs with target specificity, low toxicity, and high efficacy. In this study, an AMP was designed using "database filtering technology," and the antibiofilm peptide ToAP2 was analyzed to design a novel derivative, LI-15. The antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic properties of LI-15 were evaluated in vitro, and its secondary structure was characterized using FTIR and CD spectroscopy. Antimicrobial activity was tested via microdilution and time-kill kinetics assays, while antibiofilm activity was assessed using crystal violet staining and SEM analysis. Cytotoxicity was evaluated using MTT and LDH assays with human fibroblast (HDFa) cells. Additionally, the effect of LI-15 on biofilm-related virulence genes was analyzed by qRT-PCR. The results demonstrated that LI-15, designed for the first time through a bioinformatic approach, exhibited antimicrobial and antibiofilm activity under in vitro conditions and had a low cytotoxicity profile. These findings suggest that LI-15 is a promising candidate as a novel antibiofilm peptide.

2025, 66 page

Keywords: Antimicrobial Peptide, Antibiofilm Peptide, Database Filtering Technology, ToAP2

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), ayrıca çalışmamın yürütüldüğü projeyi destekleyen TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı’na teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde bilgi ve deneyimiyle yolumu aydınlatan, her aşamada destek olan değerli hocam Doç. Dr. Ayşenur YAZICI’ya teşekkür ederim.

Hücre kültürü deneylerinde bilgilerini paylaşarak ve yardımlarını eksik etmeyerek sürecime katkı sağlayan Doç. Dr. Mehmet Enes Arslan’a, ayrıca tez sürecimin genelinde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serkan Örtücü’ye teşekkür ederim.

Laboratuvar sürecinde her zaman yanımda olan, desteği ve pozitif enerjisiyle bu zorlu süreci keyifli hale getiren sevgili Şeymanur Çobanoğlu’na ve çalışmamdaki katkıları için Erdem Erkenez’e teşekkür ederim.

Tez sürecinin ötesinde hem laboratuvarında hem hayatın her anında yanımda olan, desteğini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen, dostlarım Güler Tuba Buğdacı ve Simay Aldağ’a gönülden teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana koşulsuz sevgi, sabır ve destek sunan aileme; varlıklarıyla en büyük güç kaynağım olan babam Muhyetdin Tosunoğlu’na, annem Fatma Tosunoğlu’na, kardeşim Abdulkadir Tosunoğlu’na, her zaman yanımda olan ablam Betül Polat ve abim Mustafa Polat’a ve en özel teşekkürüm, duaları ve sevgisiyle her daim yüreğimi ısıtan kıymetli anneannem Ülviye Tosunoğlu’na teşekkür ederim.

Ruhane TOSUNOĞLU

Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm Nedir	1
1.2. Antimikrobiyal Nedir?	4
1.2.1. Antimikrobiyal Bileşiklerin Çeşitleri ve Etki Mekanizmaları	5
1.2.2. Antimikrobiyallerin Bileşiklerinin Kullanım Alanları.....	6
1.3. Antimikrobiyal Direnç Sorunu	7
1.4. Antimikrobiyal Peptitler	8
1.5. Antibiyofilm Peptitler	10
1.6. Biyoinformatik Olarak Antimikrobiyal Peptit Dizaynı.....	11
1.7. Veri Tabanlı Filtreleme Teknolojileri	13
1.7.1. Antimikrobiyal Peptit Veri Tabanlarının Gelişimi ve Filtreleme Teknolojileri ..	13
1.8. ToAP2	14
1.9. Tezin Amacı	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
2.1. ToAP2'nin Keşfi ve Tarihsel Gelişimi	16
2.1.2 Mikrobiyal Etkinlik ve Etki Mekanizması	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Cihazlar	21
3.1.2. Sarf Malzemeler	22
3.1.3. Bakteri Suşları.....	22
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları.....	22
3.1.4.1. Mueller-Hilton Agar (MHA)	22

3.1.4.2. Muller-Hilton Broth (MHB)	23
3.1.5. %0,1'lik Kristal Viyole Boyası	23
3.1.6. %30'luk Asetik Asit.....	23
3.1.7. Agaro Jel Hazırlama	23
3.1.8. Primerler.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Peptit Sentezi ve Karakterizasyonu	24
3.2.1.1. Peptit Sentezi	24
3.2.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	25
3.2.1.3. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi	25
3.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK) Testi	25
3.2.3. Kristal Viyole (CV) Testi (MBIK Tayini)	26
3.2.4. Biyofilm Eradikasyon Testi (MBEK Tayini).....	27
3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi.....	27
3.2.6. Floresan Mikroskop Analizi.....	28
3.2.7. Hareketlilik Testleri	29
3.2.7.1. Kaynaşma Hareketinin İncelenmesi (Swarming Motility)	29
3.2.7.2. Seğirme Hareketinin İncelenmesi (Twitching Motility)	29
3.2.8. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	30
3.2.9. Piyosiyonin Deneyi	30
3.2.10. RNA İzolasyonu.....	31
3.2.11. cDNA Sentezi.....	32
3.2.12. RT-PCR Analizi	32
3.2.13. MTT Testi	33
3.2.14. LDH Testi	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. Peptit Sentezi ve Karakterizasyonu	34
4.2. Patojen Bakteri Suşlarının Kültüre Alınması	38
4.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK) Testi	38
4.4. Kristal Viyole (CV) Testi (MBIK Tayini)	40
4.5. Biyofilm Eradikasyon Testi (MBEK Tayini).....	42
4.6. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi.....	43
4.7. Floresan Mikroskop Analizi.....	44
4.8. Hareketlilik Testleri	45

4.8.1. Kaynaşma Hareketinin İncelenmesi (Swarming Motility)	45
4.8.2. Seğirme Hareketinin İncelenmesi (Twitching Motility)	47
4.9. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	48
4.10. Piyosiyonin Testi	50
4.11. RealTime PCR Analizi.....	51
4.12. MTT Testi	54
4.13. LDH Testi	55
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
------------------------	------------------------

°C	Santigrat Derece
g	gram
L	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Kisaltmalar

aa	Aminoasit
ABP	Antibiyofilm Polipeptitler
AMP	Antimikrobiyal Polipeptitler
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MBIK	Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik asit
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Biyofilm Oluşum Şeması.....	1
Şekil 1.2.	Biofilm Kullanım Alanları Şeması	3
Şekil 1.3.	Antimikrobiyallerin Etki Ettiği Organizmalar	5
Şekil 1.4.	AMP'lerim hedef gösterimleri	10
Şekil 2.1.	ToAP2 Peptidi 3 Boyutlu Yapısı	18
Şekil 2.2.	Grafiksel Özet.....	18
Şekil 3.1	Piyosiyonun Deney Şablonu.....	31
Şekil 4.1.	Veri Tabanı Filtreleme Teknolojisi ile ABP Moleküllerinin Özelliklerinin Gösterdiğimiz Histogram Grafikleri.....	33
Şekil 4.2.	Helikal Well Diyagramı.....	35
Şekil 4.3.	LI-15 Peptitinin HPLC Sonucu	36
Şekil 4.4.	LI-15 Peptitinin Kütle Spektroskopisi (CD).....	37
Şekil 4.5.	LI-15'in FT-IR Pik Analiz Grafikleri. LI-15'in α -heliks Yapısı ve β -dönüş Yapısına Sahip Olabileceği Görülmektedir	37
Şekil 4.6.	LI-15'in <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi. (Artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir).....	42
Şekil 4.7.	LI-15'in Oluşmuş Biyofilmin Bozulmasına Olan Etkisi. (<i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'da Artan Konsantrasyonlarda Biyofilm Yıkımını Arttırdığı Görülmektedir)	43
Şekil 4.8.	PAO1 Suşunun Farklı MİK Değerlerinde Uygulanmış SEM Görüntüleri.....	44
Şekil 4.9.	MRSA Suşunun Farklı MİK Değerlerinde Uygulanmış SEM Görüntüleri.....	44
Şekil 4.10.	2MIC konsantrasyonundaki LI-15'in <i>P. aeruginosa</i> 'ya (A, B, C) ve <i>S. aureus</i> (D, E, F)'ye karşı canlılık değerlendirmesi (A ve D: kontrol grupları)	45
Şekil 4.11.	LI-15 <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Üzerindeki Swarming Etkinliği.....	46
Şekil 4.12.	LI-15'in <i>P. aeruginosa</i> Üzerindeki Twitching Etkinliği	48
Şekil 4.13.	Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	49
Şekil 4.14.	LI-15 Peptidinin Farklı Konsantrasyonlarda (4–256 mg/ml) Eritrosit Süspansiyonu Üzerinde Oluşturduğu Hemolitik Aktiviteye Ait Görsel	49
Şekil 4.15.	LI-15 Peptidi ile Piyosiyonin Üretiminin Değerlendirilmesi	51
Şekil 4.16.	LI-15 Peptidi ile Piyosiyonin Üretiminin Deneysel Görüntüsü	51

Şekil 4.17. <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Suşunda Belirlenen Genler Üzerindeki Etkinliğin Gösterildiği RT-qPCR Grafiği	53
Şekil 4.18. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) Suşunda Belirlenen Genler Üzerindeki Etkinliğin Gösterildiği RT-qPCR Grafiği	53
Şekil 4.19. HDFA Hücre Hattında 24 Saatlik Uygulamalarda LI-15'in MTT Hücre Canlılık Analizi	54
Şekil 4.20. 24 Saatlik Uygulamalar İçin HDFA Hücre Hattında Sentezlenen LI-15 Peptitinin LDH Hücre Canlılık Analizleri	56



ÇİZELGELER DİZİNİ

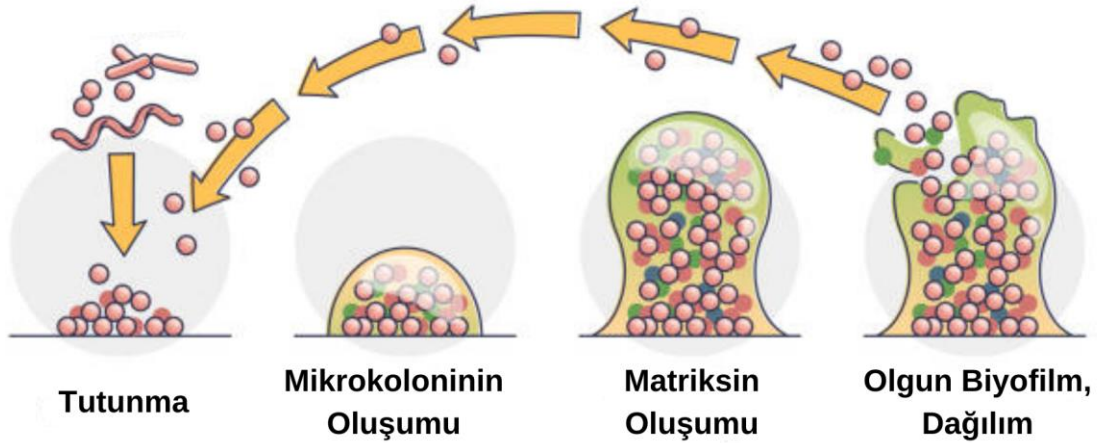
Çizelge 1.1. Bazı Antimikrobiyal ve Biyolojik Aktif Peptitlerin Listelendiği Veritabanları ve Tahmin Araçları	14
Çizelge 3.1. Cihazların Adı ve Modelleri	21
Çizelge 3.2. Tezde Kullanılacak Patojen Suşlar ve Kodları	22
Çizelge 3.3. Kullanılacak Primerlerin İsimleri, Dizileri ve Referansları.....	23
Çizelge 4.1. Kalıp olarak seçilen ABP molekülü	35
Çizelge 4.2. Sentezlenen ABP dizisi ve saflığı.....	36
Çizelge 4.3. BestSel algaratıması ile Gerçekleştirilen CD Spektrometre Sonuçları	36
Çizelge 4.4. LI-15 Peptidinin Bakteri ve Maya Suşlarına Karşı MIC Değerleri.....	39
Çizelge 4.4. LI-15 Peptidinin Bakteri ve Maya Suşlarına Karşı MBIK Değerleri.....	40

1. GİRİŞ

1.1. BİYOFİLM NEDİR?

Mikroorganizmaların, yüzeylerle ve birbirleriyle etkileşime geçerek oluşturduğu karmaşık yapılara biyofilm denir. Biyofilmler, bakteriler, mantarlar ve algler gibi çeşitli mikroorganizmaların doğal ortamda, insan vücudunda ve endüstriyel sistemler gibi pek çok yerde yüzeylere tutunarak kendilerini koruyan ve organize eden matriks yapılar halinde bulunurlar.(Gıda et al. 2021a) Bu yapı, mikroorganizmaların çevresel koşullara karşı dayanıklılık kazanmalarını sağlayarak onları dış faktörlerden koruyan bir matriks ile çevreler. Matriks, polisakkaritler, proteinler, lipitler ve DNA gibi bileşenlerden oluşur ve mikroorganizmalar arasındaki bağları güçlendirir ve biyofilmin stabilitesini ve dayanıklılığını artırır(Diseases-Special and 2018 n.d.; Kartal et al. n.d.).

BİYOFİLM



Şekil 1.1. Biyofilm Oluşum Şeması

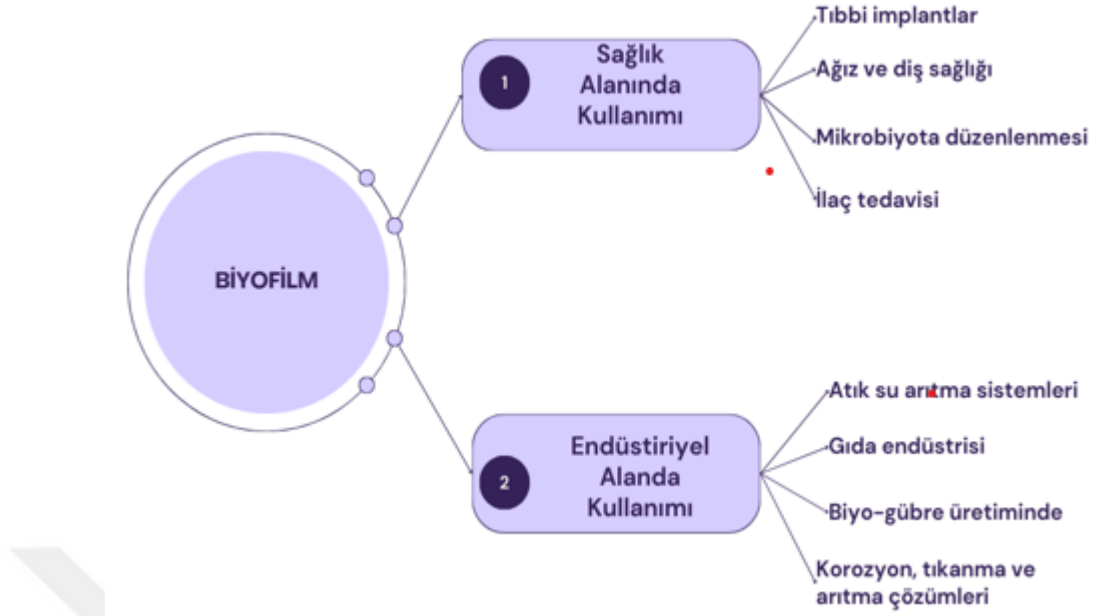
Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasıyla başlar. İlk olarak, mikroorganizmalar adezyon moleküllerini kullanarak uygun bir yüzeye bağlanırlar. İkinci aşamada, mikroorganizmalar kendilerine çevreden gelen stres faktörlerine karşı daha dirençli hale getiren ekstraselüler bir matriks salgılar. Bu matriks, mikroorganizmaların yüzeye daha sıkı tutunmasını sağlarken aynı zamanda dış etkenlere, antibiyotiklere ve bağışıklık sisteminin saldırılarına karşı koruma sağlar. Biyofilmin bu

özelliği, tedavi sürecinde antibiyotik tedavilerine karşı biyofilm içindeki bakterilerin daha dirençli hale gelmesine neden olur (Jefferson 2004; Mirzaei, Abdi, and Gholami 2020).

Biyofilmler, birçok biyolojik, endüstriyel ve tıbbi süreçte önemli rol oynarlar. İnsan vücudunda bulunan biyofilmler, kronik yara enfeksiyonları, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları ve diş plağı gibi çeşitli hastalıkların oluşumunda aktif rol üstlenirler. Biyofilm yapısına sahip bakteriler, hastane ortamında ve tıbbi cihazların yüzeylerinde kolonize olarak, enfeksiyon riskini önemli ölçüde artırır ve tedavi sürecini zorlaştırır. Endüstriyel uygulamalarda ise biyofilmler, özellikle su boruları, ısıtma sistemleri ve gıda işleme kontaminasyona yol açarak ciddi ekonomik sorunlara neden olur. Bu nedenle, biyofilmlerin endüstriyel sistemler üzerindeki etkileri de araştırmalarda önemli bir etken oluşturmaktadır (Gıda et al. 2021b; Kiliç et al. 2021).

Biyofilm oluşumu süreci incelendiğinde, mikroorganizmaların yalnızca bireysel olarak yaşama eğiliminde olmadıkları, aynı zamanda koloniler halinde yaşayarak çevresel stres faktörlerine karşı direnç geliştirdikleri gözlemlenmektedir. Biyofilm yapısında yer alan mikroorganizmalar, çeşitli sinyal molekülleri ile hücreler arası iletişim kurar ve bu iletişim, biyofilm içinde bir yapı oluşturur. Bu yapının işleyişinde "quorum sensing" adı verilen bir mekanizma rol oynar; bu mekanizma, mikroorganizmaların yoğunluğunu algılayarak davranışlarını buna göre ayarlamalarını sağlar. Bu organizasyon, biyofilm içindeki hücrelerin daha az oksijen ve besinle hayatlarına devam ettirmesine, kaynakları sınırlı dahi olsa daha etkin şekilde kullanılmasına ve biyofilmin çevresel streslere karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlar. Biyofilm içinde bulunan hücreler, antibiyotikler gibi zararlı maddelere karşı da daha dirençlidir, çünkü biyofilmin matriksi bu maddelerin hücrelere ulaşmasını engelleyebilir (Erkihun et al. 2024; Gıda et al. 2021a).

Biyofilmlerin tıbbi ve endüstriyel uygulamalardaki etkileri çok çeşitlidir. Örneğin, biyofilm yapısına sahip bakteriler, hastane enfeksiyonlarında tedaviye karşı dirençli olduğu için antibiyotik tedavilerini zorlaştırır. Endüstriyel sistemlerde ise biyofilmler, su arıtma sistemlerinde kirleticileri azaltmak için kullanılırken, aynı zamanda yüzeylerde kireçlenmeye ve tıkanıklıklara sebep olarak ekonomik zararlara yol açar. Bunun yanı sıra, biyofilmler gıda güvenliği açısından da önemli bir sorundur. Mikroorganizmaların gıda işleme yüzeylerinde kolonize olması, kontaminasyon riskini artırır ve gıda güvenliği önlemlerinin önemini ortaya çıkarır (Zhai and Yeo 2022).



Şekil 1.2. Biofilm Kullanım Alanları Şeması

Sonuç olarak, biyofilmler mikroorganizmaların çevresel koşullara adaptasyon sağlama ve dayanıklılık geliştirme stratejilerinden biridir. Hem insan sağlığı hem de endüstriyel süreçler açısından biyofilmler, mikroorganizmaların yaşam döngüsünde ve çevresel uyum mekanizmalarında kritik bir öneme sahiptir. Bu yapıların oluşumu ve organizasyonu mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve malzeme bilimi gibi alanlarda yapılan çalışmalarla daha iyi açığa çıkmayı amaçlamıştır. Biyofilm araştırmaları, bu yapıları anlamak ve kontrol etmek amacıyla yapılan bilimsel çalışmaların yanı sıra, gelecekteki teknolojik gelişmelere de ışık tutmaktadır.

1.2. Antimikrobiyal Nedir?

Antimikrobiyal terimi, mikroorganizmaların büyümesini engelleyen veya onları öldüren maddeleri tanımlamak için kullanılan geniş bir kavramdır. Bu terim, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi mikroorganizmalara karşı etkinlik gösteren kimyasal bileşikler ve fiziksel yöntemleri ifade eder. Antimikrobiyaller; ilaçlar, dezenfektanlar, antiseptikler ve diğer biyositik ajanları içerir. Bu maddeler hem insan sağlığı hem de tarım, gıda endüstrisi ve çeşitli sanayi kollarında büyük bir öneme sahiptir. Mikroorganizmaların, özellikle hastalık yapan türlerinin kontrol altına alınması ve

1. GİRİŞ

yayılmalarının engellenmesi, antimikrobiyal maddeler aracılığıyla sağlanır. Antimikrobiyal maddeler, doğrudan mikroorganizmalara etki eden özelliklere sahip olduklarından, çoğu zaman mikroorganizmaların hücre duvarı, zar yapıları, proteinler ve genetik materyalleri gibi hayati bileşenlerini hedef alırlar. Örneğin, antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılırken, antifungal ajanlar mantarların neden olduğu enfeksiyonlara karşı etkilidir. Antiviral ilaçlar ise virüslerin çoğalmasını engelleyerek viral enfeksiyonları kontrol altına almaya çalışır. Parazitlere karşı kullanılan antiparazitik ajanlar da aynı şekilde bu geniş antimikrobiyal sınıfın içinde yer alır. Her antimikrobiyal türü, belirli bir mikroorganizma grubu üzerinde etkili olacak şekilde geliştirilmiştir ve etki mekanizmaları birbirinden farklılık gösterir(Ergin et al. n.d.)



