



**YENİ PLEUROCİDİN TÜREVLERİNİN
KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL,
ANTİBİYOFİLM VE İMMUNMODÜLATÖR
ETKİLERİNİN *IN VITRO* ve *IN VIVO* ŞARTLARDA
BELİRLENMESİ**

Simay ALDAĞ

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

2025

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YENİ PLEUROCIDİN TÜREVLERİNİN KARAKTERİZASYONU,
ANTİMİKROBİYAL, ANTİBİYOFİLM VE İMMUNMODÜLATÖR
ETKİLERİNİN IN VITRO ve IN VIVO ŞARTLARDA BELİRLENMESİ**

Simay ALDAĞ

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

**YENİ PLEUROCIDİN TÜREVLERİNİN KARAKTERİZASYONU,
ANTİMİKROBİYAL, ANTİBİYOFİLM VE İMMUNMODÜLATÖR
ETKİLERİNİN IN VITRO ve IN VIVO ŞARTLARDA BELİRLENMESİ**

Doç. Dr. Ayşenur YAZICI danışmanlığında, Simay ALDAĞ tarafından hazırlanan bu çalışma 30 / 05 /2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye	: Doc. 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.

30 / 05 / 2025

İmzası

Simay ALDAĞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ PLEUROCIDİN TÜREVLERİNİN KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL, ANTİBİYOFİLM VE İMMUNMODÜLATÖR ETKİLERİNİN IN VITRO ve IN VIVO ŞARTLARDA BELİRLENMESİ

Simay ALDAĞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur YAZICI

Antimikrobiyal direnç, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırarak veya imkânsız hale getirerek küresel halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Antimikrobiyal direnç oluşumunun en önemli nedenlerinden biri biyofilmlerdir. Bu nedenle biyofilmlerle mücadele etmek ve yeni antibiyofilm ajanlarını keşfetmek büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında Pleurocidin peptidinden türetilmiş GK-11 ve LF-12 peptitlerinin karakterizasyonu, antimikrobiyal ve antibiyofilm özellikleri ile *Caenorhabditis elegans* model organizmasında immünmodülatör etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlarımızda, GK-11, *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300)'un büyümesini 64 µg/mL'de inhibe ederken, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)'yı 256 µg/mL'de inhibe etmiştir. Biyofilm oluşumunu ise sırasıyla 32 µg/mL ve 16 µg/mL'de inhibe etmiştir. LF-12 ise *S. aureus* ve *P. aeruginosa* büyümesini 256 µg/mL'de inhibe ederken, *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu 8 µg/mL'de engellemiştir. Her iki patojene karşı da antibiyofilm aktivitesi olan GK-11 peptidinin hemolitik ve sitotoksik etkilerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. *C. elegans*'a karşı ise toksik etkisi olmadığı ve enfeksiyon varlığında sağkalımı arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, GK-11 peptidi *C. elegans*'da *akt-1* geninin ekspresyon seviyesini düşürerek immünmodülatör etki göstermiştir. Sonuç olarak, yeni antibiyofilm peptit adayları belirlenmiş ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılabilecek potansiyelde oldukları ortaya koyulmuştur.

2025, 97 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antibiyofilm peptit, *C. elegans*, İmmünomodülatör etki, Pleurocidin

ABSTRACT

MS. Thesis

CHARACTERIZATION OF NEW PLEUROCIDIN DERIVATIVES AND DETERMINATION OF THEIR ANTIMICROBIAL, ANTIBIOTIC AND IMMUNOMODULATORY EFFECTS IN VITRO AND IN VIVO CONDITIONS

Simay ALDAĞ

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Antimicrobial resistance poses a serious threat to global public health by making it difficult or impossible to treat infections. One of the most important causes of antimicrobial resistance is biofilms. Therefore, it is of great importance to combat biofilms and discover new antibiofilm agents. In this thesis, the characterization, antimicrobial and antibiofilm properties of GK-11 and LF-12 peptides derived from pleurocidin peptide and their immunomodulatory effect in *Caenorhabditis elegans* model organism were evaluated. In our results, GK-11 inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) at 64 µg/mL and *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) at 256 µg/mL. Biofilm formation was inhibited at 32 µg/mL and 16 µg/mL, respectively. LF-12 inhibited the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* at 256 µg/mL and biofilm formation in *S. aureus* at 8 µg/mL. The hemolytic and cytotoxic effects of GK-11 peptide, which has antibiofilm activity against both pathogens, were found to be low. It was determined that it had no toxic effect against *C. elegans* and increased survival in the presence of infection. In addition, GK-11 peptide showed immunomodulatory effect by decreasing the expression level of *akt-1* gene in *C. elegans*. In conclusion, new antibiofilm peptide candidates were identified and their potential for use in biofilm-induced infections was demonstrated.

2025, 97 page

Keywords: Antibiofilm peptide, *C. elegans*, Immunomodulatory effect, Pleurocidin

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

Tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ayşenur YAZICI’ya bu süreci yalnızca bir tez çalışması değil, aynı zamanda bir öğrenme yolculuğuna dönüştürdüğü için teşekkür ederim.

Laboratuvar ve tez çalışmam süresince yardımları için Şeymanur ÇOBANOĞLU’na ve çalışmamdaki katkıları için Erdem ERKENEZ’e teşekkür ederim.

Tez sürecinde ve her zaman yanımda olan, bu zorlu yolculuğu kolay kılan değerli arkadaşlarım Ruhane TOSUNOĞLU ve Güler Tuba BUĞDACI’ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince manevi desteğini esirgemeyen Burak Muhammed ÖNER’e teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgi ve sabırla yanımda olan, başarılarımın gerçek sahipleri aileme; babam Sitemkar ALDAĞ’a, annem Fikriye ALDAĞ’a gönülden teşekkür ederim.

Simay ALDAĞ

Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Peptitler	1
1.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Keşfi.....	3
1.3. Antibiyofilm Peptitler	5
1.3.1. Biyofilm.	6
1.3.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları	7
1.3.3. Antibiyofilm Peptitlere Örnekler	8
1.4. <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
1.4.1. <i>C. elegans</i> Yaşam Şartları ve Yaşam Döngüsü.....	10
1.4.2. <i>C. elegans</i> Anatomisi	11
1.5. Patojenite Araştırmalarında <i>C. Elegans</i> 'ın Model Organizma Olarak Kullanılması	13
1.5.1. <i>C. elegans</i> 'ta İmmün Sistem	15
1.5.2. <i>C. elegans</i> 'ta Enfeksiyon Yolları ve Antimikrobiyal Cevap	16
1.5.3. <i>C. elegans</i> 'ta Antimikrobiyal Yanıtlar	16
1.5.4. <i>C. elegans</i> , Patojen Varlığında veya Çevresel Sinyaller Aldığında Temel Olarak 3 Yolak ile Cevap Verir; DAF-2, TGF- B ve MAPK Yolağı.	18
1.6. Tez Çalışmasının Amacı	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Cihazlar	32