Şekil 1.3. Antimikrobiyallerin Etki Ettiği Organizmalar

1.3. Antimikrobiyal Bileşiklerinin Çeşitleri ve Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyallerin etkinliklerine göre çeşitli kategorilere ayrılırlar. Genel olarak etki ettiği canlılara göre antibiyotikler, antifungaller, antiviraller ve antiparazitikler olarak

1. GİRİŞ

gruplandırılırlar. Antibiyotikler, bakterilere karşı kullanılan en bilinen antimikrobiyal türüdür ve bakteriyel hücre duvarı sentezini, protein sentezini veya DNA replikasyonunu hedef alarak bakterilerin çoğalmasını engeller ya da onları yok eder. Antifungal ajanlar ise mantar hücrelerinin zar yapısını bozar veya hücre fonksiyonlarını durdurarak etkili ederler. Antiviral ilaçlar ise virüslerin hücre içine girmesini veya çoğalmasını önleyerek etki gösterir. Bu özellikleri ile her bir antimikrobiyal bileşik, spesifik bir enfeksiyon türüne karşı tasarlanmış ve geliştirilmiştir.

Antimikrobiyal ajanların etkinlik düzeyleri, "bakteriyostatik" ve "bakterisidal" gibi terimlerle ifade edilir. Bakteriyostatik ajanlar, mikroorganizmaların büyümesini durdururken onları doğrudan öldürmez. Bu ajanlar mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyerek vücudun bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır. Bakterisidal ajanlar ise mikroorganizmaları doğrudan öldüren bileşenlerdir. Bu farklı etki mekanizmaları, antimikrobiyallerin kullanım amacına göre tercih edilmesini sağlar (Ergin et al. n.d.)

1.2.2. Antimikrobiyallerin Bileşiklerinin Kullanım Alanları

Antimikrobiyal bileşiklerin en yaygın kullanım alanı sağlık sektörüdür. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bu maddeler, modern tıbbın temel taşlarını oluşturur. Hastane ortamlarında sterilizasyon, dezenfeksiyon ve yara bakımı gibi süreçlerde antimikrobiyal maddeler önemli rol oynar. Tıbbi cihazların ve cerrahi ekipmanların sterilizasyonunda kullanılan antimikrobiyaller, hastane enfeksiyonlarını önlemede kritik bir öneme sahiptir. Aynı şekilde, el dezenfektanları ve antiseptik solüsyonlar, bireysel hijyen ve toplumsal sağlık açısından da önemli bir etkisi bulunmaktadır. Antimikrobiyallerin endüstriyel alanda da geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Örneğin, gıda endüstrisinde, mikroorganizma kaynaklı bozulmayı önlemek ve gıda güvenliğini sağlamak için bu ajanlar kullanılır. Su arıtma sistemlerinde, mikroorganizmaların sudaki çoğalmasını engellemek amacıyla çeşitli antimikrobiyal kimyasallar kullanılır. Tarım sektöründe ise hem bitkilerde oluşabilecek hastalıkları önlemek hem de hayvan sağlığını korumak için antimikrobiyallerden faydalanılır.(Akar1 et al. n.d.; Ergin et al. n.d.; Kayış n.d.)

Antimikrobiyal bileşikler, tarımsal üretimde bitki hastalıklarının kontrol altına alınması, toprak sağlığının korunması ve hasat sonrası meydana gelebilecek kayıpların en aza indirgenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Tarımsal hastalıklarla mücadelede yaygın olarak kullanılan sentetik antimikrobiyaller (fungisitler, bakterisitler ve virüsisitler), bitkileri patojen mikroorganizmalardan koruyarak verimliliği artırsa da uzun vadede çevresel kirliliğe, biyolojik dengenin bozulmasına ve dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, doğal antimikrobiyal bileşiklere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Uçucu yağlar, bitki özütleri ve mikrobiyal antagonistler gibi biyolojik ajanlar, sürdürülebilir tarım uygulamalarında sentetik bileşiklere alternatif olarak değerlendirilmektedir (Basu et al. 2021; Li et al. 2024). Doğal antimikrobiyaller, tarımsal hastalık yönetiminde hem çevre dostu hem de etkili çözümler sunmaktadır. Bu bileşikler, bitki yüzeyinde koruyucu bir bariyer oluşturarak patojenlerin bitkiye girişini engellemekte ve aynı zamanda bitkinin doğal savunma mekanizmalarını aktive etmektedir. Ayrıca, antimikrobiyaller ve biyofilm inhibitörleri gibi yaklaşımlar, hasat sonrası oluşan dönemde meyve ve sebzelerin mikrobiyal kontaminasyonunu önleyerek raf ömrünü ve gıda güvenliğini artırırlar.

Doğal antimikrobiyal bileşiklerin tarımsal üretimde kullanımı hem çevresel etkileri azaltmakta hem de dirençli patojenlerin yayılmasını engelleyerek uzun vadede verimliliği desteklemektedir. Biyofilmler, tarım alanında faydalı mikroorganizmaların (PGPB: Bitki Büyümeyi Teşvik Eden Bakteriler) çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyon geliştirmesini sağlayan kritik bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Basu et al. 2021). Kuraklık, tuzluluk, ağır metal kirliliği ve ekstrem sıcaklıklar gibi olumsuz koşullarda biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, bitki köklerine kolonize olarak toprak yapısını iyileştirmekte, besin elementlerinin döngüsünü optimize etmekte ve kök bölgesinde koruyucu bir çevre oluşturmaktadır. Biyofilmler, bakterilerin bitki köklerine tutunmasını kolaylaştırarak bitkilerin su ve besin alım kapasitesini artırmaktadır. Ayrıca, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ikincil metabolitler, bitkilerin stres koşullarına dayanıklılığını artırarak tarımsal üretimin sürdürülebilirliğine katkı sağlamaktadır. Ek olarak, biyofilm tabakaları, toprakta bulunan toksik bileşenlerin bitki tarafından emilimini azaltarak, ağır metal ve patojenik mikroorganizmaların olumsuz etkilerini minimize etmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, biyofilm bazlı tarımsal uygulamaların, kimyasal girdilere duyulan ihtiyacı azaltarak ekosistem dengesinin

korunmasına katkı sağlayabileceğini göstermektedir.(Zhang et al. 2024) Bu doğrultuda, biyoteknolojik gelişmeler ve mikrobiyal yönetim stratejileri, biyofilm oluşturan mikroorganizmaların tarımsal verimliliği artırmak amacıyla daha etkin şekilde kullanılabilmesini sağlayacak potansiyele sahiptir. Antimikrobiyal bileşiklerin tarımsal üretimde etkin kullanımı, hastalık yönetimini geliştirirken aynı zamanda sürdürülebilirlik hedeflerine de katkı sunmaktadır. Sentetik antimikrobiyallerin olumsuz çevresel etkileri dikkate alındığında, doğal alternatiflerin ve biyofilm oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, tarımsal sistemlerin dayanıklılığını artırmak adına büyük bir potansiyel taşımaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu bileşiklerin ve biyofilm bazlı uygulamaların tarımda daha yaygın ve etkin bir şekilde kullanılmasına yönelik stratejiler geliştirmeyi amaçlamalıdır (Ansari and Ahmad 2023; Li et al. 2024; Zhang et al. 2024)

1.3. Antimikrobiyal Direnç Sorunu

Antimikrobiyallerin yaygın ve yanlış kullanımı, mikroorganizmaların bu ajanlara karşı direnç geliştirmesine sebep olur. Antimikrobiyal direnci, mikroorganizmaların, kendilerini öldürmeye veya büyümelerini engellemeye yönelik bu maddelere karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanır. Direnç geliştiren mikroorganizmalar, antimikrobiyal tedavilere yanıt vermez hale gelir ve tedavi süreçleri daha karmaşıktır. Antimikrobiyal direncin en yaygın görüldüğü alanlardan biri antibiyotik kullanımıdır. Gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımı, bakterilerin direnç geliştirmesine neden olur ve bu durum dünya genelinde halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu soruna çözüm olarak antimikrobiyal bileşik kullanımının sınırlandırılması ve yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfi teşvik edilmelidir. Antimikrobiyal direncin gelişimi, antimikrobiyal ajanların etkili olduğu bakterileri öldürüp, dirençli bakterilerin hayatta kalmasına yol açarak gerçekleşir. Bu direnç, genetik değişimlerle nesiller boyunca aktarılır ve daha dirençli bakteri popülasyonlarının ortaya çıkmasına sebep olur. Antimikrobiyal direnç sorununu çözmek amacıyla, akılcı antimikrobiyal kullanımı, direnç izleme programları ve yeni antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesi üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir (Ergin et al. n.d.; Kayış n.d.)

Sonuç olarak antimikrobiyaller, mikroorganizmalarla mücadelede etkili olan temel ajanlar olarak tıp, endüstri ve tarım gibi pek çok alanda önemli bir yere sahiptir. Bu

maddeler, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları kontrol altına almak ve yayılmalarını engellemek amacıyla kullanılır. Ancak, antimikrobiyal direncin artması, bu ajanların etkinliğini tehdit etmekte ve daha dikkatli, bilinçli bir kullanım gerektirmektedir. Antimikrobiyal direncin azaltılması, toplum sağlığını koruma açısından büyük önem taşır ve yeni antimikrobiyal stratejilerinden olan antimikrobiyal peptitlerin (AMP) önemini artırmaktadır.

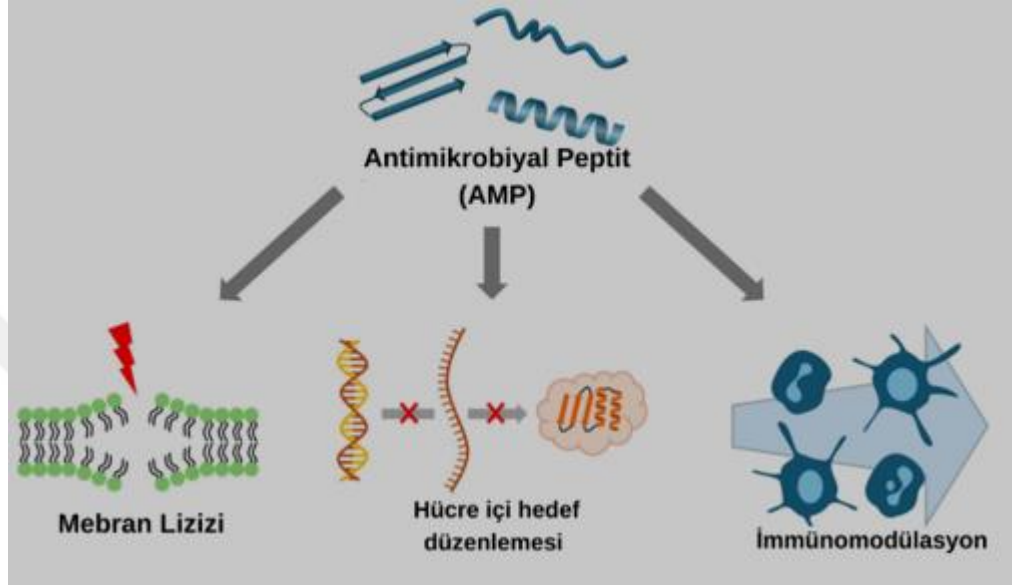
1.4. Antimikrobiyal Peptitler

Antibiyotikler bilim dünyasında önemli bir dönüm noktası olmuştur. Antimikrobiyal peptitler (AMP) ise antibiyotiklerden daha önce keşfedilmiş olup antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle gölgede kalmış olan moleküllerdir. İlk AMP Alexander Fleming tarafından 1922 yılında keşfedilen lizozimdir. Daha sonra 1939 yılında, Dubos'un *Bacillus* suşundan elde ettiği antimikrobiyal bir peptidin keşfi ile başlamıştır. Daha sonra 1940'lı yıllara gelindiğinde bakterilerin ürettiği başka bir AMP olan ve hem Gram negatiflere hem de Gram pozitif bakterilere etkili olan tirotrisin izole edilmiştir. Ancak, AMP'lerin biyolojik önemi 1956'lı yılında tavşan lökositlerinden izole edilen defensinler elde edilmiş ve doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarındaki kritik yolların da keşfi başlamıştır.(Bahar and Ren 2013; Özdemir 2023) Bugüne kadar yapılan çalışmalar neticesinden 5.000'den fazla AMP keşfedildi ve her geçen gün sayısında artış göstermektedir. Doğal olarak elde edilen AMP'ler hem ökaryotik canlılarda (protozoan, mantarlar, bitkiler, böcekler ve hayvanlar gibi) hem de prokaryotlarda (bakteriler vs.) bulunabilirler. Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), canlı organizmalarda doğal olarak bulunan ve bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olarak görev yapan küçük protein molekülleridir. Genellikle 10 ila 150 amino asit uzunluğunda olup(G. Wang 2014), bakterilere, mantarlara ve virüslere gibi pek çok organizmaya karşı etkili olurlar. Son yıllarda, antibiyotik direncinin giderek artmasıyla birlikte yeni yöntemlerin üzerinde durulmuş ve AMP'ler, yeni nesil antimikrobiyal ajanlar olarak ön plana çıkmıştır (Bahar and Ren 2013; Luo and Song 2021a)

Bu peptitler, pozitif yüklü ve hidrofobik özelliklere sahip olmaları sayesinde mikroorganizmaların hücre zarlarıyla doğrudan etkileşime girerek membran bütünlüğünü bozar ve hücre ölümüne neden olur. Bunun yanı sıra, bazı AMP'ler hücre içi

1. GİRİŞ

metabolizmayı hedef alarak DNA, RNA ve protein sentezini engelleyebilir. Antimikrobiyal etki mekanizmaları açısından oldukça geniş bir yelpazeye sahip olan AMP'ler, çeşitli yapısal formlarda bulunabilir. Örneğin, bazıları α -heliks yapısında, bazıları ise β -tabaka formunda olabilir. Yapıları, onların biyolojik aktivitesini belirleyen en önemli faktörlerden biridir (Westerhoff et al. 1989)



Şekil 1.4. AMP'lerin Hedef Gösterimleri

AMP'lerin tıbbi kullanımı giderek daha fazla ilgi görmektedir. Antibiyotiklerin yetersiz kaldığı dirençli patojenlere karşı etkili olmaları, onları yeni tedavi yaklaşımlarında umut verici hale getirmektedir. Özellikle yara iyileşmesini hızlandırmaları, biyofilm oluşumunu engellemeleri ve immün yanıtı modüle edebilmeleri sayesinde enfeksiyon kontrolünde önemli bir rol oynayabilirler. Bununla birlikte, AMP'lerin klinik uygulamalarında bazı zorluklar da bulunmaktadır. Yüksek üretim maliyetleri, biyolojik ortamlarda hızla parçalanabilmeleri ve bazı durumlarda insan hücrelerine toksik etkiler gösterebilmeleri gibi faktörler, geniş çapta kullanımlarını sınırlayan etmenler arasındadır (Akün et al. 2021; ERDOĞAN 2020)

Gelecekte yapılacak çalışmalar, AMP'lerin daha stabil ve güvenli hale getirilmesi yönünde ilerlemektedir. Nanoteknoloji ve genetik mühendislik gibi alanlardaki gelişmeler, bu peptitlerin terapötik potansiyelini artırarak klinik kullanımlarını yaygınlaştırabilir. Antibiyotik direncinin küresel sağlık sorunlarından biri haline geldiği

1. GİRİŞ

günümüzde, antimikrobiyal peptitler, yeni nesil enfeksiyon tedavilerinde önemli bir yer tutacak gibi görünmektedir.

1.5. Antibiyofilm Peptitler

Bakteriyel biyofilmler, mikroorganizmaların kendilerini olumsuz çevresel koşullardan koruyarak belirli bir yüzeye tutundukları, karmaşık yapılardır. Bu yapılar, bakteriler tarafından sentezlenen hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile desteklenen bir matriks içinde bulunur. Biyofilmler, bakterilere antibiyotikler, dezenfektanlar ve konağın bağışıklık sistemine karşı direnç kazanma avantajı sağlar. Sağlık, endüstri ve tarım alanlarında ciddi sorunlara yol açan biyofilmlerin kontrol altına alınması, özellikle artan antibiyotik direnci nedeniyle giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Son yıllarda, biyofilm oluşumunu engelleme veya var olan biyofilmleri boşaltma potansiyeline sahip antibiyofilm peptitler (ABP'ler) önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.(Di Somma et al. 2020) Antibiyofilm peptitler, doğal kaynaklardan elde edilen veya sentetik olarak tasarlanan kısa amino asit dizilerinden oluşmaktadır. Bu peptitler, biyofilm oluşumu süreçlerini bozarak veya mevcut biyofilmleri parçalayarak etkili olur (Luo and Song 2021b, 2021c)

Antibiyofilm peptitler, antibiyotik direncinin artış gösterdiği günümüzde, biyofilm kaynaklı sorunlara karşı umut vadeden bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Tarımsal üretimde antibiyofilm peptitlerin kullanımı hem çevre dostu hem de sürdürülebilir tarım uygulamalarını destekleyebilir. Gelecekte, daha stabil ve etkili peptitlerin keşfi ve optimizasyonu ile tarımsal hastalık yönetiminde önemli ilerlemeler sağlanması beklenmektedir (Luo and Song 2021c)

1.6. Biyoinformatik Olarak Antimikrobiyal Peptit Dizaynı

Antimikrobiyal peptitler (AMP) ve antimikrobiyal biyoaktif peptitler (ABP), doğal kaynaklardan elde edilebilen moleküller olup geleneksel yöntemlerle tarama, izolasyon ve pürifikasyon süreçlerinden geçirilerek üretilmektedir. Ancak bu süreçler hem zaman alıcı hem de maliyet açısından dezavantajlıdır. Ayrıca, doğal kaynaklardan yeterli miktarda AMP ve ABP üretimi her zaman mümkün olmayabilir (Torres et al.

2019). Bu nedenle, rekombinant üretim yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Doğal AMP'lerin klinik uygulamalara aktarılmasını zorlaştıran çeşitli sorunlar bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri, bazı AMP'lerin hemolitik ve sitotoksik özellikler göstermesi, proteazlara duyarlı olmaları ve yüksek tuz konsantrasyonlarında biyolojik aktivitelerini kaybetmeleridir (Torres et al. 2018). Bu sorunları gidermek amacıyla AMP'lerin çeşitli modifikasyonlarla optimize edilmesi gerekmektedir.

AMP dizaynı için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında, doğal AMP'lerin şablon olarak kullanılması, dizideki aminoasit pozisyonlarının değiştirilmesi, AMP motiflerinin hibritizasyonu, rastgele kombinasyonlarla yapılan rasyonel tasarım (de novo) ve biyoinformatik yaklaşımlar yer almaktadır (Mishra and Wang 2012).

Doğal AMP'lerin dizaynında çeşitli modifikasyonlar uygulanabilir. Bunlar arasında aminoasit dizilimlerinde delesyon, insersiyon veya yer değiştirme gibi değişiklikler bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, AMP'lerin proteazlardan korunmasını sağlamak amacıyla terminal uçlara ek modifikasyonlar yapılabilmektedir. Doğal AMP'lerden türetilen yeni dizaynlar oluşturulurken, şablon olarak kullanılan molekülün aminoasit bileşimi, net yükü ve hidrofobisite özellikleri dikkate alınmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde daha küçük peptitler elde edilerek üretim maliyetleri düşürülebilmektedir. Örneğin, LL-37 katolisidinin türevlerinden biri olan OP-145'in, plazma proteazlarına karşı stabilitesinin artırıldığı rapor edilmiştir (Ming and Huang 2017). Benzer şekilde, DRGN-1 peptidinde N-terminaldeki serin aminoasidi prolin ile değiştirilerek proteolitik yıkıma karşı daha dirençli hale getirilmiştir (Chen et al. 2020). Aynı stratejiyle geliştirilen 1018 türevlerinde ise agregasyonun önüne geçilmeye çalışılmıştır (Mansour, De La Fuente-Núñez, and Hancock 2015). Lizin, prolin, sistein ve izolösin gibi aminoasitlerin dizilere eklenmesi, bağlanma kapasitesini artırarak antimikrobiyal aktiviteyi güçlendirmektedir. Ek olarak, N-terminal uçlarına glisin eklenmesi, aminopeptidazlara karşı direnç sağlarken, C-terminal uçlarının aminasyonu karboksipeptidazlara karşı stabiliteyi artırmaktadır. Bunun yanı sıra, proteolitik yıkımı engellemek için laktam ve disülfid köprüleri oluşturulabilmektedir (Torres et al. 2018).