3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Mikroorganizmalar ve Hücre Hattı	33
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları	33
3.1.3.1. Luria-Bertani (LB) Broth	33
3.1.3.2. Luria-Bertani Agar (LBA)	33
3.1.3.3. Mueller-Hinton Broth (MHB)	34
3.1.3.4 Mueller-Hinton Agar (MHA)	34
3.1.3.5 Triptik Soy Broth (TSB)	34
3.1.3.6. Patates Dekstroz Agar (PDA)	34
3.1.3.7. Plate Count Agar (PCA)	34
3.1.3.8. Nematode Growth Medium (NGM)	34
3.1.4. Biyofilm Testi Solüsyonları	35
3.1.4.1. %0,1'lik Kristal Viyole Boyası	35
3.1.4.2. %30'luk Asetik Asit	35
3.1.5. <i>C. elegans</i> deneylerinde Kullanılan Solüsyonlar	35
3.1.5.1. M9 Buffer	35
3.1.5.2. S Buffer	36
3.1.5.3. Yumuşak Agar Dondurma Çözeltisi	36
3.1.5.4. Floxuridine (5'-fluorodeoxyuridine, FUdR)	36
3.1.6. Primerler	36
3.1.6.1 Patojen Virülans Genlerinin Primerleri	36
3.1.6.2. <i>C. Elegans</i> Bağışıklık Genlerinin Primerler	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Tasarımı	38
3.2.2. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Sentezi	38
3.2.3. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Yaspısının ve Karakterizasyonunun Belirlenmesi	39
3.2.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	39
3.2.3.2. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi	39
3.2.4. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi	39
3.2.4.1. Bakteri ve Maya Suşlarının Kültüre Alınması	39
3.2.4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Mikrodilüsyon Testi ile Belirlenmesi	40

3.2.4.3. Antibiyofilm Aktivitenin Kristal Viyole (KV) ile Belirlenmesi	40
3.2.4.3.1. Peptitlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin (MBIC) Belirlenmesi	40
3.2.4.3.2. Biyofilm Eradikasyon Testi	41
3.2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	41
3.2.4.5. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve)	41
3.2.4.6. Bakteri Canlılık testi- SYTO 9 ve Propidyum İyodür Boyaması	42
3.2.4.7. CVDK- 8 testi	42
3.2.5. GK-11 Peptidinin PAO1 ve MRSA Virülans Genleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.2.5.1. Planktonik Kültür Hazırlanması.....	43
3.2.5.2. RNA İzolasyonu.....	43
3.2.5.3. c-DNA Sentezi	44
3.2.5.4. qRT-PCR.....	44
3.2.6. GK-11 Peptidinin Hemolitik ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	44
3.2.6.1. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	44
3.2.6.2. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi.....	45
3.2.6.2.1. Hücre Kültürü Koşullarının Hazırlanması	45
3.2.6.2.2. MTT Testi	45
3.2.6.2.3. LDH Testi	45
3.2.7. <i>In Vivo</i> Model Olan <i>C. elegans</i> 'ta GK-11 Peptidinin Toksik ve İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.7.1 <i>C. elegans</i> 'ın Kültüre Alınması.....	46
3.2.7.2. <i>C. elegans</i> Frozen Hazırlanması	46
3.2.7.3. <i>C. elegans</i> Yaş Senkronizasyonu	46
3.2.7.4. Toksisite Belirlenmesi.....	47
3.2.7.5. Yavaş Öldürme (Slow Killing) Testi	47
3.2.7.6. İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi	48
3.2.7.6.1. <i>C. elegans</i> 'lara Patojen ve Peptit Uygulanması	48
3.2.7.6.2. <i>C. elegans</i> 'lardan RNA İzolasyonu.....	48
3.2.7.6.3. c-DNA Sentezi	48
3.2.7.6.4. qRT-PCR.....	49

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	50
4.1. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Tasarımı	50
4.2. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Sentezi.....	52
4.3. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Yaspısının ve Karakterizasyonunun Belirlenmesi...	54
4.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	54
4.3.2. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi	55
4.4. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi	56
4.4.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Mikrodilüsyon Testi ile Belirlenmesi.....	56
4.4.2. Antibiyofilm Aktivitenin Kristal Viyole (KV) ile Belirlenmesi	58
4.4.2.1. Peptitlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin (MBIC) Belirlenmesi.....	58
4.4.2.2. Biyofilm Eradikasyon Testi	60
4.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	62
4.4.5. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve)	64
4.4.6. CVDK- 8 testi	65
4.4.7 Bakteri Canlılık testi- SYTO 9 ve Propidyum İyodür Boyaması	66
4.5. GK-11 Peptidinin PAO1 ve MRSA Virülans Genleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	67
4.6. GK-11 Peptidinin Hemolitik ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi	70
4.6.1. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	70
4.6.2. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi.....	72
4.6.2.1 MTT Testi	72
4.6.2.2. LDH Testi	72
4.7. <i>In Vivo</i> Model Olan <i>C. elegans</i> 'ta GK-11 Peptidinin Toksik ve İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi	73
4.7.1. Toksisite Belirlenmesi.....	73
4.7.2. Yavaş Öldürme (Slow Killing) Testi	74
4.7.3. İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi	77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

g	Gram
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
L	Litre
ng	Nanogram
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

aa	Aminoasit
ABP	Antbiyofilm peptit
AMP	Antimikrobiyal peptit
CFU	Koloni oluşturan birim
KV	Kristal Viyole
MBIC	Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Yoğunluk Algılama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptitlerin kaynaklarına, amino asit kompozisyonlarına, yapılarına ve aktivitelerine göre çeşitliliği	2
Şekil 1.2. AMP'lerin keşfinin zaman çizelgesi.	5
Şekil 1.3. Biyofilm oluşum aşamaları.....	7
Şekil 1.4. Farklı evrelerde <i>C. elegans</i> görüntüleri	11
Şekil.1.5. Hermafrodit <i>C. elegans</i> anatomisi	11
Şekil 1.6. <i>C. elegans</i> iç ve dış yapısı.	12
Şekil 1.7. <i>C. elegans</i> 'ı enfekte eden patojenler ve petojenlerin etkileri	13
Şekil 1.8. <i>C. elegans</i> bağışıklık yolları	18
Şekil 4.1. A: GK-11 ve B: LF-12 sentetik peptitlerinin pepfold analiz grafiği.	51
Şekil 4.2. A: GK-11 ve B: LF-12 peptidlerine ait helical wheel diagram'ı.	52
Şekil 4.3. GK-11 peptidine ait HPLC grafiği.	52
Şekil 4.4. GK-11 peptidine ait kütle spektroskopisi grafiği.	53
Şekil 4.5. LF-12 peptidine ait HPLC grafiği.	53
Şekil 4.6. LF-12 peptidine ait kütle spektroskopisi grafiği.	54
Şekil 4.7. GK-11 ve LF-12'nin FT-IR peak analiz grafikleri.	55
Şekil 4.8. Bestsel algoritması ile yapılan LF-12, GK-11 peptitlerinin analiz sonuçları. A: LF-12 B: GK-11.	56
Şekil 4.9. GK-11 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı MBIC grafiği.	59
Şekil 4.10. LF-12 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı MBIC grafiği.	59
Şekil 4.11. GK-11 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı biyofilm eradikasyon grafiği.	61
Şekil 4.12. LF-12 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı biyofilm eradikasyon grafiği.	61
Şekil 4.13. MRSA SEM görüntüleri. A. MRSA kontrol hücreleri. B. ½ MIC değerinde GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri. C. MIC değerinde GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri.	62
Şekil 4.14. GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri.	63

Şekil 4.15. PAO1 SEM görüntüleri. A. PAO1 kontrol hücreleri. B. ½ MIC değerinde GK-11 uygulanmış PAO1 hücreleri. C. MIC değerinde GK-11 uygulanmış PAO1 hücreleri.....	63
Şekil 4.16. GK-11 uygulaması yapılmış PAO1 öldürme kinetiği eğrisi.	64
Şekil 4.17. GK-11 uygulaması yapılmış MRSA öldürme kinetiği eğrisi.	65
Şekil 4.18. PAO1 ve MRSA bakteri hücrelerine CVDK-8 testi uygulaması sonucu plaka görüntüsü ve absorban _{s450} grafiği.	66
Şekil 4.19. GK-11 uygulanmış PAO1 ve MRSA floresan mikroskopu görüntüleri. A: PAO1 KONTROL, B: GK-11 uygulanmış PAO1 kültürü canlı hücreler, C: GK-11 uygulanmış ölü hücreler. D: MRSA kontrol, E: GK-11 uygulanmış MRSA kültürü canlı hücreler, F: GK-11 uygulanmış MRSA kültürü ölü hücreler.	67
Şekil 4.20. GK-11'in PAO1 virülans genlerinin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi.	68
Şekil 4.21. GK-11'in MRSA virülans genlerinin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi	69
Şekil 4.22. GK-11 peptidinin hemolitik aktivite testi plaka ve ependorf tüpü görüntüleri.	71
Şekil 4.23. GK-11 peptidine ait hemolitik aktivite testi absorban _{s405} ölçüm grafiği.....	71
Şekil 4.24. GK-11 peptidi MTT testi sonuç grafiği.	72
Şekil 4.25. GK-11 peptidi LDH testi sonuç grafiği.	73
Şekil 4.26. Yaşayan ve sağlıklı <i>C. elegans</i>	74
Şekil 4.27. Felç geçirmiş <i>C. elegans</i> 'lar.	74
Şekil 4.28. PAO1 ve MRSA patojenlerine karşı yavaş öldürme testi grafiği.....	75
Şekil 4.29. Ölü <i>C. elegans</i> 'lar.	76
Şekil 4.30. GK-11'in PAO1 patojenine karşı <i>C. elegans</i> immünomodülatör genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri.	77
Şekil 4.31. GK-11'in MRSA patojenine karşı <i>C. elegans</i> immünomodülatör genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri.	78
Şekil 4.32. GK-11'in <i>E.coli</i> OP50 ortamında <i>C. elegans</i> üzerinde immünomodülatör etkisinin belirlenmesi	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Cihazların adı ve modelleri.....	32
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan patojen mikroorganizmalar.	33
Çizelge 3.3. NGM besiyeri içeriği	35
Çizelge 3.4. S buffer içeriği	36
Çizelge 3.5. Patojen bakteriler için qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek olan genlere ait primerler.	37
Çizelge 3.6. <i>C.elegans</i> için qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek olan genlere ait primerler.....	38
Çizelge 4.1. Pleurocidin amino asit dizisi.	50
Çizelge 4.2. GK-11 ve LF-12 peptitlerinin amino asit dizileri.	51
Çizelge 4.3. GK-11 ve LF-12 peptidlerine ait molekül özellikleri.	54
Çizelge 4.4. GK-11 ve LF-12 peptitlerinin sekonder yapı tahminleri.	56
Çizelge 4.5. GK-11 ve LF-12 peptidinin patojen bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.	57
Çizelge 4.6. GK-11 ve LF-12 peptidinin patojen Candida suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.	58

1. GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, enfeksiyon hastalıklarında kullanılan antibiyotik ve türevi ilaçların patojen mikroorganizmalar üzerinde etkisiz kalması sonucu ortaya çıkan bir durumdur. İlaçların bilinçsiz ve aşırı kullanımı sonucu patojen mikroorganizmalar bu antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır ve bu durum enfeksiyon hastalıklarının daha zor bir şekilde tedavi edilmesine hatta bazı durumlarda tedavi edilememesine neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2050 yılına kadar antimikrobiyal dirence karşı kullanılabilecek potansiyel madde bulunmazsa, dünya genelinde birincil ölüm nedeninin antimikrobiyal direnç olacağı ve yılda yaklaşık 10 milyon ölümün bu yüzden gerçekleşeceği tahmininde bulunmaktadır (Tang, Millar, and Moore 2023). 2019 yılında ise antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm sayısı 1,2 milyonu aşmıştır (Murray et al. 2022). Bu durum göz önüne alındığında antimikrobiyal peptitler ve antibiyofilm peptitler umut ışığı olarak görülmektedir. Antimikrobiyal peptit keşfi antibiyotiklerden daha öncedir ancak antibiyotik keşfi ile peptitler bu konuda biraz daha geride kalmıştır. Ancak günümüzde enfeksiyonel hastalıklara karşı antibiyotiklerin artık yetersiz kalması antimikrobiyal ve antibiyofilm peptitler üzerine olan çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur.

1.1. Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptit (AMP)'ler mikroorganizmalardan bitkiler ve hayvanlara kadar birçok yaşam formu tarafından sentezlenir ve geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptirler (Cheng et al. 2024). AMP'ler virüsler, bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli patojenlere karşı savunmada rol almaktadır (Bucataru and Ciobanasu 2024). Ayrıca omurgalılarda konak hücresel bağışıklığını düzenlemede rol oynarlar ve memelilerde mikrobiyom bileşimini şekillendirmektedirler (Zhang and Gallo 2016).

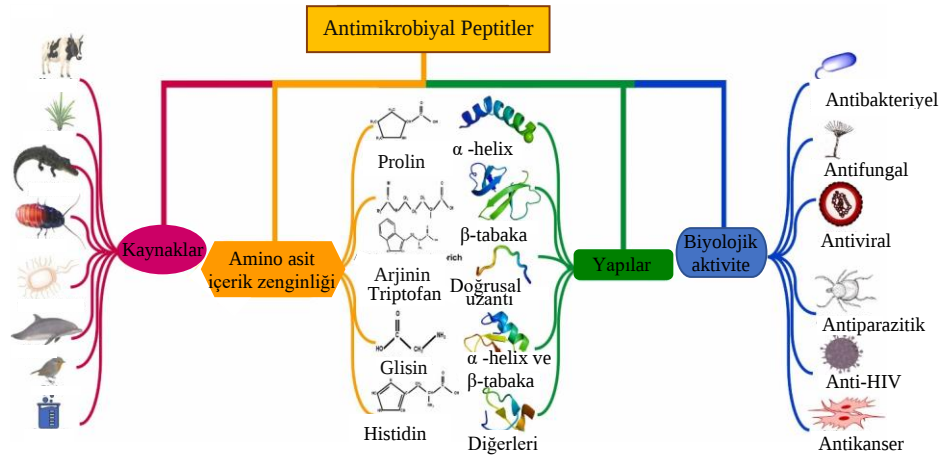
AMP'ler çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikler AMP'lerin antimikrobiyal derecesi üzerinde etkilidir. Bu özellikler;

- Sentezlendikleri yere göre; ribozomal veya non-ribozomal,

1. GİRİŞ

- Kaynaklarına göre; hayvanlar (böcekler, balıklar, memeliler, kuş vd.) bitkiler, mantarlar, bakteriler, tasarım (sentetik) peptitler,
- Moleküler hedef olarak; hücre yüzeyi veya hücre içi,
- Net yük olarak; katyonik, anyonik veya nötr,
- Hidrofobik karakter olarak; hidrofobik, hidrofilik, amfipatik,
- Fonksiyonuna göre; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparazitik, yara iyileştirme gibi özellikler,
- Yapılarına göre; α -heliks, β -tabaka, loop ve extended olarak bulunmaktadır (Akar and Çetin Uyanıkgil 2020) (Ahmed and Hammami 2019).