ABP dizaynında hibrit peptit üretimi önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Sitotoksik etkileri azaltmak ve antibiyofilm aktivitesini artırmak amacıyla farklı peptitlerin fonksiyonel bölgeleri birleştirilerek hibrit peptitler tasarlanabilmektedir. Rasyonel tasarım sürecinde ise rastgele aminoasit kombinasyonları kullanılarak yeni peptitler oluşturulmaktadır. Ancak bu yöntemde, peptitlerin doğal evrimsel seçim mekanizmalarından geçmemesi nedeniyle özgünlük eksikliği ve potansiyel toksisite riskleri bulunabilmektedir (Torres et al. 2018, 2019).

Günümüzde, bazı araştırma grupları tarafından geliştirilmiş çeşitli AMP veri tabanları bulunmaktadır. Bu veri tabanları sayesinde AMP tasarımı yapılabilmekte ve biyoinformatik analizlerle optimize edilebilmektedir. Bu veri tabanlarında basit istatistiksel modelleme, yapay zekâ ve makine öğrenimi gibi biyoinformatik araçlar kullanılmaktadır. Ancak, bilgisayar tabanlı yaklaşımlar yalnızca dizayn edilen AMP'lerin potansiyel özelliklerini tahmin etmekte olup, etki mekanizmaları hakkında doğrudan bilgi sağlamamaktadır. Bu nedenle, AMP-membran etkileşimlerini ve por yapısı oluşturma potansiyellerini analiz etmek için moleküler dinamik simülasyonları gibi ileri seviye teknikler de kullanılmaktadır. Özellikle, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) modeli, MRSA gibi dirençli bakterilere karşı etkili yeni peptit türevlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır (Menousek et al. 2012; Mishra and Wang 2012).

AMP dizaynında kullanılan bir diğer biyoinformatik yaklaşım ise veri tabanı filtreleme teknolojisidir. Bu yöntemde, hedeflenen mikroorganizmaya karşı etkili olan AMP'ler veri tabanlarından seçilerek ortak özellikleri belirlenir ve bu özelliklere uygun yeni peptitler tasarlanır. Bu yöntemle, anti-MRSA etkili DFTamP1 adlı peptidin dizayn edildiği bildirilmiştir (Mishra and Wang 2012). AMP tasarımı en önemli hususlardan biri, peptitlerin yalnızca mikroorganizmalara karşı etkili olup insan hücrelerine zarar vermemesidir. Doğal AMP'lerin çoğu bağışıklık sistemi elemanlarından veya toksinlerden türetildiğinden, doğal olarak sitotoksik özellikler gösterebilmektedir. Ayrıca, bazı AMP'ler yalnızca sınırlı sayıda mikroorganizmaya karşı etkili olabilmektedir. Bu nedenle, bakterilere özgü etki gösterecek şekilde AMP tasarımı yapılması ve ökaryotik hücrelerle etkileşimi sınırlayan amfipatik yapılar kullanılması gerekmektedir.

1. GİRİŞ

Biyoinformatik tabanlı AMP dizaynı, geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve verimli bir şekilde yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, bu süreçte biyolojik etkinliğin ve güvenliğin deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir. Gelecekte, yapay zekâ ve makine öğrenimi gibi teknolojilerin ilerlemesiyle birlikte AMP dizaynının daha hassas ve etkili hale gelmesi beklenmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı Antimikrobiyal ve Biyolojik Aktif Peptitlerin Listelendiği Veritabanları ve Tahmin Araçları

Veritabanı Adı	Web Sitesi	Referans
DBAASP (Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides)	https://dbaasp.org/home	(Pirtskhalava et al. 2021)
CAMP (Collection of antimicrobial peptides)	http://www.camp.bicnirrh.res.in/	Waghu ve Thomas 2019
DRAMP 2.0 (Data Repository of Antimicrobial Peptides)	http://dramp.cpu-bioinfor.org/	(Kang et al. 2019)
APD (Antimicrobial Peptide Database)	https://wangapd3.com/main.php	(G. Wang, Li, and Wang 2016)
dPABBs (design Peptides Against Bacterial Biofilms)	http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibiofilm/	(Sharma et al. 2016)
BaAMPs (Biofilm-active AMPs database)	http://www.baamps.it/	(Di Luca et al. 2015)
YADAMP (yet another database of antimicrobial peptides)	http://yadamp.unisa.it/default.aspx	(Piotto et al. 2012)
BACTIBASE (A data repository of bacteriocins)	http://bactibase.hammamilab.org/main.php	(Hammami et al. 2010)

1.7. Veri Tabanlı Filtreleme Teknolojileri

1.7.1. Antimikrobiyal Peptit Veritabanlarının Gelişimi ve Filtreleme Teknolojileri

AMP'lerin keşfi ve karakterizasyonu, kapsamlı ve güncel veritabanlarının oluşturulmasını gerektirmiştir. 2003 yılında Wang laboratuvarı tarafından kurulan Antimikrobiyal Peptit Veritabanı (APD), AMP araştırmaları için önemli bir kaynak olmuştur. Başlangıçta 525 antimikrobiyal peptit içeren APD'de 498 adet bakteriyel, 155'i mantarlar, 28'i virüsler ve geri kalan 18'i de kanser hücreleri üzerinde etkilidir (Z. Wang and Wang 2004) (G. Wang 2023a). APD'nin gelişimi, AMP'lerin sınıflandırılması, arama fonksiyonları, post-translasyonel modifikasyonlar, bağlanma hedefleri ve etki mekanizmaları gibi birçok özelliğin eklenmesiyle devam etmiştir. Bu gelişmeler,

1. GİRİŞ

araştırmacıların spesifik peptitleri daha etkili bir şekilde bulmalarına ve analiz etmelerine olanak tanımıştır (G. Wang 2023a; Z. Wang and Wang 2004).

Veritabanlarının etkinliği, kullanılan filtreleme teknolojileriyle yakından ilişkilidir. Gelişmiş filtreleme teknikleri, büyük veri kümelerinden istenilen bilgilerin hızlı ve doğru bir şekilde elde edilmesini sağlar. Özellikle, AMP'lerin antibakteriyel aktivitesi, toksisitesi ve tuz toleransı gibi özelliklerine göre belirlenmesini sağlarken peptit tasarımı için de yeni bilgiler sunmuştur. Bu tür filtreleme yaklaşımları, araştırmacıların belirli kriterlere göre peptitleri seçmelerine ve analiz etmelerine yardımcı olur (G. Wang 2023b).

Sonuç olarak, antimikrobiyal peptit veritabanlarının gelişimi ve bu veritabanlarında kullanılan gelişmiş filtreleme teknolojileri, AMP araştırmalarının ilerlemesine büyük katkı sağlamıştır. Bu teknolojiler, araştırmacıların daha spesifik ve etkili peptitler tasarlamalarına olanak tanıyarak, yeni antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır (Ripperda et al. 2022; G. Wang et al. 2022).

Günümüzde biyoinformatik veri analizleri, mikrobiyoloji alanında önemli bir yer tutmaktadır. Mikrobiyal genomların incelenmesi, antibiyotik direnci mekanizmalarının belirlenmesi ve çevresel mikroorganizmaların sınıflandırılması gibi alanlarda büyük önem arz etmektedir. Bu süreçte, veri tabanlı filtreleme teknolojisi, büyük veri kümeleri içindeki anlamlı bilgilerin ayrıştırılmasını sağlayarak araştırmacılara daha verimli analiz yapma imkânı sunmaktadır. Veri tabanlı filtreleme teknolojisi, geniş alandaki verinin belirli kriterlere göre ayrılması ve yalnızca istenilen ölçekte analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir.

1.8. ToAP2

ToAP2, Tityus Obscurus akrep türünden elde edilen bir antimikrobiyal peptittir ve antibiyotik direncine karşı alternatif bir ajan olarak dikkat çekmektedir. İlk olarak mantarlara karşı etkisiyle tanımlanan ToAP2'nin, ilerleyen yıllarda bakterilere, özellikle çoklu ilaç dirençli türlere karşı da güçlü bir inhibitör etki gösterdiği ortaya konulmuştur. ToAP2'nin modifikasyonları, stabiliteyi artırarak ve toksisiteyi azaltarak daha etkili

1. GİRİŞ

türevler geliştirilmesini sağlamıştır (Lata et al. 2024; Marques-Neto et al. 2018a; do Nascimento Dias et al. 2024).

Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, ToAP2 ve türevlerinin *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *Mycobacterium massiliense* gibi dirençli bakterilere ve *Candida* türleri gibi mantarlara karşı etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, biyofilm oluşumunu inhibe ederek enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, ToAP2'nin flukonazol ile kombinasyonunun sinerjik etki gösterdiğini ve bakteriyel membranları hedef alarak antibakteriyel etkisini artırdığını göstermiştir (Lata et al. 2024; do Nascimento Dias et al. 2020).

ToAP2'nin klinik kullanıma geçebilmesi için toksisite ve stabilite üzerine daha fazla araştırma gerekmektedir. Ancak mevcut veriler, bu peptidin antibiyotik direncine karşı geliştirilebilecek yeni nesil antimikrobiyal ajanlar arasında umut vadettiğini göstermektedir.

1.9. Tezin amacı

Bu tez çalışmasının amacı, veri tabanı filtreleme teknolojisi kullanılarak dizayn edilen ToAP2 türevi (LI-15) bileşiğinin, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğini ve biyolojik etkilerini kapsamlı bir şekilde araştırmaktır. Çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) türleri üzerinde mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri belirlenerek LI-15'in antimikrobiyal potansiyeli değerlendirilecektir. Ayrıca, öldürme kinetiği analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi ve kristal viole testi ile bileşiğin etki mekanizmasına dair daha kapsamlı veriler elde edilmesi hedeflenmektedir. LI-15'in sitotoksosite profili, HDFa (Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult) insan fibroblast hücre hattında MTT ve LDH testleri kullanılarak belirlenecektir.

Bu çalışma, yeni antimikrobiyal ajanların keşfine bilimsel katkı sağlamayı, patojenlere karşı etkili alternatif biyomoleküllerin geliştirilmesine yönelik veri sunmayı

1. GİRİŞ

ve veri tabanı filtreleme teknolojisinin hedefe yönelik molekül tasarımındaki etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 ToAP2'nin Keşfi ve Tarihsel Gelişimi

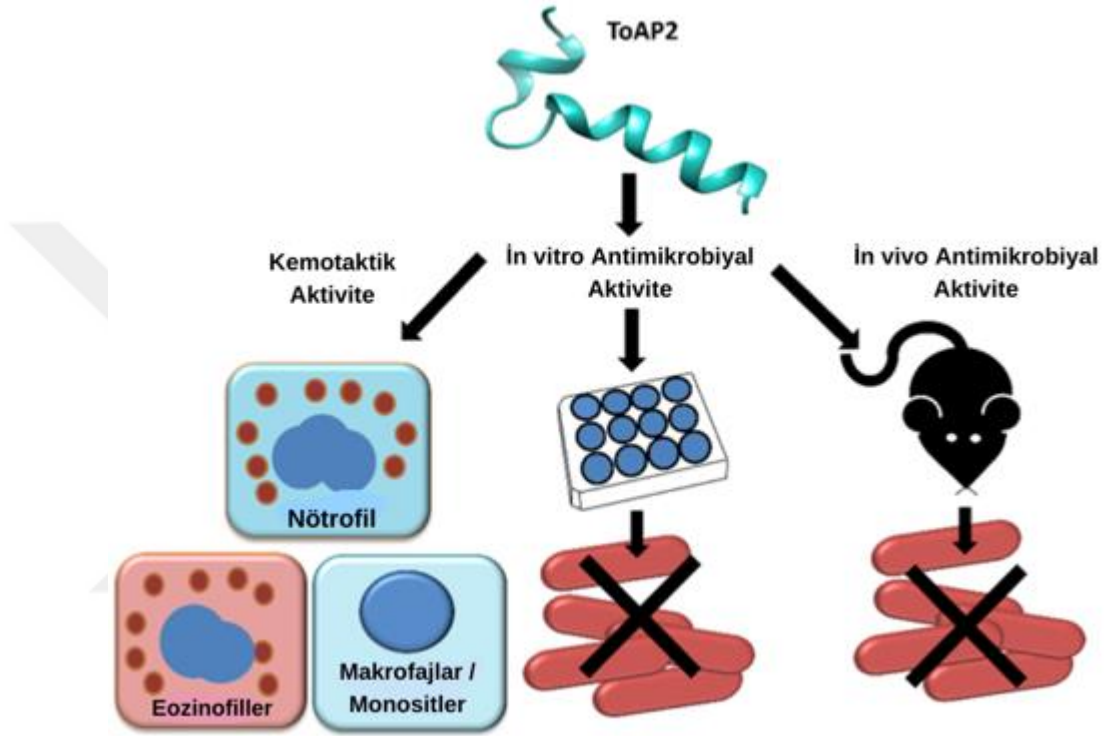
AMP'ler, doğal savunma mekanizmalarının kritik bileşenleri olarak, patojenlere karşı etkin biyolojik aktivite gösteren molekülerdir. Son yıllarda, artan antibiyotik direnci nedeniyle AMP'ler, alternatif antimikrobiyal ajanlar olarak yoğun şekilde araştırılmaktadır. Bu bağlamda, ToAP2 peptidi önemli bir biyoaktif molekül olarak öne çıkmaktadır. ToAP2, Tityus Obscurus akrep türünden elde edilen bir antimikrobiyal peptittir. İlk olarak 2010'lu yıllarda tanımlanan bu peptit, başlangıçta *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* gibi mantarlara karşı etkinliği ile dikkat çekmiştir. 2016 yılında yapılan çalışmalar, ToAP2'nin bakterilere karşı da güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Marques-Neto et al. 2018b).

2018 yılında, ToAP2'nin *Mycobacterium massiliense* gibi çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı etkili olduğu in vitro ve in vivo deneylerle gösterilmiştir. Bu çalışmada ToAP2'nin etkinliğini araştırmak için farelere verilen bakteri suşlarına belirli aralıklarla ToAP2 peptidi verilerek tedavi edilmiştir (Marques-Neto et al. 2018b; do Nascimento Dias et al. 2020).

2020'de, *Candida* türlerine karşı etkinliği daha detaylı analiz edilmiş ve biofilm oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. 2021 yılına gelindiğinde ise, ToAP2'den türetilen ToAP2D peptidinin mantar türü *Sporothrix globosa* 'ya karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bu türev, geliştirilmiş stabilite ve daha düşük toksisiteye sahip olup, fare modellerinde sporotrikoz enfeksiyonunu inhibe etmede neredeyse itrakonazol kadar etkili bulunmuştur (Yan et al. 2021).



Şekil 2.1 ToAP2 Peptidi 3 Boyutlu Yapısı (uniprot’tan alınmıştır)



Şekil 2.2. Grafiksel Özet (Marques-Neto et al. 2018a)

Antimikrobiyal dirençli patojenlerle mücadelede yeni biyoterapötik ajanların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Lata ve arkadaşları (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ToAP2 türevi kısa antimikrobiyal peptitlerin tasarımı ve ESKAPE patojenlerine karşı etkinliği incelenmiştir. 15 amino asitlik peptit sentezlenmiş ve mikrodilüsyon, sitotoksikite, öldürme kinetiği, SEM analizi gibi yöntemlerle antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. FKL15 ve SKL15 peptitleri, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde güçlü antibakteriyel etki gösterirken, sitotoksik etki oluşturmadan bakteriyel membranları parçalamıştır. Sonuçlar, kısa kriptik antimikrobiyal peptitlerin ilaç geliştirme sürecinde umut vadettiğini göstermektedir (Lata et al. 2024).

Bir diğer çalışmada Dias ve arkadaşları (2024), ToAP2 ve flukonazol kombinasyonunun *Candida albicans* biyofilmlerine karşı sinerjik etkisini araştırmıştır. Çalışmada, ToAP2'nin tek başına ve flukonazol ile birlikte uygulandığında *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumunu ve canlılığını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Scanning electron microscopy (SEM) ve atomic force microscopy (AFM) analizleri, kombinasyon tedavisinin biyofilm yapısında ciddi bozulmalara neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, ToAP2'nin flukonazol ile birlikte biyofilm enfeksiyonlarına karşı potansiyel bir tedavi ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (do Nascimento Dias et al. 2024).

Bu çalışmalar, ToAP2 türevlerinin bakteriyel ve fungal patojenlere karşı etkinliğini ortaya koyarak, yeni nesil antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için değerli veriler sunmaktadır.

2.2. Mikrobiyal Etkinlik ve Etki Mekanizması

ToAP2, bakteri, mantar ve mikobakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Etki mekanizmalarına bakıldığında çeşitli yollarla etki ettiği belirlenmiştir. Bunlardan biri membran geçirgenliğini artırarak patojen hücre duvarında bozulmalara neden olurken bir diğeri bağışıklık hücrelerini enfeksiyon bölgesine çeker, böylece doğal immün yanıtı destekler. Ve son olarak da biofilm oluşumunu inhibe eder, bu da özellikle mantar enfeksiyonlarında büyük avantaj sağlar. Bu etki mekanizmalarından ötürü ToAP2 peptidin antimikrobiyal ve antibiyofilm alanında çalışma perspektifine daha çok odaklanılmıştır (Marques-Neto et al. 2018b).

ToAP2, antibiyotik direnci geliştiren bakterilere karşı yeni bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilmiş ve bu durumda modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* ve *Pseudomonas aeruginosa (PAO1)* gibi dirençli bakterilere karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, son araştırmalar ile ToAP2'nin antifungal ve antiviral potansiyelini de ortaya konulmuştur. *Candida* türlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Marques-Neto et al. 2018b; do Nascimento Dias et al. 2020).

ToAP2, özellikle antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Bunlardan biri *Mycobacterium massiliense* 'ye karşı göstermiş olduğu antibiyotiklerle benzer gösterdiği etkidir. Bunu yanı sıra *Candida albicans* ve *Sporothrix globosa* gibi mantarlara karşı antifungal etki göstermektedir.

ToAP2'nin daha çok geliştirmek ve antimikrobyal olarak kullanılabilmesi için stabilite ve toksisite çalışmaları devam etmektedir. Yeni türevlerinin geliştirilmesi ve üzerinde yapılacak olan çalışmalar ile klinik uygulamaya geçiş sürecini hızlandırabilir. 2021'de yapılan modifikasyon çalışmaları, ToAP2'nin daha stabil, düşük toksisiteli ve daha etkili yeni versiyonlarını ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, ToAP2, 2010'lu yıllardan bu yana antibakteriyel ve antifungal özellikleri üzerinde geniş çaplı araştırmalar yapılan umut vadeden bir antimikrobiyal peptittir. Klinik uygulamalara geçebilmesi için daha fazla mikrobiyal ve toksisite çalışmalarına ihtiyaç duyulsa bile, antibiyotik direncine karşı önemli bir alternatif olma potansiyeline sahiptir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında (YÜTAM) bulunmaktadır. Cihazların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazların Adı ve Modelleri

Cihaz Adı	Model
+4 Soğutucu	VESTEL
-20 Soğutucu	PROFİLO
Çalkalamalı İnkübatör	Nükleon Incubator
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad PowePac Basic
Hassas Terazî	Weightlab Instrument WSA-224
Homojenizatör	Qiagen TissueLyser LT
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad ChemiDoc MP
Mikrobiyolojik Steril Kabin	Bio Safety Cabinet ClasII
Mini Santrifüj	Weightlab Instrument WN-CM15
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Otoklav	Hiramaya Hv 50-L
PCR Cihazı	Labcycler Sens Quest
Realtime PCR	Rotor-Gene Q
Statik İnkübasyon	Memmert
Spektrofotometre	BioTek Epoch
Taramalı elektron Mikroskobu	FEI Quanta 250
Vorteks	XH-C Vorteks

3.1.2. Sarf Malzemeler

Tez hazırlama sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich (USA) ve Merck A.S. (USA) firmalarından temin edilmiştir. Besiyerleri ise Oxoid A.S. (UK) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Bakteri suşları

Çizelge 3.2. Tezde Kullanılacak Patojen Suşlar ve Kodları

Bakteri ve Maya Suşları	Kodları
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923, ATCC 43300, 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 izolatlar (KP1, KP2)
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 220199
<i>C. tropicalis</i>	KUEN 1025

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları

3.1.4.1. Mueller-Hinton Agar (MHA)

MHA besiyeri, antimikrobiyal testlerde yaygın olarak kullanılan bir besiyeri türüdür. 36 g besiyeri, 1 L saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Sterilizasyonun ardından, besiyeri 50 °C’ye

kadar soğutulmuş ve 90 mm çapındaki petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.4.2. Mueller-Hinton Broth (MHB)

MHA besiyerinin agar içermeyen formu olan MHB, Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) belirleme gibi sıvı besiyeri kullanılması uygun olan testlerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Ticari formülasyondan 26,5 g MHB tartılarak 1 L distile su içerisinde çözülmüş ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.5. %0,1’lik Kristal Viyole Boyası

Kristal viole (CV) boyasından 0,05 g tartılarak 35 mL %99’luk etil alkol içerisinde çözülmüştür. Çözeltiye 15 mL saf su eklenmiş ve 24 saat karanlıkta inkübasyonun ardından 0,22 µm’lik filtre ile süzülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.6. %30’luk Asetik Asit

35 ml saf suyun üzerine %99,9’luk asetik asitten 15 ml yavaşça ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.1.7. Agaroz Jel Hazırlama

İzole edilen RNA’ların görselleştirilmesi amacıyla %1,5’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 1,5 g agaroz, 100 mL TBE tamponu içerisinde çözülmüş ve jel içerisine 2 µL etidyum bromür eklenmiştir.