AMP'lerin net yük olarak özellikle katyonik yükte olması, peptit ile patojenlerin yüzey lipid zarlarındaki anyonik bileşenlerle etkileşimi açısından önemlidir. Bu elektrostatik çekim patojenin membranına karşı ilk atağı gerçekleştirir (Izadpanah and Gallo 2005). Membranla etkileşime girmenin peşine membran bozulması farklı yollarla gerçekleştirilir bunlar; “Varil çitası” modeli, “Toroidal gözenek” modeli, deterjan benzeri “Halı” mekanizması olarak adlandırılmaktadır. (Sato and Feix 2006). Bu bozulmalar sonucunda hücre lizisi meydana gelir. Bazı peptitler ise membranda gözenek oluşturmadan, hücre zarından geçerek ardından DNA, RNA veya protein sentezini bozarak patojen mikroorganizmaları öldürmektedir (Lei et al. 2019).



Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptitlerin kaynaklarına, amino asit kompozisyonlarına, yapılarına ve aktivitelere göre çeşitliliği (Chettri et al. 2024).

1.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Keşfi

Alexander Fleming tarafından keşfedilen Lizozim (1922) ve nisin (1928) keşfedilen ilk antimikrobiyal polipeptitlerdir. İlk antimikrobiyal peptit olan gramicidin, René J Dubos tarafından 1939 yılında topraktan izole edilen *Bacillus brevis*’de keşfedilmiştir. Gram (+) olan bu suş birçok Gram (+) bakteri türünün liziz edilmesini sağlamıştır (Dubos 1939; Mohaideen, Vaani, and Hemalatha 2023). Gramicidin klinik olarak test edilen ve ticari olarak üretilen ilk AMP olarak kabul edilmektedir (Rodríguez et al. 2021a).

1942 yılında ise *Triticum aestivum* bitkisinden purothionin AMP’si izole edilmiştir. Purothionin, AMP açısından Tiyonin süper ailesi içerisindedir, antifungal ve antibakteriyel etkileri bulunmaktadır (Balls, Hale, and Harris 1942) (Santos-Silva et al. 2020). Tiyoninler ise bitki aleminde dağılmıştır, patojenik etki gösteren bakteri, mantar ve mayalara karşı toksik etkisi bulunmaktadır. Sistein açısından zengin bazik peptitlerdir (Rodríguez et al. 2021b).

Polimiksin B ve E (kolistin) ribozomal olmayan AMP’lerdir, bir toprak bakterisi olan *Aenibacillus polymyxa*’da keşfedilmiştir (Gause 1946). Bu AMP’ler patojen Gram (-) bakterilere karşı son çare olarak kullanılmaktadır, 1970’lerde ise nefrotoksisite nedeni ile daha az toksisiteye sahip daha etkili antibiyotik arayışına geçilmiştir (Poirel, Jayol, and Nordmann 2017).

1956 yılında hayvansal kökenli ilk AMP, tavşan lökositlerinden izole edilmiş defensinlerdir (Hirsch 1956).

Böceklerde AMP’ler üzerine yapılan çalışmalarda peptitlerin genellikle bazik karakterde olduğu ve 20-40 amino asit (aa) uzunluğunda olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal özellikte olan peptitler ise daha az aa sayısına sahip olabilmektedir. Prolin ve glisin açısından zengin peptitler genellikle Gram (-) bakterilere karşı etkili olduğu, Gram (+) bakterilere karşı ise katyonik ve arginin bakımından zengin defensinlerin seçici olarak etkili olduğu bilinmektedir. Cecropinler ise her iki bakteri grubu için de etkilidir (Wu, Patočka, and Kuča 2018)(Otvos Laszlo 2000) . Cecropinler 1980’de ilk olarak Dev

1. GİRİŞ

ipek böceği *Hyalophora cecropia* güvesinin hemolenfinde (böcek kanı) keşfedilmiştir (Hultmark et al. 1980).

1985 yılında insan nötrofillerinde HNP-1, HNP-2 ve HNP-3 antimikrobiyal peptitleri keşfedilmiştir (Selsted et al. 1985). Memelilerde bulunan ilk alfa-defensin olan bu AMP'lerin karışımı *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı yapılan *in vitro* çalışmalarda bakterisidal etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca Tip 1 Herpes simpleks virüsünü inaktive etmiştir. Peptitler ayrı ayrı çalışıldığında HNP-1 ve HNP-2 HNP 1-2 kadar etkili bakterisidal etki göstermiştir, HNP-3 ise diğerlerine göre daha az etki etmiştir (Ganz et al. 1985).

1987 yılında ise Afrika kurbağası *Xenopus laevis*'in deri salgılarındaki AMP olan magaininler keşfedilmiştir (Soravia, Martini, and Zasloff 1988). Geniş spektrumda antimikrobiyal etkisi olan bu AMP ailesinin keşfi ile kurbağa derisi bir AMP kaynağı olarak görülüp üzerinde çalışmalara yoğunlaştırılmıştır (Mangoni and Casciaro 2020).

Trakeal antimikrobiyal peptit (TAP), memeli trakeal mukozasından izole edilmiştir ve bilinen ilk beta-defensin olarak kabul edilmiştir. Antibakteriyel ve antifungal özelliği bulunan bu peptidi kodlayan mRNA'nın solunum mukozasında tüm akciğer dokusuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Diamond et al. 1991).

1995 yılında ilk insan cathelicidin benzeri peptit FALL-39 (LL-37) keşfedilmiştir. FALL-39 geninin asıl olarak insan kemik iliğinde ve testiste ifade edildiği ayrıca *Escherichia coli* ve *Bacillus megaterium*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Agerberth et al. 1995). Ardından peptidin aktif formunun N-terminalinde iki adet lösin ve 37 aa uzunluğunda olmasından kaynaklı bu peptidin ismi LL-37 olarak değiştirilmiştir. LL-37 bağırsak hücreleri, solunum epitel hücreleri, cilt, karaciğer gibi birçok doku ve organda ifade edilir ve sadece antimikrobiyal aktiviteye değil aynı zamanda bağışıklık ve canlıda büyüme ile ilgili aktivitelerde de etkilidir (Morizane and Gallo 2012).

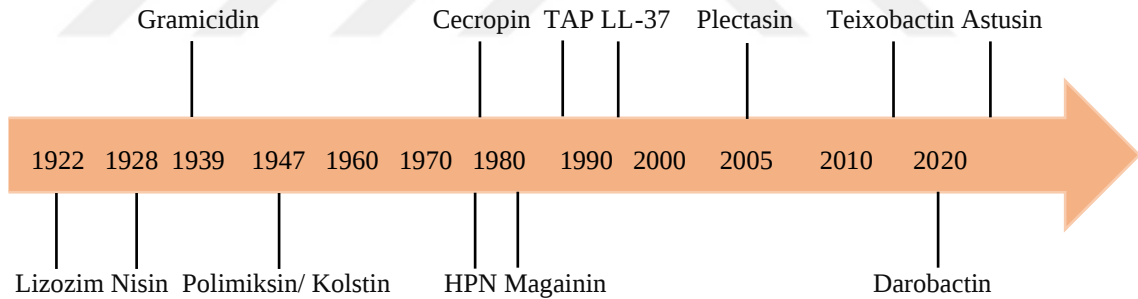
Mantardan izole edilen ilk defensin AMP olan plectasin *Pseudoplectania nigrella*'dan izole edilmiştir. Rekombinat olarak çok yüksek verim ve saflıkta üretilen

1. GİRİŞ

plectasin özellikle *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı etkili olduğu görülmüş ve farelerde peritonit ve zatürre hastalıklarında iyileştirici etkide bulunduğu belirlenmiştir (Mygind et al. 2005).