3.1.8. Primerler

Çizelge 3.3. Kullanılacak Primerlerin İsimleri, Dizileri ve Referansları

	Genler	Primer Dizileri	Referanslar
<i>S. aureus</i>	<i>gyrB</i>	F: 5' ATCTGGTCGTGACTCTAGAA3' R: 5' TGTACCAAATGCTGTGATCA3'	(Bezar et al. 2019)
	<i>hla</i>	F: 5'GTACAGTTGCAACTACCTGA3' R: 5'CCGCCAATTTTCTGTATC3'	(Bezar et al. 2019)
	<i>agrA</i>	F: 5'ACGAGTCACAGTGAACCTAC3' R: 5'GACAACAATTGTAAGCGTGT3'	(Bezar et al. 2019)
	<i>blaZ</i>	F: 5'TGCTTTAAATACTAAAAGTGGTAAGG3' R: 5'AGCAACTATATCATCTTTGTTAATATG3'	(Alexander et al. 2020)
	<i>pbp2a</i>	F: 5'ACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAG3' R: 5'AATTTGAGCATTATAAAATGGATAATCAC3'	(Alexander et al. 2020)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>rpoD</i>	F: 5'CATCCGCATGATCAACGACA3' R: 5'GATCGATATAGCCGCTGAGG3'	Beaudoin et al. 2012
	<i>lasB</i>	F: 5'GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC3' R: 5'TTGGCGTCGACGAACACCTCG3'	(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'	Beatrice vd, 2004
	<i>oprI</i>	F: 5' AACAGCGGTGCCGTTGAC3' R: 5 GTCGGAGCTGTCGTAATCGAA3'	Beatrice vd, 2004
<i>C. albicans</i>	<i>gapdh</i>	F: 5'CGGTCCATCCCACAAGGA3' R: 5'AGTGGAAGATGGGATAATGTTACCA3'	(Nailis et al. 2006)
	<i>hwp1</i>	F: 5'CGGAATCTAGTGCTGTCGTCTCT3' R: 5'CGACACTTGAGTAATTGGCAGATG3'	(Samaranayake et al. 2013)
	<i>sap4</i>	F: 5'CGCTGGTGTCTCTTAGATTCTG3' R: 5'AGGCATAGATAATGCTACGAGCAA3'	(Samaranayake et al. 2013)
	<i>plb1</i>	F: 5'GGTGGAGAAGATGGCCAAA3' R: 5'AGCACTTACGTTACGATGCAACA3'	(Samaranayake et al. 2013)
	<i>ece1</i>	F: 5'GTCGTCAGATTGCCAGAAATTG3' R: 5'CTTGGCATTTTCGATGGATTGT3'	(Samaranayake et al. 2013)

3.2. Yöntem

3.2.1. Peptit sentezi ve karakterizasyonu

3.2.1.1. Peptit Sentezi

Biyoinformatik analizler doğrultusunda tasarlanan LI-15 peptidi, mikrodalga destekli katı faz peptit sentezi yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen peptit, liyofilizasyon işlemi uygulanarak saflaştırılmış ve ardından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC, C-18 kolonu) ile saflık derecesi >%90 olacak şekilde elde

edilmiştir. Peptidin karakterizasyonu ve sekonder yapısının belirlenmesi amacıyla FTIR ve CD spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır. (Peptitin sentezi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Hizmet alımının Nanore Biyoteknoloji Aş. (İstanbul) firmasından yapılmıştır. Ayrıca, sentez sonrası kontroller kütle spektroskopisi ve HPLC ile yapıp, bu analizlerin dataları sentez firması tarafından sağlanmıştır)

3.2.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

FTIR-ATR analizleri, Bruker VERTEX 70 V cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, 5 µg/mL konsantrasyonunda fosfat tamponu içerisinde çözölmüş LI-15 peptidi kullanılarak, 500-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında alınmıştır.

3.2.1.3. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi

CD spektroskopisi, peptitlerin sekonder yapılarını ve katlanma özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir (Greenfield, 2007). Analizler, hizmet alımı yoluyla Gebze Teknik Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. 5 µg/mL konsantrasyonunda, fosfat tamponu içerisinde çözölmüş LI-15 peptidi kullanılarak, 50 nm/dakika tarama hızıyla, 190-260 nm dalga boyu aralığında ve 25°C sıcaklıkta ölçümler alınmıştır. Elde edilen spektrumlar incelenerek peptidin sekonder yapısı belirlenmiştir. Bestsel algoritması kullanılarak analiz edildi.

3.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Testi

MIK değerin belirlenmesi amacıyla European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) protokolleri uygulanmıştır (<http://www.eucast.org/>). MIK, mikroorganizmanın gelişimini inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu değeri belirlemek için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada, 96'lık plaklar kullanılarak sıvı mikrodilüsyon testi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, test edilecek bakteriler *P. aeruginosa* ve *S.aureus* 0,5 McFarland standardına (yaklaşık 1,5 × 10⁸ CFU/ml) ayarlanmıştır. Ardından, her kuyucuğa 100 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Test bileşiği (ToAP2 türevi LI-15) seri dilüsyon yöntemi ile 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/ml konsantrasyonlarında

hazırlanarak kuyucuklara ilave edilmiştir. Son hacim 200 µl olacak şekilde tamamlanmıştır. 96'lık plaklar 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Deneyin kontrol grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

- **Negatif kontrol:** Yalnızca besiyeri içeren kuyucuk (mikroorganizma ve test bileşiği içermeyen).
- **Pozitif kontrol:** Mikroorganizma içeren, ancak test bileşiği eklenmemiş kuyucuk.

3.2.3. Kristal Viyole (CV) Testi (MBIK Tayini)

Biyofilm oluşumunu inhibe eden en düşük test bileşiği konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Kristal Viyole (CV) testi uygulanmıştır. MBIC değeri belirlenirken (Schillaci ve ark. 2014) tarafından bildirilen yöntem temel alınmıştır.

Çalışmada, 96'lık plaklar kullanılarak sıvı mikrodilüsyon testi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, test edilecek bakteriler 0,5 McFarland standardına ayarlanmıştır. Ardından, her kuyucuğa 100 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Test bileşiği (ToAP2 türevi LI-15) seri dilüsyon yöntemi ile 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanarak kuyucuklara ilave edilmiştir. Son hacim 200 µl olacak şekilde tamamlanmıştır.

96'lık plaklar, statik koşullarda, 37 °C'de, 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyulardaki süpernatant sıvı dikkatlice uzaklaştırılmış ve her kuyucuk 3 kez fosfat Tamponlu Salin (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra, her kuyucuğa 200 µl, %0,1'lik Kristal Viyole (CV) boyası eklenerek karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda, kuyular tekrar yıkanarak biyofilm tabakasını fiks etmek amacıyla %30'luk asetik asit eklenmiştir. Biyofilm varlığı ve yoğunluğu 590 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunun gözlenmediği en düşük test bileşiği konsantrasyonu MBIC değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Biyofilm Eradikasyon Testi (MBEK)

Bu deney, test edilen polipeptitin biyofilm eradikasyon kapasitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 96'lık plaklar kullanılarak biyofilm oluşturan bakteri hücrelerinin test bileşiğine maruz bırakılması ve biyofilm miktarındaki değişimin ölçülmesi hedeflenmiştir.

Deneyin başında, her kuyucuğa 100 µl MHB besiyeri eklenmiş ve deney gruplarına 100 µl bakteri süspansiyonu (0,5 McFarland standardında) ilave edilmiştir. Biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla plaklar 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, kuyuların içeriği uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanarak bakteriler temizlenmiştir. Ardından, her kuyucuğa artan konsantrasyonlardaki (0-256 µg/mL) test bileşiği eklenerek plaklar yeniden 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, kuyular tekrar PBS ile yıkanarak artık hücreler uzaklaştırılmıştır. Biyofilm tabakası değerlendirmek amacıyla kuyulara %0,1'lik kristal viyole (CV) çözeltisi eklenmiş ve karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra fazla boya uzaklaştırılmış ve biyofilme bağlı boya, %30'luk asetik asitten 200 µl eklenerek çözündürülmüştür. Son olarak, 590 nm'de absorbans ölçümü yapılarak biyofilm miktarı değerlendirilmiştir.

3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Antimikrobiyal ve antibiyofilm özellik gösteren ToAP2 türevi LI-15 polipeptidinin *Staphylococcus aureus* ve *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikleri incelemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir. (Kong ve ark. 2018) tarafından bildirilen yöntem esas alınmıştır.

Deney kapsamında, test edilen mikroorganizmalar 6'lık plakların içerisine yerleştirilen steril lameller üzerinde üç farklı grupta kültüre edilmiştir. Kontrol grubu

(peptit uygulanmayan hücreler), ¼ MİK konsantrasyonunda test bileşiği uygulanmış hücreler ve MİK konsantrasyonunda test bileşiği uygulanmış hücreler olarak belirlenmiştir.

6'lık plaklar 37 °C'de, 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, lamel yüzeyine tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından, yüzeye tutunmuş hücrelerin fikse edilmesi için %5'lik glutaraldehit çözeltisi ile 15 dakika fikse işlemi uygulanmıştır. Sabitleme işlemi sonrasında, örnekler artan konsantrasyonlarda etanol serileriyle (sırasıyla %20, %50, %80 ve %100 etanol) 10'ar dakika süreyle inkübe edilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazında, Secondary Electron (SE) modülünde, 10 paskal basınç altında ve 10.000 kat büyütme seviyesinde görüntülenmiştir.

3.2.6. Floresan Mikroskobu Analizi

LI-15 peptitinin bakteri membranı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla floresan mikroskobu analizi yapılmıştır. Bu test kapsamında, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* suşları kullanılmıştır. Bakteri kültürleri bir gece önceden besiyerine ekilerek inkübe edilmiş, ertesi gün 0,5 McFarland standartlarına ayarlanmıştır. Her bir bakteri süspansiyonuna LI-15 peptiti 2MIC konsantrasyonunda uygulanmıştır. Muamele sonrası süspansiyonlar 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

İlgili floresan mikroskobunun (Erzurum Teknik Üniversitesi, YUTAM) arızalı olması nedeniyle analizler Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'da bulunan Zeiss Axio Scope A1 mikroskobuyla gerçekleştirilmiştir.

Canlı ve ölü hücrelerin ayrımını sağlayabilmek için SYTO9 ve Propidium İyodür (PI) boya kullanılmıştır. Peptit muamelesi yapılan bakteri süspansiyonları, boya karışımı ile pipet yardımıyla nazıkçe karıştırılmış ve 15 dakika içerisinde floresan

görüntülemeye alınmıştır. Görüntüleme sırasında SYTO9 için 480/500 nm, PI için ise 490/635 nm uyarma/emisyon filtreleri kullanılmıştır.

3.2.7. Hareketlilik Testleri

3.2.7.1. Kaynaşma Hareketinin İncelenmesi (Swarming Motility)

Bakterilerin hareketlilik yeteneklerini değerlendirmek amacıyla swarming hareketlilik testi uygulanmıştır. Bu testte, bakterilerin yüzey üzerinde yayılma yetenekleri incelenmiştir.

Bu test kapsamında, %0.5 agar içeren MHA besiyerleri hazırlanmış, steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Test edilecek bakteri suşları, sıvı besiyerinde çoğaltılarak 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin merkezine MİK değerleri esas alınarak peptid (LI-15) steril mikropipet ucu ile damlatılarak drigalski ile yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra peptit emdirilen merkeze 5 µl bakteri süspansiyonu damlatılarak aşılama işlemi gerçekleştirilmiştir. Petri kapları, 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, bakterilerin petri kabı yüzeyinde oluşturduğu yayılma desenleri değerlendirilmiştir.

3.2.7.2. Seğirme Hareketinin İncelenmesi (Twitching Motility)

Twitching hareketlilik testi, bakterilerin katı yüzeylerde pilus aracılığıyla gerçekleştirdiği hareketliliği değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Bu test kapsamında, steril edilmiş lamalar alınarak ve 15 dakika UV de bekletildi. Steril edilen lamaların üzerine 700 µl besiyeri konuldu ve lamel ile yayıldı. Kuruyana kadar yaklaşık 10 dakika bekletildi ve ardından belirlenen MİK değerlerinde peptit (LI-15) lamanın orta kısmına ekledi ve kurumaya bırakıldı. Test edilecek bakteri suşları, 0.5 McFarland standardına (yaklaşık 1.5×10^8 CFU/mL) ayarlanmıştır ve lamaların üzerine 1 µl eklenmiştir. Lamlar, üzeri lamel ile kapatılmış ve 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, mikroskop ile faz kontrast görüntüsü alınmıştır.

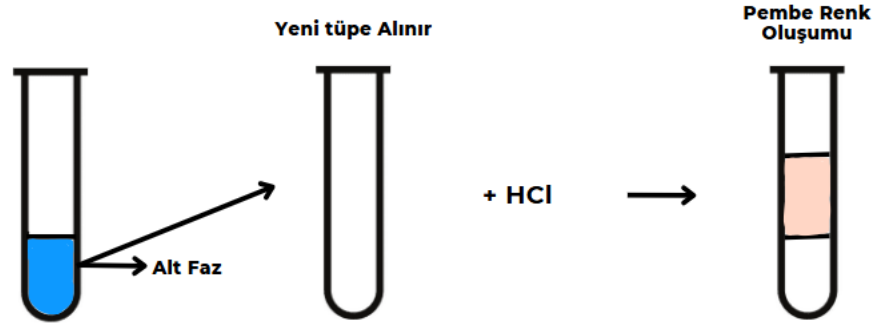
3.2.8. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

LI-15 peptidinin insan eritrosit hücrelerine karşı hemolitik etkisini değerlendirmek amacıyla hemolitik aktivite testi uygulanmıştır. Bu test, Wu ve arkadaşlarının 2014 yılında geliştirdiği yöntemle dayanarak modifiye edilmiştir. Araştırma amaçlı kullanılan, etik rapor gerektirmeyen ticari kan örneğinden 5 ml alınarak eşit hacimde PBS ile karıştırılmış ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Üst faz tamamen berrak hale gelene kadar bu işlem tekrarlanmıştır.

Elde edilen eritrosit süspansiyonu, 1:20 oranında PBS ile seyreltilmiş ve 8 - 128 µg/ml konsantrasyon aralığında peptit (LI-15) eklenerek 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, numuneler 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst faz 96 kuyulu plaklara aktarılmış ve 405 nm dalga boyunda absorbanans ölçümü yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak %100 hemoliz oluşturan Tween-20, negatif kontrol olarak ise %0 hemoliz sağlayan PBS kullanılmıştır (Wu et al., 2014).

3.2.9. Piyosiyonin Deneyi

Sıvı bakteri kültüründen 1 mL alınarak eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Üzerine 500 µL kloroform eklenmiş ve 2 dakika boyunca vortexlenmiştir. Ardından, numune 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek iki fazın oluşumu gözlemlenmiştir. Alt faz dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µL 0,2 M HCl eklenmiştir. Karışım 2 dakika vortexlenmiş, HCl ilavesiyle birlikte pembe renk oluştuğu gözlemlenmiştir. Daha sonra numune 2 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen pembe renkli fazdan 150 µL alınarak 96 well plate içerisine aktarılmıştır. Spektrofotometrik analiz, 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilerek absorbanans değerleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Piyosiyonun Deney Şablonu

3.2.10. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için öncelikle PAO1 ve MRSA suşları uygun besiyerlerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilerek kültür elde edilmiştir. Ertesi gün, kültürlerin yoğunluğu 0,5 McFarland standardına ayarlanmış ve peptit (LI-15) eklenerek 24 saatlik inkübasyona devam edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, hücreler 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş, süpernatant uzaklaştırılmış ve spin atılarak yalnızca pelet elde edilmiştir. Peletler, 500 µl TRIzol reaktifi ile 30 rpm'de 10 dakika homojenize edilmiştir. Daha sonra, 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatlice alınmıştır. Süpernatanta 100 µl kloroform eklenerek 3 dakika karıştırılmış, ardından 10.000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatlice yeni bir tüpe transfer edilerek 250 µl izopropanol eklenmiş ve RNA çöktürülmüştür. RNA, 10 dakika bekletilerek, süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet %75 etanol ile yıkanmıştır.²⁴

Etanol uzaklaştırıldıktan sonra, RNA peleti uygun hacimde nükleaz içermeyen su ile çözülerek -80°C'de saklanmıştır. Elde edilen RNA'nın saflık ve konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümlerle değerlendirilmiş, kalite kontrolü ise agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

3.2.11. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için öncelikle izole edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre ile belirlenmiştir. Çalışmada her örnekte RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde ayarlanmıştır. cDNA sentezi için her bir RNA örneğine 3,2 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl 10× RT Buffer, 0,8 µl 25× dNTP mix, 2 µl 10× RT random primer, 1 µl RNaz inhibitörü ve 1 µl Reverse Transkriptaz eklenerek toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Elde edilen RNA-primer karışımına 10 µl eşitlenmiş RNA eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon koşulları, 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen cDNA örnekleri kısa süreli saklama için -20°C'de, uzun süreli saklama için -80°C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan cDNA, gen ekspresyon analizleri için gerçek zamanlı PCR (qPCR) deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.12. RealTime PCR Analizi

RT-PCR analizi, hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, EvaGreen boyası bazlı tespit yöntemi kullanılmıştır. PCR reaksiyonları toplam 10 µl hacminde olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 2 µl 5× EvaGreen Master Mix, 0,2 µl Forward primer, 0,2 µl Reverse primer, 2 µl cDNA ve 5,6 µl dH₂O içerecek şekilde oluşturulmuştur.

Reaksiyon şartları olarak, başlangıç denatürasyonu için 95°C'de 12 dakika, ardından denatürasyon için 95°C'de 15 saniye, bağlanma için 60°C'de 60 saniye ve uzama için 72°C'de 20 saniye olacak şekilde 40 döngü boyunca tekrarlanarak yürütülmüştür.

Elde edilen Ct (Cycle threshold) değerleri, referans gen kullanılarak housekeeping genler (*S. aureus* için *gyrA*; *P. aeruginosa* için *rpoD*) 2ΔCt yöntemi ile analiz edilmiş ve

gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Tüm analizler üç bağımsız tekrar halinde yapılmıştır.

3.2.13. MTT Testi

İnsan fibroblast HDFA (Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult) hücre hattına LI-15'in toksik etkileri incelendi. Hücreler, 96 kuyulu plaklara ekildi ve %70-80 oranında tutunma sağlandıktan sonra artan konsantrasyonlarda (0-256 µg/mL) LI-15 peptidi uygulandı. Plaklar, 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi. 48 saat sonra her bir kuyuya 0,01 ml MTT solüsyonu eklendi ve plaklar 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her kuyuya 0,1 ml 0,04 N HCl içeren izopropanol eklendi. Ardından absorbans değerleri 570 nm'de ölçüldü. Protokol, kitin kullanım kılavuzuna uygun şekilde uygulandı.

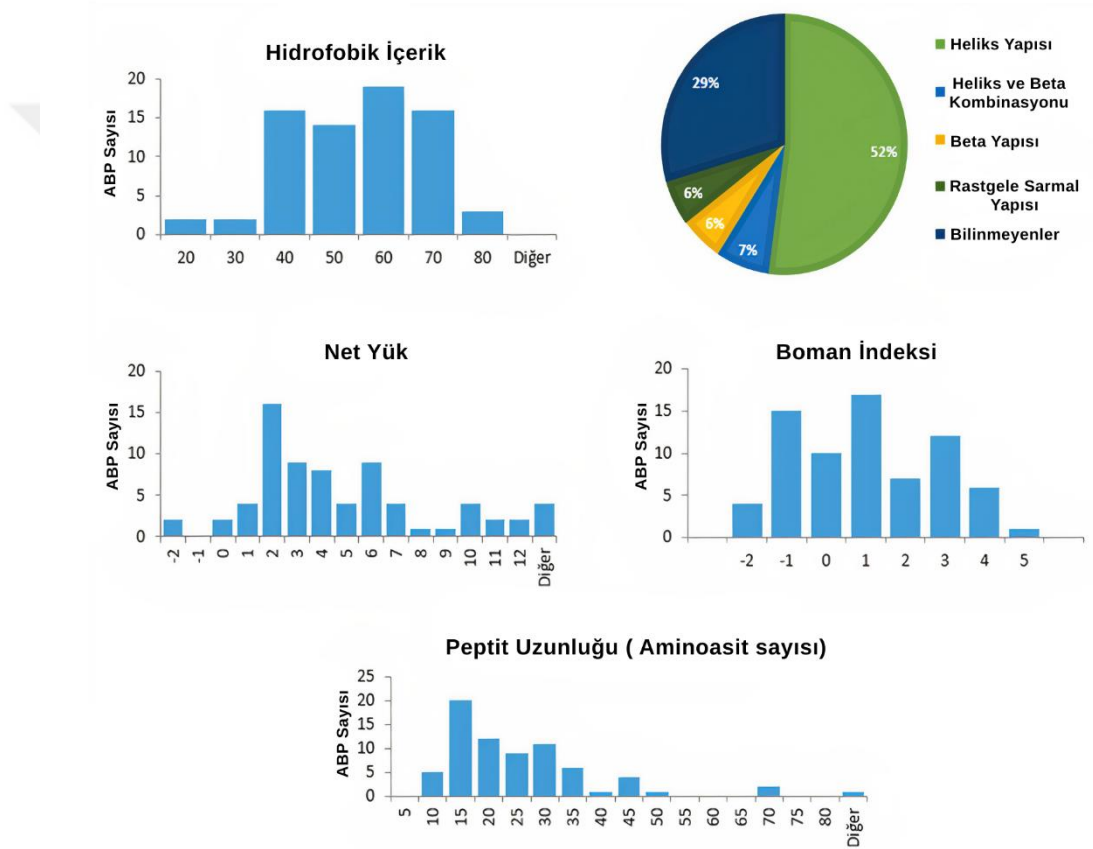
3.2.14. LDH Testi

48 kuyulu plaklara hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından (0-256 µg/mL) LI-15 peptidi uygulandı. Plaklar, 48 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyudan 90 µl besiyeri alınarak yeni bir plağa aktarıldı. Üzerine 10 µl LDH sitotoksosite testi bileşeni eklendi ve plaklar 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda absorbans değerleri 450 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak her bir ilgili kuyuya 15 µl Triton X-100 eklendi. Protokol, kitin kullanım kılavuzuna uygun şekilde uygulandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Peptit Sentezi ve Karakterizasyonu

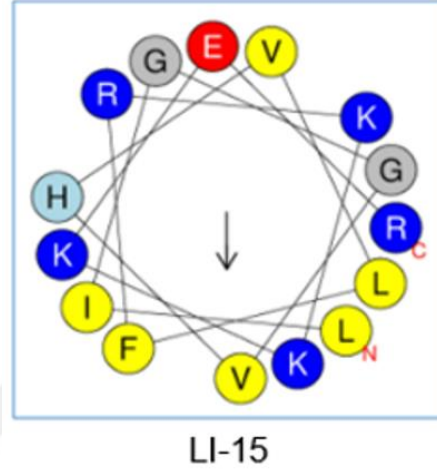
Bu çalışmada, ToAP2 türevi olan LI-15 peptidinin sentezi, karakterizasyonu ve biyofiziksel özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Veri tabanlı filtreleme teknolojisi kullanılarak belirlenen en uygun peptit seçilmiştir.



Şekil 4.1. Veri Tabanı Filtreleme Teknolojisi ile ABP Moleküllerinin Özelliklerinin Gösterdiğimiz Histogram Grafikleri

Peptit seçimi aşamasında, 72 farklı antimikrobiyal peptit (AMP) üzerinden yapılan analizler doğrultusunda belirlenen grafikler oluşturulmuştur. Bu grafikler şekil 4.1’de gösterilmiştir. Peptit belirlenirken, protein katlanması ve protein etkileşimi açısından kritik öneme sahip olan hidrofobiklik faktörü dikkate alınmıştır. Ayrıca, antibiyofilm peptitlerinin membran hedefleme kapasitesini değerlendiren Boman indeksi

göz önünde bulundurulmuş ve 2'nin altındaki peptitler analiz edilmiştir. Net yük faktörü ise peptidin hücre çözünürlüğü, hücre geçirgenliği ve protein etkileşimleri üzerindeki etkisi açısından önemli bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Bu analizler sonucunda, antibiyofilm aktivitesi potansiyeli taşıyan ToAP2 türevi LI-15 peptidi tasarlanmıştır.



Şekil 4.2. Helikal Well Diyagramı

Sonuç olarak, bu çalışma ToAP2 türevi LI-15 peptidinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve yapısal özelliklerinin hedeflenen biyolojik fonksiyonlarla uyumlu olduğunu göstermektedir. Peptidin biyofiziksel özellikleri, antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite açısından umut vaat etmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu peptidin farmakokinetik özelliklerinin optimize edilmesi ve in vivo etkinliğinin değerlendirilmesi üzerine yoğunlaşmalıdır. Ayrıca, peptidin stabilitesi ve antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi için yapılan testlerle desteklenmiştir.

Çizelge 4.1. Kalıp Olarak Seçilen ABP Molekülü

	Adı	Aminoasit Dizisi	Referans
2	ToAP2	FFGTLFKLGSKLIPGVMKLFSSKKKER	Guilhelmelli vd, 2016

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

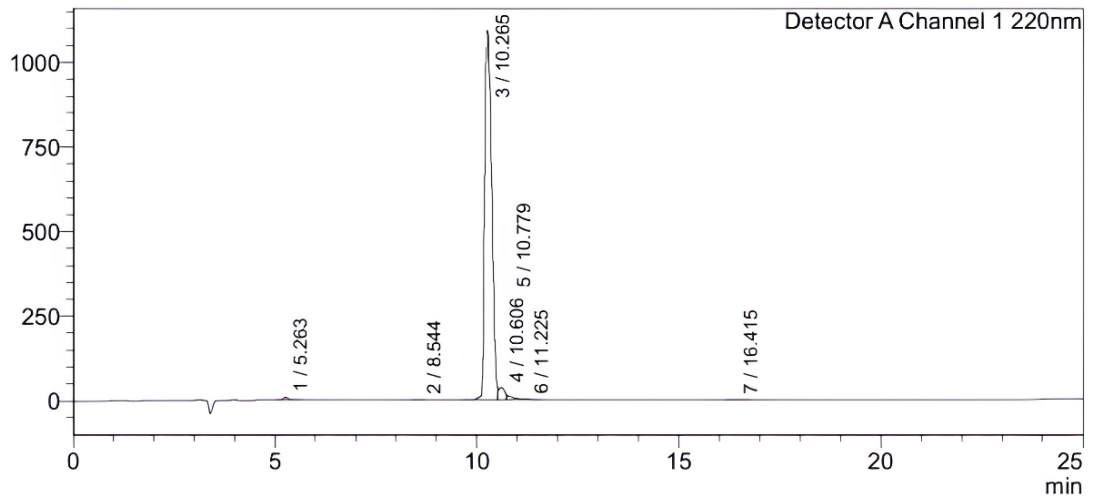
Çizelge 4.2. Sentezlenen ABP Dizisi ve Saflığı

	Peptid Kodu	Aminoasit Dizisi	Elde Edilme Saflığı
2	LI-15	LIGGVHVLFRKKER-NH ₂	95.6%

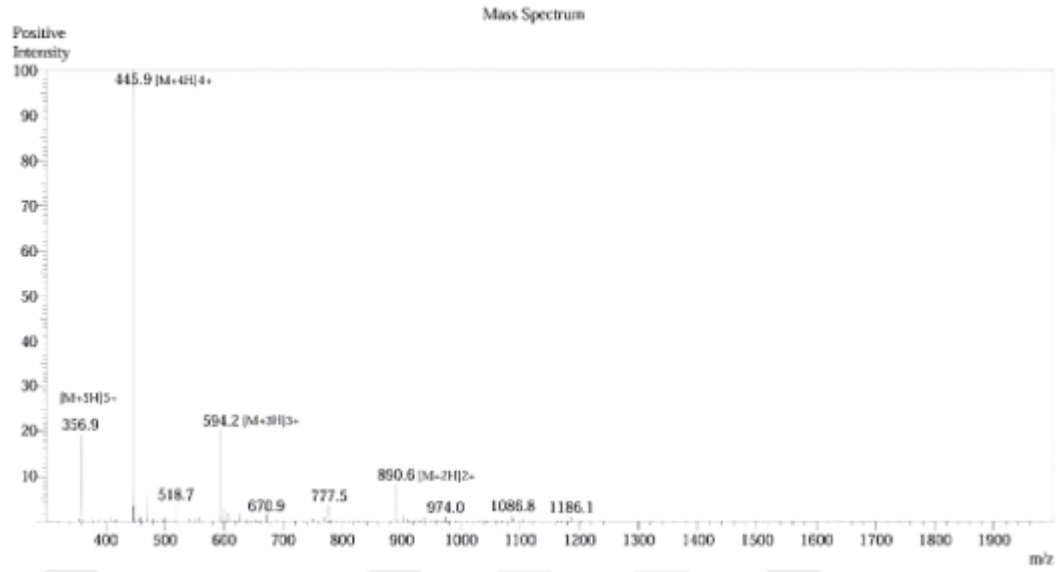
Çizelge 4.3. BestSel algoritması ile Gerçekleştirilen CD Spektrometre Sonuçları

	Peptid Kodu	Sekonder Yapı Tahmini
2	LI-15	% 0 Heliks, % 41,7 Antiparalel, % 43,8 Diğer

mV

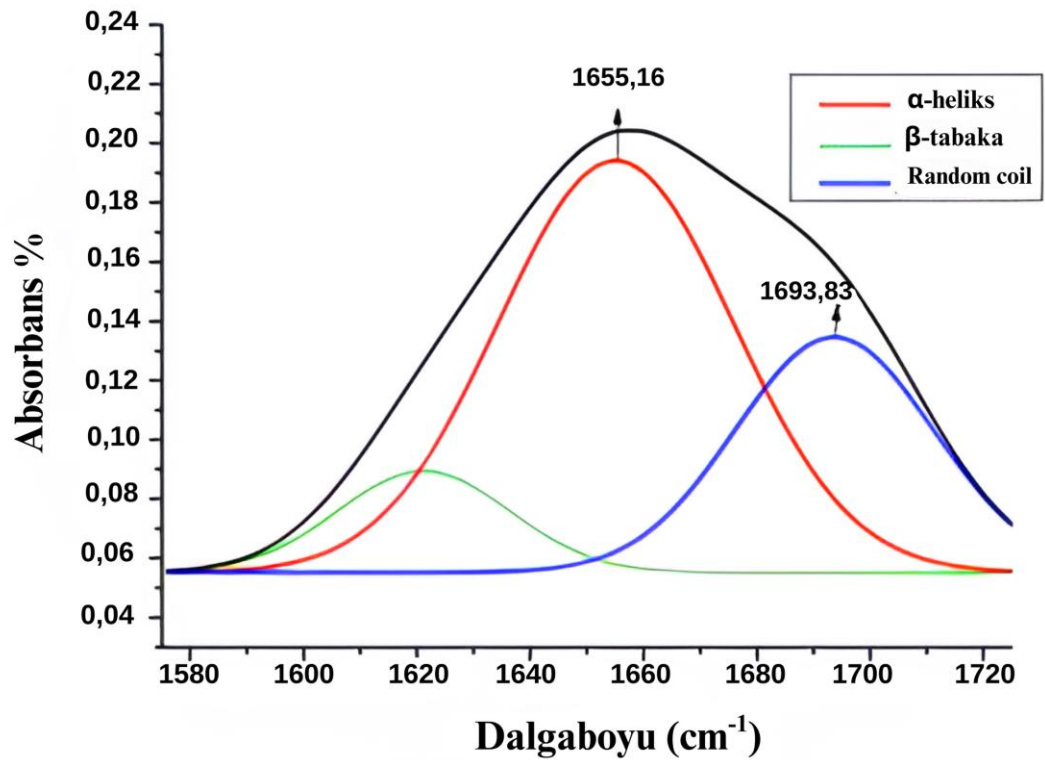


Şekil 4.3. LI-15 Peptitinin HPLC Sonucu.



Şekil 4.4. LI-15 Peptidinin Kütle Spektroskopisi (CD)

LI-15



Şekil 4.5. LI-15'in FT-IR Pik Analiz Grafikleri. LI-15'in α -heliks Yapısı ve β -dönüş Yapısına Sahip Olabileceği Görülmektedir.

Peptidin yapısal karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), HPLC ve Circular Dichroism (CD) spektroskopisi yöntemleriyle analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda oluşan grafikler şekil 4.3'te, 4.4'de ve 4.5'de gösterilmiştir. FTIR analizinde, amid I ve amid II bantlarının karakteristik dalga boylarında tespit edilmesi, peptidin protein yapısına uygun şekilde sentezlendiğini doğrulamıştır. CD spektroskopisi sonuçları ise peptidin sekonder yapısının α -heliks özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. Diğer bir uygulama olan HPLC ise sentezlediğimiz peptidin saflığını değerlendirmek için kullanılan bir analiz yöntemidir. Grafikte gözlemlediğimiz tek ve net bir pik, peptidin homojen olduğunu ve safsızlık içermediğini gösterir. Eğer birden çok pik olsaydı, bu durum sentez sırasında istenmeyen yan ürünlerin oluştuğuna işaret ederdi. Bu bulgular, LI-15 peptidinin benzer antimikrobiyal peptitlerin yapısal özellikleriyle uyumlu bulunmuştur.

4.2. Patojen Bakteri Suşlarının Kültüre Alınması

Proje kapsamında kullanılan bakteri suşları, laboratuvar koleksiyonumuzda hem 80 °C hem de -20 °C'de saklanmış olup, deneylerde bu suşların tamamından faydalanılmıştır. Çalışma kapsamında bakteriler, Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Tüm suşlar üzerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen veriler, araştırmanın bulgularını ortaya koymaktadır.

4.3. Mikrodilüsyon Testi ile MİK Değerlerinin Belirlenmesi

LI-15 peptidinin patojen mikroorganizmalara karşı etkinliği, mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bu kapsamda MİK tayini gerçekleştirilmiş olup, ilgili tablo LI-15 peptidine ait MİK değerlerini göstermektedir. Çalışmada, kalın yazılmış suşlar ile devam edilerek analizler tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, LI-15 peptidinin klinik izolatlarla karşı oldukça düşük MİK değerleri sergilediğini ortaya koymuştur. Çizelge 4.4'te mikroorganizmalara yapılan mikrodilüsyon testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. LI-15 peptidinin bakteri ve maya suşlarına karşı MIC değerleri

LI-15	
Bakteri ve Maya Suşları	MIK (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32
<i>Escherichia coli</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(EC1)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP1)	256
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>256
<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1025	64
<i>Candida propilosis</i> ATCC 22019	>256
<i>Candida dupliniensis</i> CBS 7987	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	>256

4.4. Kristal Viyole (CV) Testi (MBİK Tayini)

Bu çalışmada, LI-15 peptidinin biyofilm oluşumunu inhibe edici etkisi, kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus* (MRS) ve *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) suşları üzerinde detaylı biçimde incelenmiştir. Her deney grubu,

kendi pozitif kontrolü ile değerlendirilmiş; negatif kontrol olarak ise bakteri ekilmemiş besiyerinin absorbans değerleri referans alınmıştır. Elde edilen absorbans değerleri doğrultusunda, minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBIK) değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.5'te mikroorganizmalara ait MBIK sonuçları verilmiştir.

Sonuçlar, LI-15'in MRSA suşlarında biyofilm oluşumunu 128 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarda inhibe ettiğini; PAO1 suşuna karşı ise bu etkinliğin 16 µg/mL gibi daha düşük bir konsantrasyonda sağlandığını şekil 4.6'da göstermektedir. Bu bulgular, peptidin biyofilm oluşumunu doza bağlı olarak baskıladığını ve antibiyofilm peptit (ABP) niteliği taşıdığını ortaya koymaktadır.

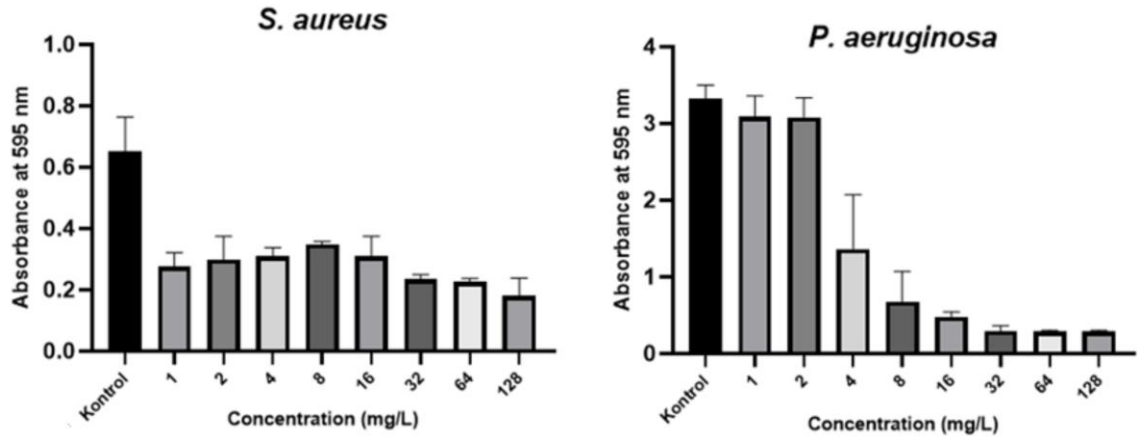
Benzer şekilde yapılan çalışmalarda, PAO1, MRSA ve *Candida albicans* suşlarında yapılan paralel deneylerde, LI-15'in 2–4 µg/mL konsantrasyon aralığında biyofilm oluşumunu %70'in üzerinde baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu etkiler, literatürde yer alan LL-37 (Overhage et al. 2008) gibi peptitlerin benzer biyofilm inhibisyonu için 8–16 µg/mL dozlarına gereksinim duyduğu verileri ile karşılaştırıldığında, LI-15'in daha düşük dozlarda etkili olması sayesinde önemli bir terapötik avantaj sunduğu anlaşılmaktadır (Dean et al., 2011; Overhage et al., 2008).

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, LI-15'in özellikle *P. aeruginosa* suşlarında düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olduğu ve çeşitli patojenlere karşı geniş spektrumlu antibiyofilm aktivite gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.5. LI-15 peptidinin bakteri ve maya suşlarına karşı MBIK değerleri

LI-15	
Bakteri ve Maya Suşları	MBIK (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	32

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64
<i>Escherichia coli</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(EC1)	16
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clinical isolate with multiple antibiotic resistance(KP1)	>256
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>256
<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1025	>256
<i>Candida propilosis</i> ATCC 22019	>256
<i>Candida dupliniensis</i> CBS 7987	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	>256

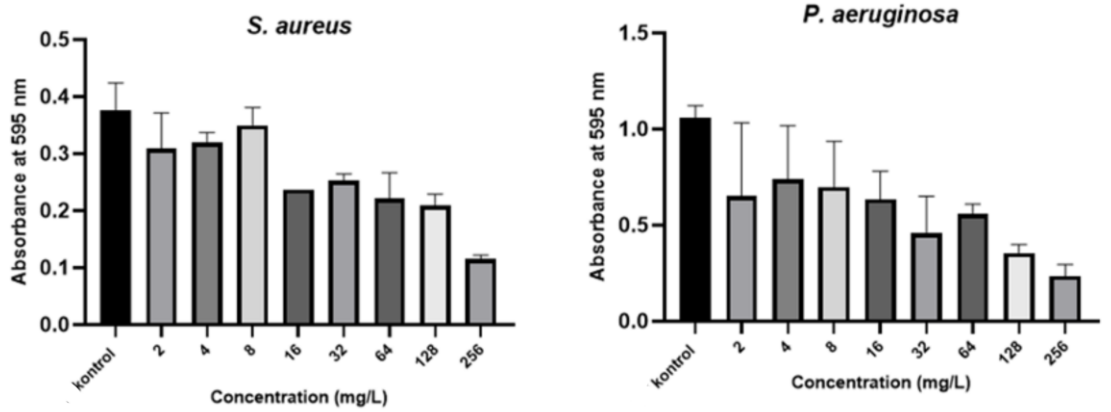


Şekil 4.6. LI-15'in *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi.
(Artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir.)