Kültürülenmeyen bakterilerden, bir β -proteobakteri türü olan *Eleftheria terrae*'den teixobactin adlı AMP elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarla teixobactine dirençli *Staphylococcus aureus* veya *Mycobacterium tuberculosis* mutantları elde edilmemiştir. Teixobactin, lipid II (peptidoglikanın öncüsü) ve lipid III'e (hücre duvarı teikoik asidinin öncüsü) bağlanır hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkisini gösterir (Ling et al. 2015).

2019 yılında entomopatojenik nematod mikrobiyomlarının *Photorhabdus* simbiyontları ile yapılan çalışmada *Photorhabdus khaini*'den darobactin adlı AMP keşfedilmiştir. AMP, özellikle Gram (+) patojenlere karşı etkili olduğu *in vitro* ve hayvan deneyleri ile tespit edilmiştir (Imai et al. 2019).



Şekil 1.2. AMP'lerin keşfinin zaman çizelgesi.

1.3. Antibiyofilm Peptitler

Antibiyofilm peptitler, patojen mikroorganizmalar kaynaklı oluşacak biyofilmi engelleyen veya oluşmuş biyofilmi bozabilen peptitlerdir. Antibiyofilm mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte bilinen birkaç mekanizma ile bu etkilerini gerçekleştirmektedirler. 1) mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını engelleyip böylelikle biyofilm oluşumunu da erken aşamalarda engellemiş olurlar. 2) Quorum sensing (hücreler arası iletişim) sinyallerini engelleyerek biyofilm oluşumu engellerler.

3) Matrix bileşenleri parçalarlar ve oluşmuş biyofilmi temizlerler (Li et al. 2022), (Haney et al. 2015).

Doğada mikroorganizmaların çoğu biyofilm formunda yaşamaktadır. Enfeksiyonel hastalıkların zor tedavi edilmesinin en büyük sebeplerinden biri de bu durumdur (Li, Chen, and Lin 2021a). Biyofilmlerin antibiyotiklere karşı daha dirençli olması (Costerton, Stewart, and Greenberg 1999) ve platonik durumdaki patojen mikroorganizmalarda da antimikrobiyal direnç oluşumu, enfeksiyonel hastalıkların tedavisini günümüzde gittikçe zor hale getirmektedir. Bu nedenle, antibiyofilm etkili peptitler bu sorunlara karşı çözüm olarak karşımıza çıkmaktadır (Li et al. 2021a).

1.3.1. Biyofilm

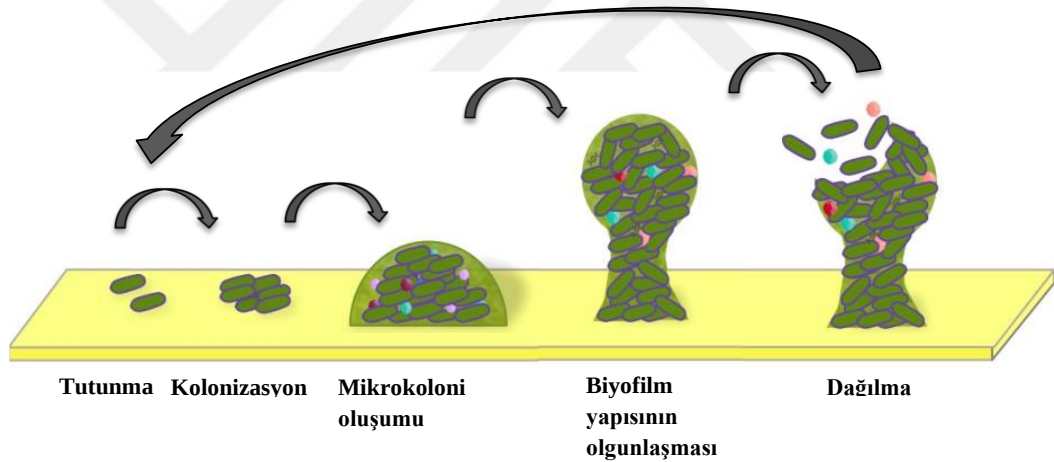
Biyofilm, mikroorganizmaların kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) içinde, biyotik-abiyotik bir yüzeye veya birbirlerine tutunarak oluşturdukları yaşam formudur (Bakke et al. 1984) (Flemming et al. 2016). EPS, polisakkaritler, proteinler, lipitler ve nükleik asitleri (RNA ve eDNA) içermektedir (Flemming and Wingender 2010). Biyofilmler tek tür mikroorganizma içerebildiği gibi genelde farklı türde mikroorganizmaların bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Moons, Michiels, and Aertsen 2009). Mikroorganizmalar biyofilm yapıları sayesinde kendilerini besin yetersizliği (Marsden et al. 2017), antibiyotik, ultraviyole (UV) radyasyonu (de Carvalho 2017), yüksek pH, yüksek-düşük sıcaklık (Hošťacká, Čižnár, and Štefkovičová 2010) ve farklı basınç koşulları gibi çeşitli çevresel stres koşullarına karşı korumaktadır (Yin et al. 2019). Mikroorganizmanın biyolojik aktivitesine göre biyofilm oluşturması olumlu ya da olumsuz olarak görülebilir. Örneğin insan bağırsak mikrobiyotasında yararlı mikroorganizmaların biyofilm oluşturması istenen bir durum iken patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaması istenmektedir (Jones and Versalovic 2009).

Biyofilmler hastane kaynaklı ve kronik enfeksiyonların temelini oluşturmaktadır (Dsouza, Dinesh, and Sharma 2024). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda Gram (-) bakterilerden özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*, Gram (+) bakterilerden özellikle *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermis (Sukmarini, Atikana, and Hertiani 2024a; Sun et al. 2013), mayalardan ise *Candida albicans* gibi patojenler ön plana çıkmaktadır (Nobile and Johnson 2015).

1.3.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu ve yapısı mikroorganizmaların türüne ve suşuna göre aynı zamanda bulundukları çevre şartları ve stres koşullarına göre değişebilmektedir (Liu, Prentice, and Webber 2024a). Ancak bir yüzeye bağlı olarak oluşan biyofilm 5 aşamadan oluşabilmektedir. Planktonik mikroorganizmalar bir yüzeye tutunur ve aşamalar şu şekilde gerçekleşir: tutunma, kolonizasyon, mikrokoloni oluşumu, biyofilm yapısının olgunlaşması ve dağılma (Tolker-Nielsen 2015).



Şekil 1.3. Biyofilm oluşum aşamaları (Yazar tarafından hazırlanmıştır, yayınlanmadı)

Başlangıçta mikroorganizmalar yüzeye geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak tutunur. Hidrofobik-hidrofilik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, sterik etkileşimler ve elektronik etkileşimler tutunma aşamasını yönetmektedir. Hücre yüzeyi hidrofobitesi arttıkça geri dönüşümsüz tutunmaya eğilim artmaktadır (Garrett, Bhakoo, and Zhang 2008; Liu et al. 2004). Flagella, fimbria ve pili gibi uzantılar ise Mikroorganizmaların geri dönüşümlü olarak yüzeye tutunmasını sağlamaktadır (Sukmarini, Atikana, and Hertiani 2024b).