4.5. Biyofilm Eradikasyon Testi (MBEK Tayini)

Bu çalışma kapsamında, LI-15 peptidinin *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerine karşı etkinliği değerlendirilmiştir. 96 kuyulu plak formatında gerçekleştirilen biyofilm eradikasyon testleri sonucunda, LI-15'in her iki bakteri türüne karşı biyofilm bozucu etkisi olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, şekil 4.7'de görüldüğü üzere LI-15 peptidinin antibiyofilm peptid (ABP) olarak potansiyel taşıdığını ve özellikle *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı yüksek etkinlik gösterdiğini desteklemektedir. Bu veriler, LI-15'in biyofilm ilişkili enfeksiyonların kontrol altına alınmasında veya tıbbi yüzeylerde biyofilm oluşumunu önleyici ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.



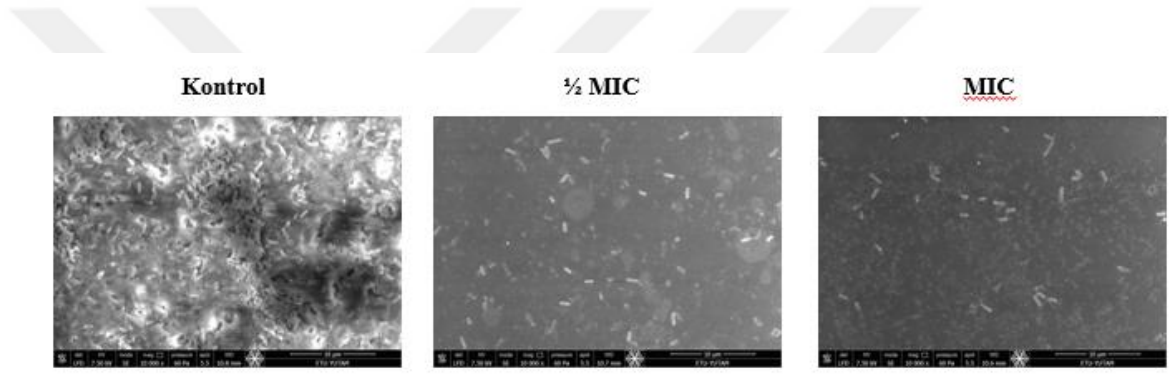
Şekil 4.7. LI-15'in Oluşmuş Biyofilmin Bozulmasına Olan Etkisi. (*S. aureus* ve *P. aeruginosa*'da Artan Konsantrasyonlarda Biyofilm Yıkımını Arttırdığı Görülmektedir.)

4.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

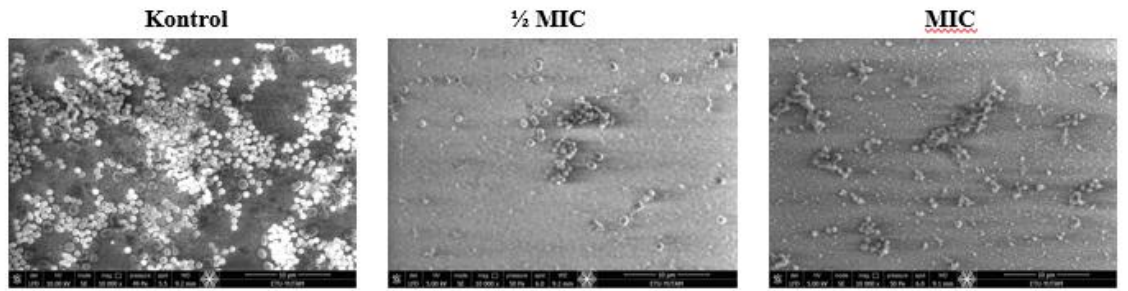
Bu çalışmada, LI-15'in biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, Erzurum Teknik Üniversitesi'nde bulunan Quanta

FEG 250 cihazı ile gerçekleştirilmiş ve LI-15'in tutunma ve morfoloji üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Elde edilen SEM görüntülerine göre, LI-15'in iki organizmada da $\frac{1}{2}$ MIC ve MIC konsantrasyonlarında uygulanması sonucunda tutunan hücre sayısında belirgin bir azalma şekil 4.8. ve 4.9'da gözlemlenmiştir. Bu bulgu, LI-15'in antibiyofilm aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Deneysel veriler birbiriyle uyumlu olup, LI-15'in biyofilm inhibisyon potansiyelini destekler niteliktedir. Bu sonuçlar, LI-15'in biyofilm kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde kullanılabilecek potansiyel bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.8. PAO1 Suşunun Farklı MİK Değerlerinde Uygulanmış SEM Görüntüleri



Şekil 4.9. MRSA Suşunun Farklı MİK Değerlerinde Uygulanmış SEM Görüntüleri

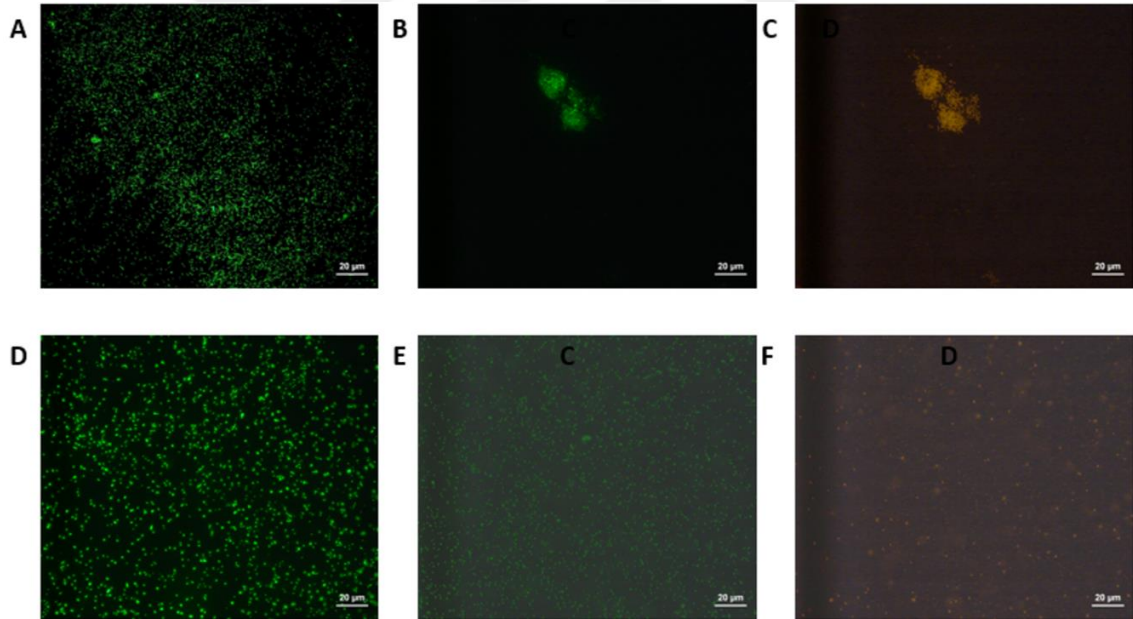
4.7. Floresan Mikroskobu Analizi

Pseudomonas aeruginosa ve *Staphylococcus aureus* suşlarına 2MIC konsantrasyonunda uygulanan LI-15 peptidinin bakteriyel canlılık üzerindeki etkisi, SYTO9 ve Propidium İyodür (PI) boyaları ile boyanarak floresan mikroskobu altında

incelenmiştir. Her bir örnekten hem canlı hücreleri gösteren (yeşil sinyal, SYTO9) hem de ölü hücreleri gösteren (kırmızı sinyal, PI) görüntüler elde edilmiştir.

Şekil 4.10'da *P. aeruginosa*'ya ait görüntülerde (B ve C), yeşil sinyalin azlığı ve kırmızı sinyalin baskın olması, LI-15 peptidinin hücre zar bütünlüğünü bozarak bakteriyel hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde şekil 4.10'da *S. aureus* görüntülerinde (E ve F), canlı hücre sinyalinin sınırlı düzeyde kaldığı ve ölü hücre sinyalinin yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen bu veriler, LI-15'in 2MIC konsantrasyonunda hem Gram-negatif (*P. aeruginosa*) hem de Gram-pozitif (*S. aureus*) bakterilere karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiğini ve bakteriyel hücre ölümünü doğrudan tetiklediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.10. 2MIC konsantrasyonundaki LI-15'in *P. aeruginosa*'ya (A, B, C) ve *S. aureus* (D, E, F)'ye karşı canlılık değerlendirmesi (A ve D: kontrol grupları)

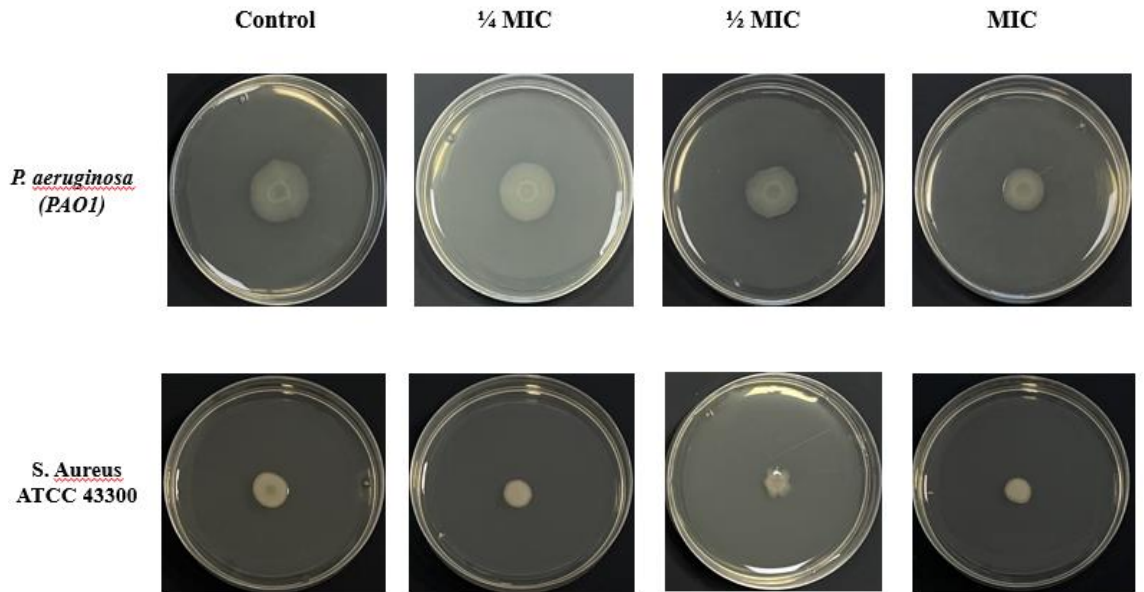
4.8. Bakteri Hareketliliği Üzerine Etkileri

4.8.1 Kaynaşma Hareketinin İncelenmesi (Swarming Motility)

Mikroorganizmalar, flagella aracılığıyla yarı katı yüzeylerde gruplar halinde hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Bu durum, bir çeşit sürü davranışı olup, insan patojenlerinde virülens faktörlerinin artışı ve antibiyotik direnci ile ilişkilidir(Rütschlin & Böttcher, 2020).

Özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, %0,5 veya %0,7 agar içeren yarı katı ortamlarda swarming (kaynaşma) hareketliliği sergilemektedir. Bu hareketlilik, *P. aeruginosa*'nın flagella fonksiyonuna bağlı olup, flagella biyosentez genleri tarafından kontrol edilmektedir.

Çalışmamız kapsamında, *P. aeruginosa* ve *S.aureus* türlerinde kaynaşma hareketliliği ve agar yüzeyindeki davranış şekli incelenmiştir. Elde edilen Petri sonuçları şekil 4.11'de sunulmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde, LI-15 peptidinin hem *S. aureus* hem de *P. aeruginosa* türlerinde kaynaşma hareketliliğini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, LI-15'in potansiyel antibiyofilm ve antivirülens etkilerini destekler niteliktedir.



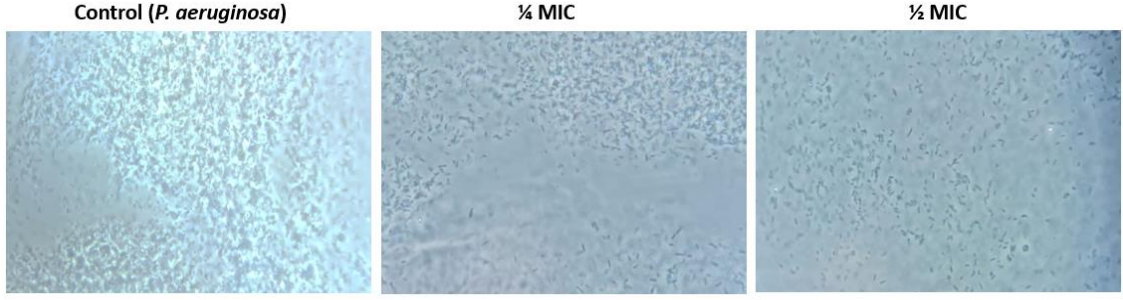
Şekil 4.11. LI-15 *S. aureus* ve *P. aeruginosa* Üzerindeki Swarming Etkinliği.

4.8.2. Seğirme Hareketinin İncelenmesi (Twitching Motility)

Bu çalışmada, *P. aeruginosa* 'da seğirme hareketliliğinin (twitching motility) Tip IV pili aracılığıyla nasıl gerçekleştirildiği incelenmiştir. Tip IV pili, bakterinin yüzeylere tutunmasını, kolonizasyonunu ve biyofilm oluşumunu sağlayan önemli yapısal bileşenlerden biridir. Ayrıca, bu yapıların enfeksiyon sırasında konak savunma sisteminden kaçınmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Burrows 2012; Mattick 2002). Nitekim, Tip IV pili mutasyonlarına sahip bakterilerde biyofilm oluşumunun ve yüzey hareketliliğinin önemli ölçüde azaldığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rossy et al., 2023).

Çalışmamızda, seğirme hareketliliğinin yalnızca *P. aeruginosa* suşunda gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu hareketlilik Tip IV pili ile sağlandığından, diğer çalışılan bakteri suşlarında bu analizler gerçekleştirilmemiştir. Seğirme hareketliliğinin mikroskobik düzeyde değerlendirilmesi için faz kontrast mikroskobu kullanılmıştır. Deneylerde, %0,5'lik agar içeren besiyerleri steril lamalar üzerine yerleştirilmiş ve *P. aeruginosa* tek koloni şeklinde ekilerek üç saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, örnekler faz kontrast mikroskobu ile incelenmiş ve peptit uygulamalarının seğirme hareketliliği üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Elde edilen görüntüler şekil 4.12'de gösterilmiştir. LI-15 peptidinin uygulanmasıyla seğirme hareketliliğinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca, mikroskobik analizlerde canlı hücrelerin hareket hızlarında belirgin bir yavaşlama gözlenmiştir. Bu bulgular, kullanılan peptitlerin Tip IV pili işlevselliğini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek seğirme hareketliliğini inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Tip IV pilus yapılarının fonksiyonunun bozulması, bakterinin yüzeylerde etkin tutunmasını ve koloni gelişimini olumsuz etkileyebileceğinden (Burrows 2012), seğirme hareketliliğinin azalması biyofilm oluşumunu da baskılayabilir. Bu durumda peptitin *P. aeruginosa*'nın patojenitesini azaltmada potansiyel bir antimikrobiyal ajan olabileceği ileri sürülebilir.



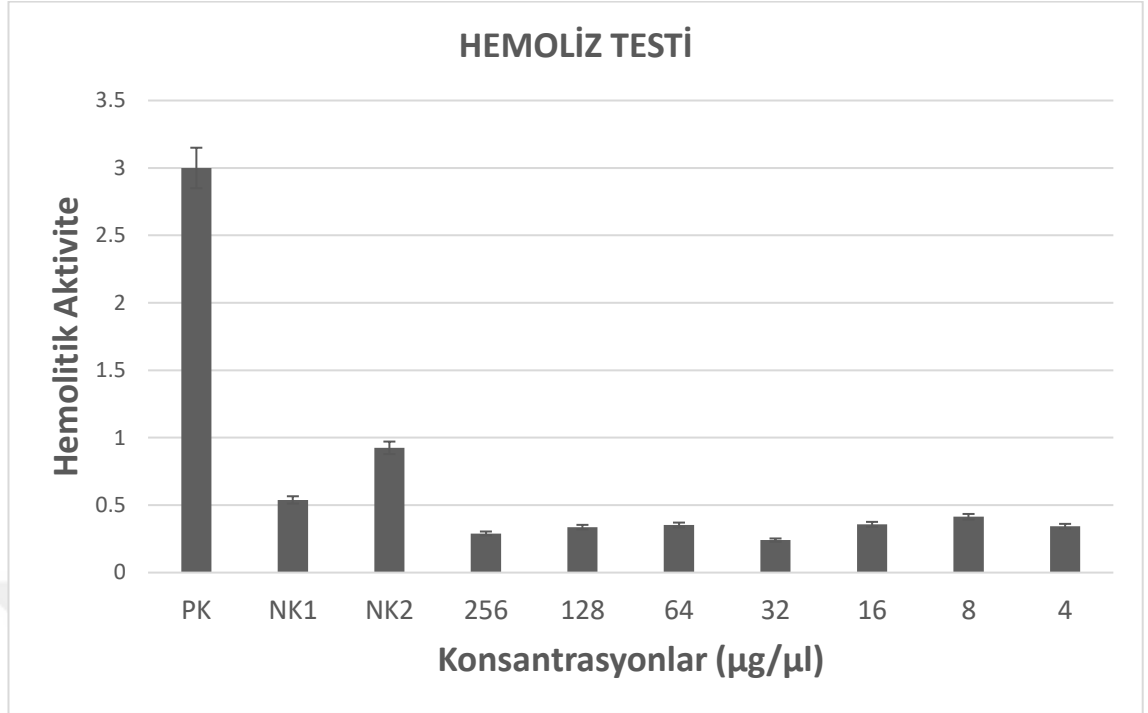
Şekil 4.12. LI-15'in *P. aeruginosa* Üzerindeki Twitching Etkinliği

4.9. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

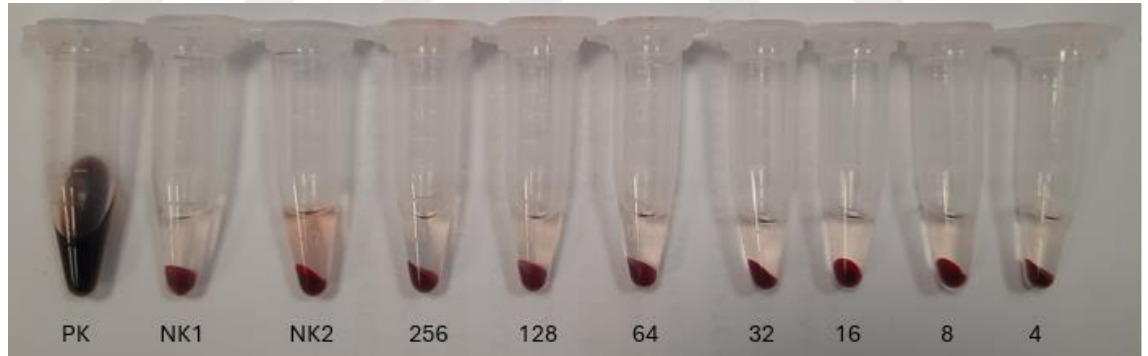
LI-15 peptidinin hemolitik etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen hemolitik aktivite testi sonucunda, peptidin eritrosit hücreleri üzerinde belirgin bir hemolize yol açmadığı gözlemlenmiştir. 4 µg/ml ile 256 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulanan LI-15 peptidi, tüm dozlarda negatif kontrol grubuna (PBS) benzer şekilde davranarak, süspansiyonda belirgin bir hemoliz oluşturmamış ve eritrosit bütünlüğünü korumuştur. Görsel gözlemler, spektrofotometrik analizlerle de desteklenmiştir. Pozitif kontrol grubunda (Tween-20) gözlemlenen belirgin hemoliz ile karşılaştırıldığında, LI-15 peptidi ile muamele edilen örneklerde hem renk değişimi hem de absorbans artışı gözlenmemiştir. Bu sonuçlar şekil 4.13. ve 4.14'te gösterimiştir.

Bu sonuçlar, LI-15 peptidinin PAO1 ve MRSA suşlarına karşı sergilediği antimikrobiyal etkiye karşın, insan eritrositleri üzerinde toksik bir etkiye yol açmadığını ve biyouyumluluğunun yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim, antimikrobiyal peptitlerin güvenli bir terapötik ajan olarak değerlendirilebilmesi için sadece mikrobiyal etkililik değil, aynı zamanda konak hücrelere karşı düşük toksisite göstermesi de temel bir gerekliliktir (Ageitos et al. 2017).