Mikroorganizmalarda bulundukları ortamda çevresel değişikliğe karşı gen ifadesine düzenlemeler gerçekleşmektedir. Bu durumun sonucunda EPS salgılayıp bu yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunma eğilimine geçerler. Biyofilmin bu oluşum aşamasında mikrobiyal hareketliliği sağlayan flagella sentezi de engellenmektedir (Guttenplan and Kearns 2013). Tutunmanın ardından kolonizasyon aşaması gerçekleşir mikrokoloni oluşumu aşaması ise QS iletişiminin başladığı aşamadır. Burada popülasyon yoğunluğuna göre sinyalleşme ve haberleşme durumu gerçekleşmektedir.

Mikrokoloni oluşumunun ardından olgun biyofilm aşaması oluşmaktadır. Biyofilmler su kanalları ve gözeneklere sahiptirler. Bu yapılar sayesinde besin maddeleri ve atıkların biyofilm boyunca dolaşımını sağlamaktadır (Quan et al. 2022). Biyofilm yapısı içinde mikroorganizmalar bir süre beslenebilir, varlığını sürdürebilir. Bir süre sonra biyofilm yapısı büyür, besin yetersizliği başlar ve biyofilm yapısı son aşama olarak dağılır. Dağılan biyofilm içindeki mikroorganizmalar planktonik aşamaya geçer ve bir döngü gibi planktonik yaşam- biyofilm döngüsü devam eder (Gerbersdorf and Wieprecht 2015).

1.3.3. Antibiyofilm Peptidlere Örnekler

Biyofilmler zatürre, idrar yolu enfeksiyonları, diş çürükleri, hastane kaynaklı enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların zor bir şekilde tedavi edilmesinin nedenidir (Vuong and Otto 2002). Bu tür hastalıklardan biri ise kistik fibrozistir ve bu hastalarda genel olarak bağışıklık sistemi zayıflamış olması nedeniyle kronik enfeksiyonlardan sonra %80-95 oranında ölüm görülmektedir (Lyczak, Cannon, and Pier 2002) .

Antbiyofilm etkisinin olduğu tespit edilen LL-37 en çok çalışma yapılan AMP'lerden biridir ve MIC değerinin altındaki değerlerde iyi bir şekilde antibiyofilm özellik göstermektedir (Jacobsen and Jenssen 2012).

Bir çalışmada LL-37'den türevlenmiş bir peptit olan P60.4Ac'den peptitler üretilmiştir. Sentetik olarak üretilen peptitlerden (peptit 10) P10 ve P60.4Ac peptitleri LL-37 kadar antibiyofilm etkili olduğu tespit edilmiştir ve biyofilm etkili bakterileri

ortadan kaldırmada P10 ve P60.4Ac'nin LL-37'den daha etkili olduğu görülmüştür (Haisma et al. 2014).

İnsan karaciğerinden türetilen bir peptit olan hepsidin 20 (hep20)'nin antibakteriyel etkisi *Staphylococcus epidermidis* biyofilmlerine karşı denendiğinde antibiyofilm etki sağladığı görülmüştür (Brancatisano et al. 2014).

Nematod *Caenorhabditis elegans*'ı ve böcek *Galleria mellonella*'yı ölümcül *P. aeruginosa* enfeksiyonlarından koruyan ve incelenen diğer peptitlerden 10 kat daha dayanıklı olan bir peptit tasarlanmıştır. D-enantiyomerik, antibiyofilm etkili peptitlerden DJK-5 ve DJK-6 kodlu olan peptitler en iyi aktiviteyi göstermiştir. Bu peptitler hem biyofilm oluşumunu engellemede hem de var olan biyofilmi temizlemede etkilidir (De La Fuente-Núñez et al. 2015).

RR4 ve D-enantiyomeri olan D-RR4 adlı tasarlanmış peptitleri ile yapılan çalışmada D-RR4, kistik fibröz hastalarından izole edilen *P. aeruginosa*'ya karşı güçlü bir aktivite göstermiştir. Biyofilm bozucu etkileri incelendiğinde 24 saatlik biyofilm oluşumunu artan konsantrasyonla beraber önemli derece bozduğu görülmüştür. Peptitlerin *in vivo* etkinliğinin test edilmesi için *C. elegans* enfeksiyon modeli kullanılarak *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarına karşı denenmiştir. D-RR4'ün $8 \times \text{MIC}$ 'te (MIC 2 ila 8 μM arasındadır) *P. aeruginosa*'nın nematoda yaptığı bakteriyel yükü %85 azalttığı görülmüştür. D-RR4 kolistinle birleştirildiğinde nematodların tamamen bakterilerden temizlendiği görülmüştür (Mohamed et al. 2017).

1.4. *Caenorhabditis elegans*

C. elegans genellikle doğada çürümüş bitkilerin bulunduğu ortamlardan, kompostlardan ve daha zor olacak şekilde topraktan izole edilmiştir ancak adı yine de literatürde toprak nematodu olarak geçmektedir. Laboratuvar ortamında kullanılan vahşi tip *C. elegans* N2 nematodu Warwick Nicholas tarafından ilk olarak 1956 yılında İngiltere'de mantar kompostundan izole edilmiştir (Caswell-Chen et al. 2005; Leslie 2005).

C. elegans'ın bir model organizma olarak kullanılması 1965 yılında Sydney Brenner'in hayvan gelişimini ve davranışlarını incelemek için *C. elegans*'ı seçmesiyle bu nematodun model organizma olarak popüler şekilde kullanımı günümüze kadar gelmiştir. Ancak bu tarihten önce de *C. elegans* ile deneysel çalışmalar yapılmıştır (Brenner 1974; Nigon and Félix 2018).

1.4.1. *C. elegans*'ın Yaşam Şartları ve Yaşam Döngüsü

C. elegans laboratuvar ortamında, patojenik olmayan, *Escherichia coli* OP50 bakterisinin besin kaynağı olduğu katı ya da sıvı besiyerlerinde (genellikle NGM) yetiştirilebilir. Yetişkinlerinin boyu 1-2 mm uzunluğundadır, ortamın sıcaklığına (15°C–25°C) bağlı olarak yaklaşık 2,5-4 günlük bir yaşam döngüsüne ve 2-3 hafta yaşam süresine sahiptirler (Gómez-Orte et al. 2017).

C. elegans yaşam süresi boyunca yaklaşık 300 yavru oluşturabilir. Yumurta, 4 larval evre (L1-L4), yetişkin ve ortam koşulları ideal olmadığı durumlarda dauer aşaması olmak üzere farklı aşamaları geçirir (Fielenbach and Antebi 2008). Yetişkin bir *C. elegans* yumurtasını ortama bıraktıktan sonra ortam sıcaklığı 25°C iken yumurta yaklaşık 8 saat sonra çatlar ve L1 aşamasına geçer, 12 saat sonra L2, 7 saat sonra L3, 7 saat sonra L4 ve 9 saat sonra yetişkin olurlar (Pandey and Pandey 2014). Bir aşamadan diğer aşamaya geçildiğinde faringeal pompalama durur ve *C. elegans* yaşamsal olarak bir uyumsuzluk yaşar bu evreye lathergus denilmektedir (Raizen et al. 2008). Ortamda yeterli besin olmaması veya ortam sıcaklığının 27°C'nin üstüne çıkması gibi stres durumlarda da *C. elegans* dauer (Almanca 'dayanıklı') (Yue et al. 2021) aşamasına geçip ve ortam şartları düzeldiğinde yaşam döngüsüne devam etmektedir. Dauer aşamasında normalde 2-3 haftalık olan yaşam süresi 4 -8 katı kadar yaşam süresine çıkabilir (Wang et al. 2009). Kısa nesil döngüsü sayesinde genetik, immünolojik gibi çalışmaların deney süresini azaltacağı için bu canlının model organizma olarak kullanılması avantaj sağlayacaktır (Apfeld and Alper 2018) .