Sonuç olarak, hemolitik aktivite testinden elde edilen veriler, LI-15 peptidinin yalnızca mikrobiyal hedeflere yönelik etkili bir ajan olduğunu değil, aynı zamanda memeli hücreleri için güvenli bir profil sunduğunu göstermektedir. Bu bulgular, peptidin terapötik kullanım potansiyelini desteklemekte ve ileri toksikolojik değerlendirmelere geçilmesi için güçlü bir temel oluşturmaktadır.



Şekil 4.13. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi(PK: Tween 20, NK1: PBS, NK2:Su)



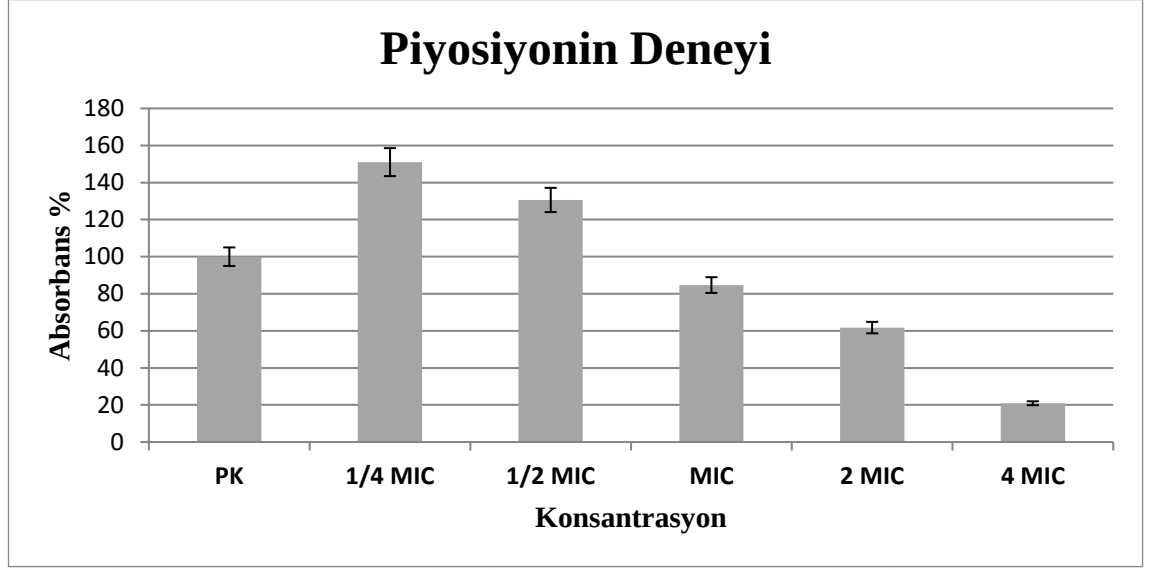
Şekil 4.14. LI-15 Peptidinin Farklı Konsantrasyonlarda (4–256 mg/ml) Eritrosit Süspansiyonu Üzerinde Oluşturduğu Hemolitik Aktiviteye Ait Görsel Sonuç. (Soldan Sağa: Pozitif Kontrol (Tween-20), Negatif Kontrol 1 (PBS), Negatif Kontrol 2 (Su) Ardından Sırasıyla 256, 128, 64, 32, 16, 8 ve 4 mg/ml Konsantrasyonlarında LI-15 Peptidi Uygulanmış Örnekler.)

4.10. Piyosiyonin Deneyi

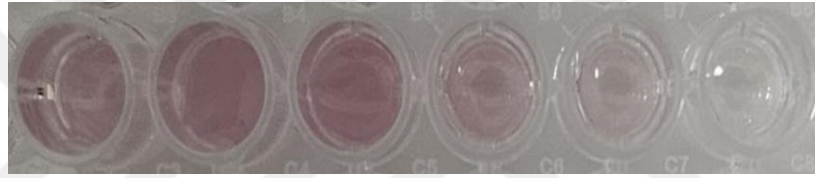
Bu çalışmada, PAO1 suşlarının piyosiyonin üretimi sıvı kültür ortamında kantitatif olarak değerlendirildi. Kültürlerden alınan örnekler kloroform ile ekstrakte edilip HCl ile işlem gördükten sonra 520 nm dalga boyunda absorbens ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunun absorbens değeri 0,196 olarak belirlendi ve %100 referans alındı. Farklı antibiyotik konsantrasyonlarının etkisi incelendi ve şekil 4.15’de değerler verilmiş aynı zamanda 4.16’da deneysel görüntü gösterilmiştir. Özellikle 4 MIC konsantrasyonunda piyosiyonin üretiminde yaklaşık %79 oranında azalma gözlemlendi. 2 MIC ve MIC seviyelerinde ise sırasıyla %61 ve %15 azalma kaydedildi. Düşük konsantrasyonlarda (1/4 MIC ve 1/2 MIC) ise pigment üretiminde artış gözlenerek, düşük doz antibiyotiklerin bakteriyel stres yanıtı tetikleyebileceği düşünüldü. Bulgular, antibiyotik konsantrasyonlarının *P. aeruginosa*’nın virülans faktörü olan piyosiyonin üretimini doz bağımlı şekilde etkilediğini ortaya koydu. Yüksek dozlarda üretim baskılanırken, düşük dozlar üretimi artırabildi.

Literatürde, Jabłońska ve arkadaşlarının (2023) çalışmasında piyosiyoninin yalnızca bir virülans faktörü değil, aynı zamanda biyoteknolojik potansiyele sahip bir molekül olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada piyosiyonin üretiminin kültür koşulları, kimyasal ajanlar, fiziksel faktörler ve genetik mühendislik yaklaşımlarıyla artırılabilirliği veya azaltılabilirliği belirtilmiştir (Jabłońska et al. 2023). Bizim çalışmamız, antibiyotik uygulaması gibi çevresel stres faktörlerinin de üretimi yönlendirebileceğini göstermesi bakımından literatürdeki bu görüşü desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, antibiyotiklerin yalnızca bakteriyel büyümeyi değil, aynı zamanda virülans faktörlerini de etkilediğini göstermiştir. Gelecek çalışmalarda, hem düşük doz antibiyotiklerin neden piyosiyonin üretimini artırdığı hem de bu durumun klinik sonuçları daha detaylı araştırılmalıdır.



Şekil 4.15. LI-15 Peptidi ile Piyosiyonin Üretimini Değerlendirilmesi



Şekil 4.16. LI-15 Peptidi ile Piyosiyonin Üretimini Deneysel Görüntüsü

4.11. RealTime PCR Analizi

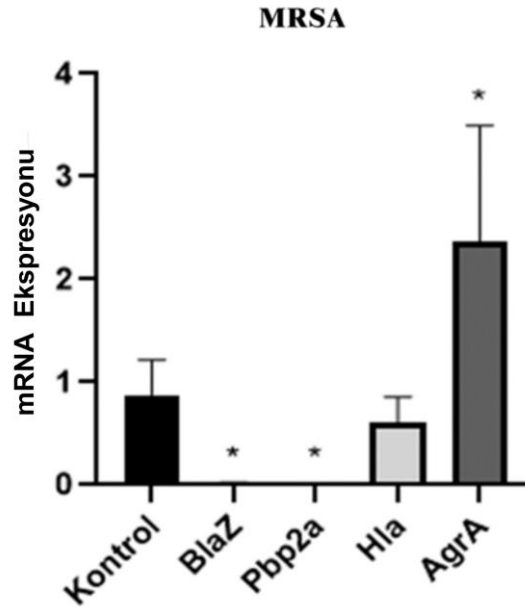
Bu çalışmada, LI-15 peptidinin patojen mikroorganizmalar üzerindeki gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı analizleri, LI-15'in hem antibiyotik direnciyle ilişkili genler hem de virülans faktörleri üzerinde belirgin düzenleyici etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur.

MRSA suşunda, β -laktam antibiyotik direncinde rol oynayan blaZ ve pbp2a genlerinin ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla baskılanmıştır. blaZ geni, β -laktamaz üretimi aracılığıyla penisilin türevi antibiyotiklere direnç sağlamaktadır (Rice 2012). pbp2a geni ise β -laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) oluşturmaktadır (Chambers 1997). Bu genlerin ekspresyonundaki azalma, LI-15 peptidinin antibiyotik direnç mekanizmalarını inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

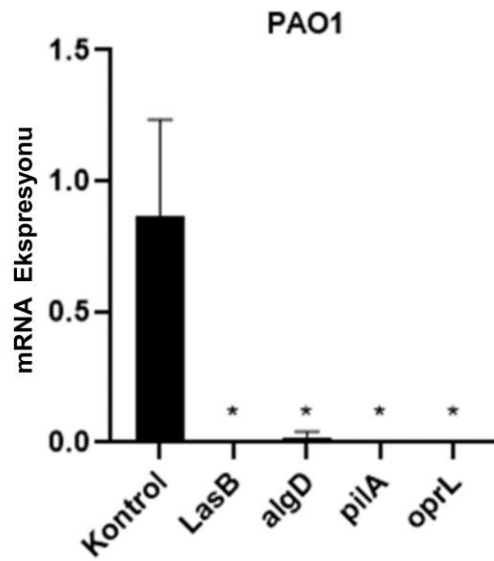
Aynı örnek grubunda, α -toksin üretiminden sorumlu hla geninde daha sınırlı düzeyde bir azalma gözlemlenirken, quorum sensing sisteminin ana düzenleyicisi olan agrA geninde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. agrA'daki bu artış, bakterilerin savunma mekanizmalarını aktive etmesiyle ilişkili olabilir (Novick and Geisinger 2008). Literatürde, agr sisteminin çevresel stres faktörlerine yanıt olarak düzenlenebileceği bildirilmektedir.

PAO1 suşunda ise, virülans ve biyofilm oluşumunda kritik önem arz eden lasB, algD, pilA ve oprL genlerinde anlamlı düzeyde ekspresyon azalması tespit edilmiştir. lasB geni, elastaz B üretimini düzenleyerek dokulara zarar verilmesinde etkili olmaktadır (Smith and Iglewski 2003; Toder, Gambello, and Iglewski 1991). algD geni, alginat biyosentezinin önemli enzimlerinden birini kodlamakta olup biyofilm matrisinin oluşumunda merkezi rol oynamaktadır (Mattick 2002). pilA geni, Tip IV pilus yapısının ana bileşenini oluşturarak yüzey tutunması ve biyofilm başlangıcında görev almakta, oprL ise hücre zarı stabilitesinde rol oynamaktadır (Mattick 2002; De Vos et al. 1997). Bu genlerdeki baskılanma, LI-15'in PAO1'in biyofilm oluşumu, adezyon yeteneği ve konak dokuya zarar verme kapasitesi üzerinde belirgin şekilde inhibitör etkiler oluşturduğunu desteklemektedir.

Genel olarak bu bulgular, LI-15 peptidinin hem antibiyotik direnç mekanizmalarını hem de virülans faktörlerini hedef alarak çok yönlü bir antimikrobiyal etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Bu özellik, özellikle çoklu ilaç direncine sahip patojenlere karşı alternatif tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır. RealTime PCR analiz sonuçları 4.18. ve 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. *Staphylococcus aureus* (MRSA) Suşunda Belirlenen Genler Üzerindeki Etkinliğin Gösterildiği RT-qPCR Grafiği.

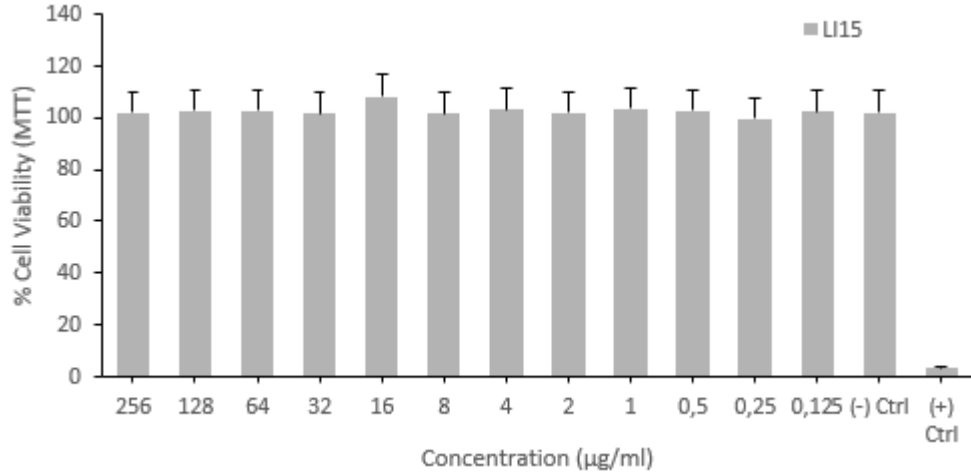


Şekil 4.18. *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) Suşunda Belirlenen Genler Üzerindeki Etkinliğin Gösterildiği RT-qPCR Grafiği.

4.12. MTT Testi

MTT analizi sonuçları, LI-15 peptidinin insan fibroblast (HDFa) hücre hattı üzerinde test edilen tüm konsantrasyonlar (0,125–256 µg/mL) boyunca hücre canlılığı üzerinde belirgin bir toksik etki oluşturmadığı şekil 4.19’da göstermektedir. Peptid uygulanan gruplarda ölçülen hücre canlılık oranları, negatif kontrol grubuna oldukça yakın seyretmiş ve %100’e yakın değerlerde kalmıştır. Bu durum, LI-15’in sitotoksik profilinin düşük olduğunu ve hücre proliferasyonu üzerinde baskılayıcı bir etkisinin bulunmadığını göstermektedir. Pozitif kontrol grubunda (Triton X-100) ise, beklendiği üzere hücre canlılığı ciddi oranda azalmış ve bu grup ile LI-15 uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmiştir.

Bu veriler, LI-15’in özellikle düşük ve orta düzey konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin ihmal edilebilir düzeyde olduğunu, dolayısıyla fibroblast hücreler üzerinde biyoyumluluk açısından olumlu bir profil sergilediğini göstermektedir. Bulgular, peptidin yüksek dozlara kadar tolere edilebilirliğini göstermekte olup, gelecekteki terapötik uygulamalarda doz açısından avantaj sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.



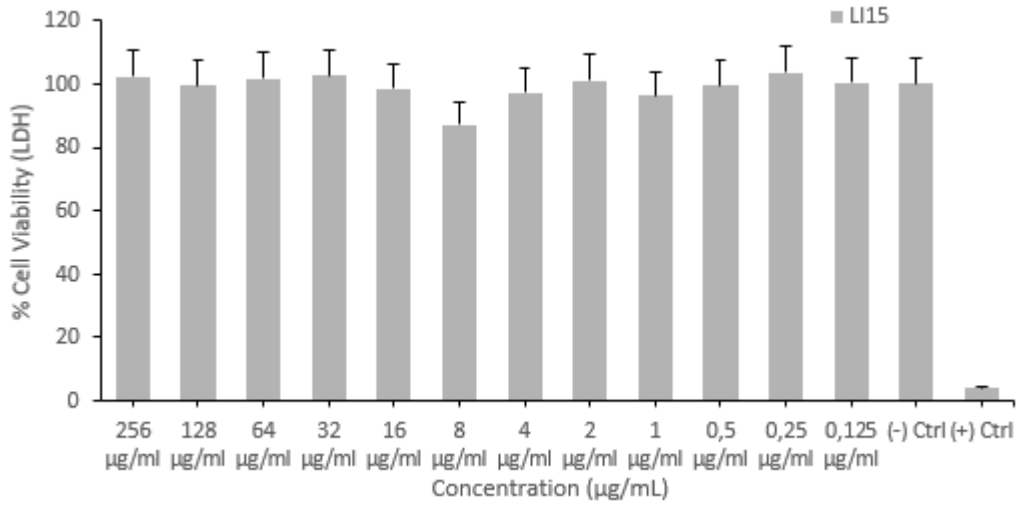
Şekil 4.19. HDFa Hücre Hattında 24 Saatlik Uygulamalarda LI-15’in MTT Hücre Canlılık Analizi.

4.13. LDH TESTİ

Bu çalışmada, LI-15 peptidinin hücre zar bütünlüğü üzerindeki potansiyel toksik etkileri LDH salınımına dayalı sitotoksikite testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, yüksek konsantrasyonlarda (özellikle 8 µg/mL ve üzeri) uygulanan LI-15 peptidinin, LDH salınımında sınırlı düzeyde bir artışa yol açtığını göstermiştir. Bu durum, hücre zarında kısmi bütünlük kaybına neden olabileceğini işaret etmekle birlikte, peptidin yüksek dozlarda membran hasarına neden olabileceği de düşündürmektedir. LDH testi sonuçlarımız şekil 4.20’de gösterilmiştir.

Bununla birlikte, orta ve düşük konsantrasyonlarda (4–0.125 µg/ml) LI-15 uygulamalarının LDH düzeyleri, negatif kontrol grubuna oldukça yakın bulunmuş ve anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu sonuçlar, peptidin söz konusu doz aralığında hücre zar bütünlüğünü koruduğunu ve toksik etki oluşturmadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, pozitif kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarına bakıldığında LDH salınımının oldukça düşük seviyelerde kalması, LI-15’in genel olarak iyi tolere edilen bir yapıya sahip olduğunu desteklemektedir.

Bu bulgular doğrusunda, LI-15 peptidinin düşük ve orta düzey dozlarda sitotoksik olmayan bir profil sergilediği gözlemlenmiştir. Bundan yola çıkarak biyolojik uygulamalarda güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.20. 24 Saatlik Uygulamalar İçin HDFA Hücre Hattında Sentezlenen LI-15 Peptitinin LDH Hücre Canlılık Analizleri

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, tasarım aşamasından başlayarak veri tabanlı filtreleme yöntemleriyle seçilen ve sentetik olarak elde edilen LI-15 adlı peptitin antimikrobiyal ve antibiyofilm potansiyeli değerlendirilmiştir. Peptidin hidrofobik oranı, net yükü, Boman indeksi ve peptit uzunluğu gibi biyofiziksel özelliklerinin, antimikrobiyal peptit veritabanlarındaki ideal parametre aralıklarıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Öte yandan LI-15 peptidi, hem Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) hem de Gram pozitif (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* MRSA) suşlar üzerinde yapılan deneylerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca, *Candida* türleri üzerinde de belirgin antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, peptidin geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan olabileceğini göstermektedir. LI-15 peptidinin antimikrobiyal özellik göstermesi, bu molekülün çeşitli mikroorganizmaların büyümesini engellediğini veya onları öldürebildiği anlamına gelmektedir. Bu özellik sayesinde, antibiyotik direncinin giderek arttığı ve günümüzde büyük bir sorun haline geldiği şu dönemlerde, yeni tedavi yöntemlerine olan ihtiyacı karşılamak açısından büyük önem taşımaktadır.

Bunlara ek olarak, yapılan MTT hücre canlılığı testlerinde LI-15'in belirli konsantrasyon aralıklarında sitotoksik etkisinin düşük olduğu ve hücre canlılığını büyük ölçüde koruduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında LI-15 peptidinin insan vücuduna negatif yönde bir tutum göstermemesi alternatif olarak kullanılmasında önemli ölçüde katkı sağlamaktadır.

Sonuç olarak, LI-15, antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin yanı sıra, düşük sitotoksikite profili ile dikkat çeken yeni nesil bir AMP adayı olarak literatüre kazandırılmıştır. Elde edilen bu bulgular, LI-15'in terapötik potansiyel taşıyan bir molekül olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması ile sentezlenen LI-15 peptidinin kullanıma geçirilebilmesi için farklı düzeylerde ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmalar aşağıda maddeler halinde sunulmuş ve gelecekte yapılacak araştırmalar için öneri niteliğinde belirtilmiştir.