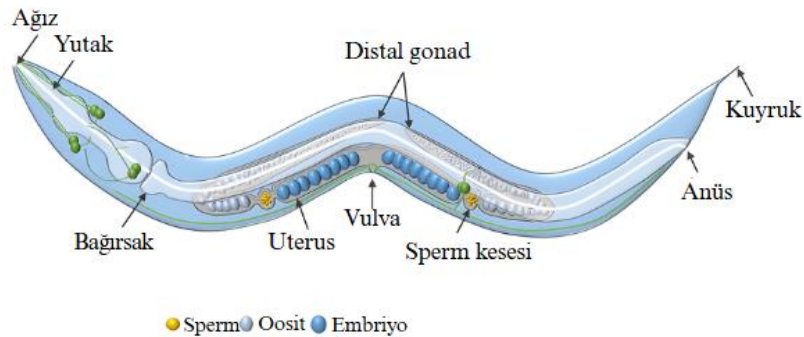


Şekil 1.4. Farklı evrelerde *C. elegans* görüntüleri (yazar tarafından görüntülenmiştir.)

1.4.2. *C. elegans* Anatomisi

C. elegans'larda hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cins bulunmaktadır (Emmons 2014). Yetişkin *C. elegans* yaklaşık 1000 somatik hücreye (hermafroditlerde 959, erkeklerde 1031), 1000-2000 germ hücresine sahiptir (Giunti et al. 2021) (Alberts et al. 2002).

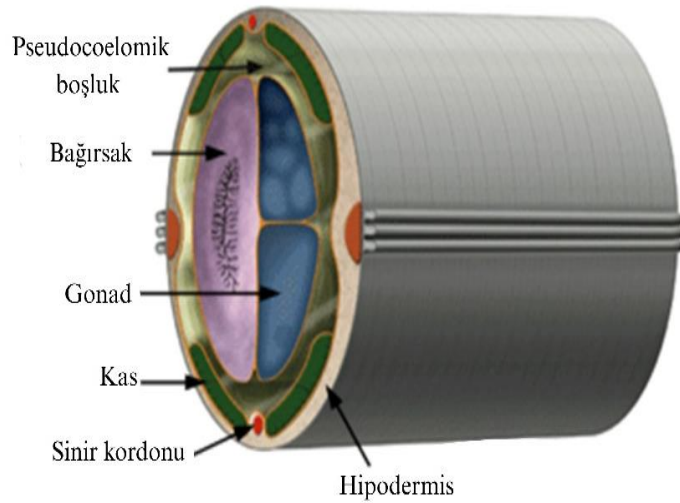
C. elegans'ların beslenme, dışkılama, koku, tat, sıcaklığa karşı tepkiler, hafıza ve öğrenme gibi özellikleri bulunmaktadır (Roman et al. 2023). Koku ile ilgili yapılan bir çalışmada *C. elegans*'ın patojen maruziyetinden sonra patojen kokularından kaçındığı, patojen olmayan ve besin olarak kullandığı bakterilere karşı ise ilgisinin olduğu görülmüştür (Zhang, Lu, and Bargmann 2005).



Şekil.1.5. Hermafrodit *C. elegans* anatomisi (Chege and McColl 2014).

1. GİRİŞ

Vücutları silindirik ve sivrilmiş bir yapıdadır. İskelet, dolaşım, solunum sistemleri yoktur. İskelet sistemi yerine görev gören hidrostatik basınç vardır bu da ‘hidrostatik iskelet’ olarak adlandırılmaktadır. Yetişkinleri genelde 1 mm uzunluğunda ve 0,2 mm çapındadır (Meneely, Dahlberg, and Rose 2019a). Dış tüp ve iç tüp olarak vücut yapısı ayrılmaktadır, dış tüp denilen kısmı vücut duvarı kısmıdır. Dış tüp, hipodermis (epitel hücrelerden oluşan tabaka) ile çevrilidir ve kütikül (çoğunlukla kolojenlerden oluşan protein yapısı) ile korunur. Kas, sinir sistemi, üreme, boşaltım/salgı sisteminden oluşmaktadır Vücut duvarının alt kısmında ventral ve dorsal kısmında iki adet olmak üzere kas hücreleri dört sıra halinde bulunmaktadır (Kimble and Nüsslein-Volhard 2022) (Nicholas and Hodgkin 2004a). Vücut uzunluğu boyunca dorsal ve ventral orta hattında ana sinir kordonu bulunmaktadır. İç kısmında pseudocoelomik boşluk olarak adlandırılan bağırsak ve gonadı çevreleyen sıvı dolu bir boşluk yer almaktadır. İç tüp kısmında yutak ve bağırsak bulunmaktadır. Bağırsaktaki besinler pseudocoelomik boşluğa salınır ve diğer hücreler tarafından alınır (Nicholas and Hodgkin 2004).



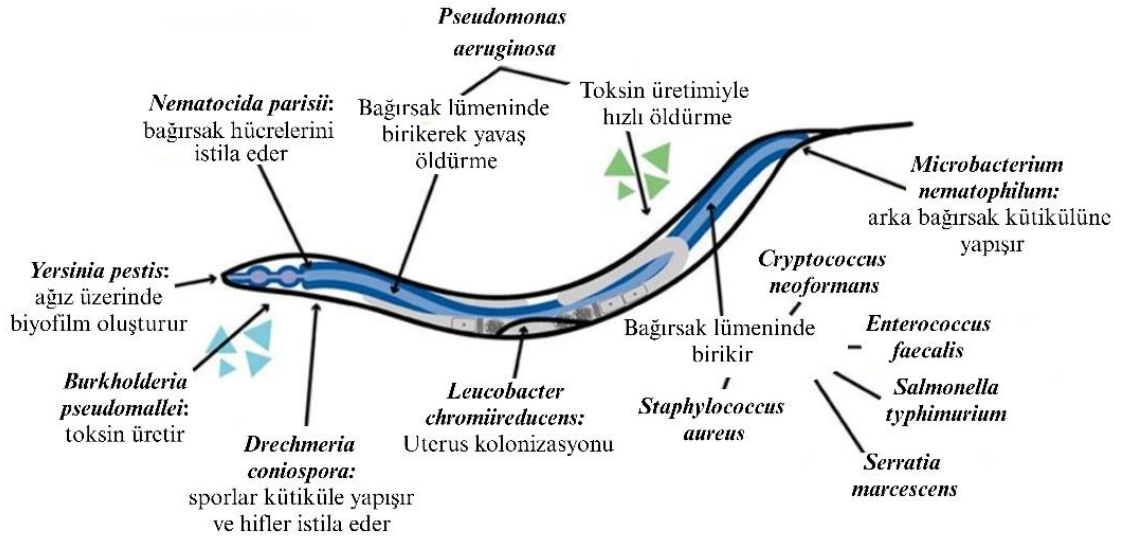
Şekil 1.6. *C. elegans* iç ve dış yapısı.

Kas hücreleri dış kutiküle hipodermal hücreler ile bağlı bir şekildedir. Kas hücrelerinin bir kısmının kasılması gövde bükülmesini sağlar bu kasılmalar düzenli bir şekilde gerçekleştiğinde zarif sinüzoidal dalgalar şeklinde hareket etmektedir. *C. elegans* adı da bu hareketten gelmektedir (Thula 2022).