1. LI-15'in MIC ve MBIC değerleri, klinik izolatlar üzerinde belirlenerek duyarlılık spektrumu genişletilmelidir.
2. Peptidin farklı mikroorganizmalardaki antibiyofilm etkisi detaylandırılmalıdır.
3. LI-15, rekombinant yöntemlerle üretim için uygun hale getirilerek verimlilik ve maliyet açısından optimize edilmelidir.
4. Hücre kültürü sistemlerinde farklı insan hücre hatları ile toksisite analizi genişletilmeli ve uzun süreli etki profili incelenmelidir.
5. Hayvan modelleri kullanılarak in vivo antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi test edilmeli ve özellikleri ortaya konulmalıdır.
6. İlaç taşıyıcı sistemlerle birlikte formüle edilerek, hedefe yönelik taşınım olanakları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ageitos, J. M., A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, and T. G. Villa. 2017. 'Antimicrobial Peptides (AMPs): Ancient Compounds That Represent Novel Weapons in the Fight against Bacteria'. *Biochemical pharmacology* 133: 117–38. doi:10.1016/J.BCP.2016.09.018.
- Akar¹, Sibel, Emel Öykü, Çetin Uyanıkgil², Yüksek Biyomühendis, Med J Sdu, / Sdü, and Tıp Fak Derg. 'ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN PROİNFLAMATUVAR YANITTAKİ POTANSİYELLERİ DERLEME REVIEW'. 2020(1): 145–53. doi:10.17343/sdutfd.641016.
- Akün, Suzan Elif, Umut Kökbaş, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Nevşehir Hacı Bektaş, Veli Üniversitesi, Hekimliği Fakültesi, and Temel Bilimler Bölümü. 2021. 'Antimikrobiyal Peptidler ve Tıpta Kullanım Alanları'. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 30(2): 53–58. doi:10.17827/aktd.775730.
- Alexander, J. Andrew N., Mariia Radaeva, Dustin T. King, Henry F. Chambers, Artem Cherkasov, Som S. Chatterjee, and Natalie C.J. Strynadka. 2020. 'Structural Analysis of Avibactam-Mediated Activation of the Bla and Mec Divergons in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus'. *The Journal of biological chemistry* 295(32): 10870–84. doi:10.1074/JBC.RA120.013029.
- Ansari, Firoz Ahmad, and Iqbal Ahmad. 2023. 'Microbial Biofilms: Unravel Their Potential for Agricultural Applications under Agro-Ecosystem'. *Understanding Microbial Biofilms: Fundamentals to Applications*: 59–70. doi:10.1016/B978-0-323-99977-9.00039-9.
- Bahar, Ali Adem, and Dacheng Ren. 2013. 'Antimicrobial Peptides'. *Pharmaceuticals* 2013, Vol. 6, Pages 1543-1575 6(12): 1543–75. doi:10.3390/PH6121543.
- Basu, Anirban, Priyanka Prasad, Subha Narayan Das, Sadaf Kalam, R. Z. Sayyed, M. S. Reddy, and Hesham El Enshasy. 2021. 'Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects'. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 1140 13(3): 1140. doi:10.3390/SU13031140.
- Bezar, Ian F., Ameya A. Mashruwala, Jeffrey M. Boyd, and Ann M. Stock. 2019. 'Drug-like Fragments Inhibit Agr-Mediated Virulence Expression in Staphylococcus Aureus'. *Scientific reports* 9(1). doi:10.1038/S41598-019-42853-Z.

- Burrows, Lori L. 2012. 'Pseudomonas Aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action'. *Annual Review of Microbiology* 66(Volume 66, 2012): 493–520. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-092611-150055/1.
- Chambers, Henry F. 1997. 'Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications'. *Clinical Microbiology Reviews* 10(4): 781–91. doi:10.1128/CMR.10.4.781;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- Chen, Liangliang, Tengfei Shen, Yongqing Liu, Jiangfei Zhou, Shuaibing Shi, Yang Wang, Zhanqin Zhao, et al. 2020. 'Enhancing the Antibacterial Activity of Antimicrobial Peptide PMAP-37(F34-R) by Cholesterol Modification'. *BMC veterinary research* 16(1). doi:10.1186/S12917-020-02630-X.
- Dean, Scott N., Barney M. Bishop, and Monique L. van Hoek. 2011. 'Natural and Synthetic Cathelicidin Peptides with Anti-Microbial and Anti-Biofilm Activity against Staphylococcus Aureus.' *BMC microbiology* 11(1): 114. doi:10.1186/1471-2180-11-114/FIGURES/4.
- Diseases-Special, AW TOPÇU - Türkiye Klinikleri Infectious, and undefined 2018. 'Biyofilm Nedir?' *turkiyeklinikleri.com*. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-what-is-biofilm--83796.html> (December 9, 2024).
- ERDOĞAN, Zeynep. 2020. 'Biyokoruyucu Ajan Olarak Antimikrobiyal Peptidler'. *Türkiye Klinikleri Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları - Özel Konular* 6(1): 49–55. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-biyokoruyucu-ajan-olarak-antimikrobiyal-peptidler-90678.html> (February 21, 2025).
- Ergin, Firuze, Gizem Yıldız, Emine Mine Çomak Göçer, Ahmet Küçükçetin Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, and Yazışmalardan Sorumlu Yazar. 'Bakteriyofajların Antibakteriyel Ajan Olarak Kullanımı'. doi:10.24323/akademik-gida.333674.
- Erkihun, Mulat, Zelalem Asmare, Kirubel Endalamew, Birhanu Getie, Teklehaimanot Kiros, and Ayenew Berhan. 2024. 'Medical Scope of Biofilm and Quorum Sensing during Biofilm Formation: Systematic Review'. *Bacteria 2024, Vol. 3, Pages 118-135* 3(3): 118–35. doi:10.3390/BACTERIA3030008.
- Faraji, Fatemeh, Mohammadreza Mahzounieh, Azizollah Ebrahimi, Fatemeh Fallah, Omid Teymournejad, and Behnaz Lajevardi. 2016. 'Molecular Detection of Virulence Genes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Children with Cystic Fibrosis and Burn Wounds in Iran'. *Microbial pathogenesis* 99: 1–4. doi:10.1016/J.MICPATH.2016.07.013.

- Gıda, Akademik, Mehmet Onur Kartal, Melike Baran Ekinci, Büşra Poyraz, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, and Gıda Mühendisliği Bölümü. 2021a. 'Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi'. *Akademik Gıda* 19(3): 353–63. doi:10.24323/AKADEMIK-GIDA.1011231.
- Gıda, Akademik, Mehmet Onur Kartal, Melike Baran Ekinci, Büşra Poyraz, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, and Gıda Mühendisliği Bölümü. 2021b. 'Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi'. *Akademik Gıda* 19(3): 353–63. doi:10.24323/AKADEMIK-GIDA.1011231.
- Hammami, Riadh, Abdelmajid Zouhir, Christophe Le Lay, Jeannette Ben Hamida, and Ismail Fliss. 2010. 'BACTIBASE Second Release: A Database and Tool Platform for Bacteriocin Characterization'. *BMC microbiology* 10. doi:10.1186/1471-2180-10-22.
- Jabłońska, Joanna, Adrian Augustyniak, Kamila Dubrowska, and Rafał Rakoczy. 2023. 'The Two Faces of Pyocyanin - Why and How to Steer Its Production?' *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 39(4): 103. doi:10.1007/S11274-023-03548-W.
- Jefferson, Kimberly K. 2004. 'What Drives Bacteria to Produce a Biofilm?' *FEMS Microbiology Letters* 236(2): 163–73. doi:10.1016/J.FEMSLE.2004.06.005.
- Kang, Xinyue, Fanyi Dong, Cheng Shi, Shicai Liu, Jian Sun, Jiaxin Chen, Haiqi Li, et al. 2019. 'DRAMP 2.0, an Updated Data Repository of Antimicrobial Peptides'. *Scientific data* 6(1). doi:10.1038/S41597-019-0154-Y.
- Kartal, MO, MB Ekinci, B Poyraz - Akademik Gıda, and undefined 2021. 'Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi'. *dergipark.org.tr*. <https://dergipark.org.tr/en/pub/akademik-gida/article/1011231> (December 9, 2024).
- Kayış, Uğur. 'Derleme (Review) Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları'.
- Kiliç, Tuğba, Başar Karaca, Arzu Çöleri Cihan, Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, and Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü. 2021. 'Abiyotik Yüzeylerde Termofilik *Anoxybacillus* *Rupiensis* DSM 17127T Suşunun Biyofilm Oluşumu ve Polistiren Yüzeyler Üzerindeki Biyofilm Yapısının Giderimi'. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 23(2): 455–70. doi:10.25092/BAUNFBED.893425.

- Lata, Manjul, Vrushti Telang, Pooja Gupta, Garima Pant, Mitra Kalyan, Jesu Arockiaraj, and Mukesh Pasupuleti. 2024. 'Synthetic Short Cryptic Antimicrobial Peptides as Templates for the Development of Novel Biotherapeutics Against WHO Priority Pathogen'. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 30(5): 1–13. doi:10.1007/S10989-024-10632-8/FIGURES/5.
- Li, Yujia, Mathiyazhagan Narayanan, Xiaojun Shi, Xinping Chen, Zhenlun Li, and Ying Ma. 2024. 'Biofilms Formation in Plant Growth-Promoting Bacteria for Alleviating Agro-Environmental Stress'. *Science of The Total Environment* 907: 167774. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.167774.
- Di Luca, Mariagrazia, Giuseppe Maccari, Giuseppantonio Maisetta, and Giovanna Batoni. 2015. 'BaAMPs: The Database of Biofilm-Active Antimicrobial Peptides'. *Biofouling* 31(2): 193–99. doi:10.1080/08927014.2015.1021340.
- Luo, Ying, and Yuzhu Song. 2021a. 'Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities'. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21): 11401. doi:10.3390/IJMS222111401.
- Luo, Ying, and Yuzhu Song. 2021b. 'Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities'. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21): 11401. doi:10.3390/IJMS222111401.
- Luo, Ying, and Yuzhu Song. 2021c. 'Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities'. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 11401 22(21): 11401. doi:10.3390/IJMS222111401.
- Mansour, Sarah C., César De La Fuente-Núñez, and Robert E.W. Hancock. 2015. 'Peptide IDR-1018: Modulating the Immune System and Targeting Bacterial Biofilms to Treat Antibiotic-Resistant Bacterial Infections'. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 21(5): 323–29. doi:10.1002/PSC.2708.
- Marques-Neto, Lázaro M., Monalisa M. Trentini, Rogério C. das Neves, Danilo P. Resende, Victor O. Procopio, Adeliane C. da Costa, André Kipnis, et al. 2018a. 'Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2, against Mycobacterium Massiliensis'. *Toxins* 2018, Vol. 10, Page 219 10(6): 219. doi:10.3390/TOXINS10060219.
- Marques-Neto, Lázaro M., Monalisa M. Trentini, Rogério C. das Neves, Danilo P. Resende, Victor O. Procopio, Adeliane C. da Costa, André Kipnis, et al. 2018b. 'Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2,

against *Mycobacterium Massiliensis*'. *Toxins* 2018, Vol. 10, Page 219 10(6): 219. doi:10.3390/TOXINS10060219.

Mattick, John S. 2002. 'Type IV Pili and Twitching Motility'. *Annual Review of Microbiology* 56(Volume 56, 2002): 289–314. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160938/CITE/REFWORKS.

Menousek, Joseph, Biswajit Mishra, Mark L. Hanke, Cortney E. Heim, Tammy Kielian, and Guangshun Wang. 2012. 'Database Screening and in Vivo Efficacy of Antimicrobial Peptides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* USA300'. *International journal of antimicrobial agents* 39(5): 402–6. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2012.02.003.

Ming, Liu, and Jian An Huang. 2017. 'The Antibacterial Effects of Antimicrobial Peptides OP-145 against Clinically Isolated Multi-Resistant Strains'. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70(6): JJID.2017.090. doi:10.7883/YOKEN.JJID.2017.090.

Mirzaei, Rasoul, Milad Abdi, and Hamid Gholami. 2020. 'The Host Metabolism Following Bacterial Biofilm: What Is the Mechanism of Action?' *Reviews and Research in Medical Microbiology* 31(4): 175–82. doi:10.1097/MRM.0000000000000216.

Mishra, Biswajit, and Guangshun Wang. 2012. 'Ab Initio Design of Potent Anti-MRSA Peptides Based on Database Filtering Technology'. *Journal of the American Chemical Society* 134(30): 12426–29. doi:10.1021/JA305644E.

Nailis, Heleen, Tom Coenye, Filip Van Nieuwerburgh, Dieter Deforce, and Hans J. Nelis. 2006. 'Development and Evaluation of Different Normalization Strategies for Gene Expression Studies in *Candida Albicans* Biofilms by Real-Time PCR'. *BMC molecular biology* 7. doi:10.1186/1471-2199-7-25.

do Nascimento Dias, Jhones, Fabián Andrés Hurtado Erazo, Lucinda J. Bessa, Peter Eaton, José Roberto de Souza de Almeida Leite, Hugo Costa Paes, André Moraes Nicola, Ildinete Silva-Pereira, and Patrícia Albuquerque. 2024. 'Synergic Effect of the Antimicrobial Peptide ToAP2 and Fluconazole on *Candida Albicans* Biofilms'. *International Journal of Molecular Sciences* 25(14): 7769. doi:10.3390/IJMS25147769/S1.

do Nascimento Dias, Jhones, Calliandra de Souza Silva, Alyne Rodrigues de Araújo, Jessica Maria Teles Souza, Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior, Wanessa Felix Cabral, Maria da Glória da Silva, et al. 2020. 'Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida Albicans* Planktonic

and Biofilm Cells'. *Scientific Reports* 2020 10:1 10(1): 1–14. doi:10.1038/s41598-020-67041-2.

Novick, Richard P., and Edward Geisinger. 2008. 'Quorum Sensing in Staphylococci'. *Annual Review of Genetics* 42: 541–64. doi:10.1146/ANNUREV.GENET.42.110807.091640,.

Overhage, Joerg, Andrea Campisano, Manjeet Bains, Ellen C.W. Torfs, Bernd H.A. Rehm, and Robert E.W. Hancock. 2008. 'Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation'. *Infection and Immunity* 76(9): 4176–82. doi:10.1128/IAI.00318-08/SUPPL_FILE/OVERHAGE_SUPPLEMENTAL_TABLE_1.ZIP.

Özdemir, Zafer Ömer. 2023. 'Antimikrobiyal Peptidler Özellikleri ve Kullanım Alanları'. *Sağlık Bilimleri Alanında Uluslararası Araştırmalar-III*. doi:10.58830/OZGUR.PUB129.C710.

Panayidou, Stavria, Kaliopi Georgiades, Theodoulakis Christofi, Stella Tamana, Vasilis J. Promponas, and Yiorgos Apidianakis. 2020. 'Pseudomonas Aeruginosa Core Metabolism Exerts a Widespread Growth-Independent Control on Virulence'. *Scientific reports* 10(1). doi:10.1038/S41598-020-66194-4.

Piotto, Stefano P., Lucia Sessa, Simona Concilio, and Pio Iannelli. 2012. 'YADAMP: Yet Another Database of Antimicrobial Peptides'. *International journal of antimicrobial agents* 39(4): 346–51. Doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2011.12.003.

Pirtskhalava, Malak, Anthony A. Armstrong, Maia Grigolava, Mindia Chubinidze, Evgenia Alimbarashvili, Boris Vishnepolsky, Andrei Gabrielian, et al. 2021. 'DBAASP v3: Database of Antimicrobial/Cytotoxic Activity and Structure of Peptides as a Resource for Development of New Therapeutics'. *Nucleic acids research* 49(D1): D288–97. doi:10.1093/NAR/GKAA991.

Rice, Louis B. 2012. 'Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones'. *Mayo Clinic Proceedings* 87(2): 198–208. doi:10.1016/j.mayocp.2011.12.003.

Ripperda, Thomas, Yangsheng Yu, Atul Verma, Elizabeth Klug, Michellie Thurman, St Patrick Reid, and Guangshun Wang. 2022. 'Improved Database Filtering Technology Enables More Efficient Ab Initio Design of Potent Peptides against Ebola Viruses'. *Pharmaceuticals* 2022, Vol. 15, Page 521 15(5): 521. doi:10.3390/PH15050521.

- Rossy, Tamara, Tania Distler, Lucas A. Meirelles, Joern Pezoldt, Jaemin Kim, Lorenzo Talà, Nikolaos Bouklas, Bart Deplancke, and Alexandre Persat. 2023. 'Pseudomonas Aeruginosa Type IV Pili Actively Induce Mucus Contraction to Form Biofilms in Tissue-Engineered Human Airways'. *PLOS Biology* 21(8): e3002209. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.3002209.
- Rütschlin, Sina, and Thomas Böttcher. 2020. 'Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior'. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 26(5): 964–79. doi:10.1002/CHEM.201901961.
- Samaranayake, Yuthika Hemamala, Becky P.K. Cheung, Joyce Y.Y. Yau, Shadow K.W. Yeung, and Lakshman P. Samaranayake. 2013. 'Human Serum Promotes Candida Albicans Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial'. *PloS one* 8(5). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0062902.
- Sharma, Arun, Pooja Gupta, Rakesh Kumar, and Anshu Bhardwaj. 2016. 'DPABBs: A Novel in Silico Approach for Predicting and Designing Anti-Biofilm Peptides'. *Scientific reports* 6. doi:10.1038/SREP21839.
- Smith, Roger S., and Barbara H. Iglewski. 2003. 'Pseudomonas Aeruginosa Quorum Sensing as a Potential Antimicrobial Target'. *Journal of Clinical Investigation* 112(10): 1460–65. doi:10.1172/JCI20364.
- Di Somma, Angela, Antonio Moretta, Carolina Canè, Arianna Cirillo, and Angela Duilio. 2020. 'Antimicrobial and Antibiofilm Peptides'. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 652 10(4): 652. doi:10.3390/BIOM10040652.
- Toder, D. S., M. J. Gambello, and B. H. Iglewski. 1991. 'Pseudomonas Aeruginosa LasA: A Second Elastase under the Transcriptional Control of LasR'. *Molecular Microbiology* 5(8): 2003–10. doi:10.1111/J.1365-2958.1991.TB00822.X.
- Torres, Marcelo D.T., Adriana F. Silva, Cibele N. Pedron, Margareth L. Capurro, Cesar de la Fuente-Nunez, and Vani X.Oliveira Junior. 2018. 'Peptide Design Enables Reengineering of an Inactive Wasp Venom Peptide into Synthetic Antiplasmodial Agents'. *ChemistrySelect* 3(21): 5859–63. doi:10.1002/SLCT.201800529.
- Torres, Marcelo D.T., Shanmugapriya Sothiselvam, Timothy K. Lu, and Cesar de la Fuente-Nunez. 2019. 'Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications'. *Journal of molecular biology* 431(18): 3547–67. doi:10.1016/J.JMB.2018.12.015.
- De Vos, Daniel, Antonio Lim, Jean Paul Pirnay, Marc Struelens, Christian Vandenvelde, Luc Duinslaeger, Alain Vanderkelen, and Pierre Cornelis. 1997. 'Direct Detection and Identification of Pseudomonas Aeruginosa in Clinical Samples Such as Skin

- Biopsy Specimens and Expectorations by Multiplex PCR Based on Two Outer Membrane Lipoprotein Genes, OprI and OprL'. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6): 1295–99. doi:10.1128/JCM.35.6.1295-1299.1997,.
- Wang, Guangshun. 2014. 'Human Antimicrobial Peptides and Proteins'. *Pharmaceuticals* 7(5): 545. doi:10.3390/PH7050545.
- Wang, Guangshun. 2023a. 'The Antimicrobial Peptide Database Is 20 Years Old: Recent Developments and Future Directions'. *Protein Science* 32(10): e4778. doi:10.1002/PRO.4778.
- Wang, Guangshun. 2023b. 'The Antimicrobial Peptide Database Is 20 Years Old: Recent Developments and Future Directions'. *Protein Science* 32(10): e4778. doi:10.1002/PRO.4778.
- Wang, Guangshun, Xia Li, and Zhe Wang. 2016. 'APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education'. *Nucleic acids research* 44(D1): D1087–93. doi:10.1093/NAR/GKV1278.
- Wang, Guangshun, C. Michael Zietz, Ashok Mudgapalli, Shuona Wang, and Zhe Wang. 2022. 'The Evolution of the Antimicrobial Peptide Database over 18 Years: Milestones and New Features'. *Protein Science* 31(1): 92–106. doi:10.1002/PRO.4185.
- Wang, Zhe, and Guangshun Wang. 2004. 'APD: The Antimicrobial Peptide Database'. *Nucleic Acids Research* 32(DATABASE ISS.). doi:10.1093/NAR/GKH025.
- Westerhoff, H. V., D. Juretic, R. W. Hendler, and M. Zasloff. 1989. 'Magainins and the Disruption of Membrane-Linked Free-Energy Transduction'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(17): 6597–6601. doi:10.1073/PNAS.86.17.6597.
- Yan, Tianyi, Fuqiu Li, Jinran Li, and Feng Chen. 2021. 'Antifungal Activity of ToAP2D Peptide Against *Sporothrix Globosa*'. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 761518. doi:10.3389/FBIOE.2021.761518/BIBTEX.
- Zhai, Hanfeng, and Jingjie Yeo. 2022. 'Computational Design of Antimicrobial Active Surfaces via Automated Bayesian Optimization'. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 9(1): 269–79. doi:10.1021/acsbiomaterials.2c01079.
- Zhang, Bo, Xiaoying Hu, Donglin Zhao, Yuping Wang, Jianhua Qu, Yue Tao, Zhonghui Kang, et al. 2024. 'Harnessing Microbial Biofilms in Soil Ecosystems: Enhancing

Nutrient Cycling, Stress Resilience, and Sustainable Agriculture'. *Journal of Environmental Management* 370: 122973. doi:10.1016/J.JENVMAN.2024.122973.