L1-L2 larvalar aç olarak büyütüldüğünde donmaya en dayanıklı evrelerinde olurlar ve böylece stok hazırlamak için kullanılabilirler. Sıvı nitrojen (-196 °C) dondurulup süresiz şekilde saklanabilmektedir. Bu imkân olmadığı takdirde -80 °C’de de saklanabilmektedir (Stiernagle 2006).

1.5. Patojenite Araştırmalarında *C. Elegans*’ın Model Organizma Olarak Kullanılması

C. elegans, doğal yaşam ortamlarında birçok mikroorganizmayla karşı karşıya kaldığı için kendilerini savunmada patojenleri tanıma, doğuştan bağışıklık sistemi, bellek, sinirsel öğrenme gibi özellikleri gelişmiştir. Adaptif bağışıklık sistemleri ise bulunmamaktadır (Hajdú, Szathmári, and Söti 2024) .



Şekil 1.7. *C. elegans*’ı enfekte eden patojenler ve patojenlerin etkileri (Hodgkin and Partridge 2008).

C. elegans patojenite araştırmalarında önemli bir model organizma olarak yer almaktadır. Genetik yapısının ve biyolojisinin iyi tanımlanmış olması, laboratuvar koşullarında yetiştirilmesinin kolay ve uygun maliyetle olması, etik gerekliliklerinin olmaması, şeffaf olması, mikroskop altında kolayca izlenebilir olması, dondurulmuş stoklarının -80°C’ de uzun süre saklanabilir olması *C. elegans*’ın model organizma olarak tercih edilme nedenleri arasındadır (Marsh and May 2012a). Ayrıca genomu dizilenen ilk

çok hücreli organizma olması onun genomik çalışma yöntemlerinin oluşması ve geliştirilmesi aşamasında öncü bir canlı olduğunu göstermektedir (Meneely, Dahlberg, and Rose 2019b) .

Evrimsel olarak korunmuş bağışıklık yollarının, çeşitli mikroorganizmalarla konak-patojen ilişkisi çalışılarak aydınlatılmasında kritik rol oynamıştır. Genomunun tam olarak dizilenmiş ve çalışılmış olması, insanlarla paylaşılan evrimsel olarak korunmuş genetik yolların çalışılmasını daha kolay hale getirmiştir (Marsh and May 2012b).

Model organizma olarak obezite, immünoloji, nörobilim, genomik, kanser, hücre biyolojisi, yaşlanma ve alzheimer gibi konularda çalışılması için uygun bir model organizmadır (Ermolaeva and Schumacher 2014)(Kyriakakis, Markaki, and Tavernarakis 2015; Shen et al. 2018; Yue et al. 2021).

C. elegans ile yapılan mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturma yeteneği standartlaşmış bir patojenite deneyi haline gelmiştir. Enfeksiyon oluşturma deneyleri slow killing (yavaş öldürme), fast killing (hızlı öldürme) gibi deneyleri içermektedir. Bu çalışma modeli ise *in vitro* ve *in vivo* çalışma alanları arasında bir köprü gibidir. Hayvanlardaki karmaşık metabolik yolların ve tepkilerinin daha kolay bir şekilde çalışılabilecek bir formudur (Chakravarty 2022).

C. elegans, doğuştan gelen bağışıklığın ve patojenite mekanizmalarının rolünü ortaya çıkarmak ve bu patojenik durumlara karşı tedavi geliştirilme çalışmalarında kullanılması için uygun bir model organizmadır. *P. aeruginosa* gibi fırsatçı patojenler ciddi sağlık sorunları yaratmaktadır ve tedavi edilmediği sürece enfeksiyonun sonucu ölüm ile de sonuçlanabilmektedir. *P. aeruginosa*'nın virülans ve enfeksiyon etkileri *C. elegans*'ın konak savunma mekanizmaları ile çalışılmıştır (Garcia-Clemente et al. 2020). Sadece insan patojenleri değil bitki (salatalık, domates, patlıcan, biber) patojenlerinin de *C. elegans* üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu patojenlerin de öldürücü etkide ve *C. elegans*'ın yaşamsal fonksiyonları üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu görülmüştür. (Ambreetha and Balachandar 2022).

Mantar patogenezinin araştırılmasında da *C. elegans* model organizma olarak kullanılmaktadır. Mantar hastalıkları tek başına hastalık yaratıp ölümcül olabileceği gibi vücutta bağışıklık sisteminin zayıflaması ile birlikte de ortaya çıkabilmektedir. Yapılan bir çalışmada insan patojeni *Cryptococcus neoformans*'ın *C. elegans*'ı öldürdüğü ve memeli virülansında rol oynayan genlerinin bazılarının *C. elegans*'ı öldürmede de etkili olduğu görülmüştür (Mylonakis et al. 2002).

C. elegans'ın *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. pneumoniae* gibi çeşitli insan patojenlerinden etkilenmesi ve insanlarla benzer bağışıklık yollarına sahip olduğu için (Ewbank 2002; Garsin et al. 2001) yeni antimikrobiyal ilaçların keşfi, geliştirilmesi ve erken aşamalarda toksisitesini tespit etmek için uygun bir *in vivo* modeldir (Zarroug et al. 2023)

Bir çalışmada *P. aeruginosa* aracılı *C. elegans* sağ kalım deneyinde ölümü yavaşlatan, konak savunmasında etkili gen ifadesini uyarıcı 20'den fazla bileşik tespit edilmiştir. LK38 adlı bileşik ile yaptıkları çalışmada *C. elegans*'ı patojene karşı koruyan yolağın PMK-1/p38 MAPK olduğu belirlenmiştir (Hummell, Revtovich, and Kirienko 2021a).

Halisin bileşiği, diyabet ilacı olarak kullanılmış sonradan da antibakteriyel etkisi tespit edilmiştir. Ancak klinik suşlara karşı kullanılabildiğine dair çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Yapılan bir çalışmayla MRSA ile enfekte edilmiş *C. elegans*, halisinin klinik uygulanabilirliğini denemek için *in vivo* model olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda halisinin *C. elegans*'da sağ kalım gününü arttırmıştır. Bu çalışmalar sonucunda da *C. elegans* üzerinde çalışan bazı antimikrobiyal maddelerin ek çalışmalarla birlikte insanlar için antibiyotik olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Kao et al. 2024).

1.5.1. *C. elegans*'ta İmmün Sistem

C. elegans'ın patojen enfeksiyonuna verdiği cevapların araştırılması ile evrimsel olarak korunan, enfeksiyona cevap sinyal yollarının ve diğer canlılarla (özellikle insan) benzer efektör molekül üretilen, doğuştan bağışıklık tepkilerinin tespit edilmesi

sağlanmıştır. Bununla birlikte insanlarda enfeksiyona neden olan patojenler ile *C. elegans* üzerinde çalışmalar yapıp ilaç keşfetme yönünde adımlar atılmıştır (Giunti et al. 2021).

1.5.2. *C. elegans*'ta Enfeksiyon Yolları ve Antimikrobiyal Cevap

C. elegans temelde 3 yol ile enfekte olur ve enfeksiyona cevap verir. İlki üst deri katmanıdır ve vücut açıklıklarıdır, üst deri katmanı sayesinde çevrede bulunan ve nematodda patojenik etkide bulunacak mikroorganizmalara karşı *C. elegans* korunur. Diğer bir yol ise yutaktır. Burada savunma mekanizması olarak bakteriler parçalanır. Üçüncü yol ise bağırsak tarafından gerçekleştirilir. Enfeksiyon durumunda bağırsaktan salgılanan antimikrobiyal maddeler patojenlere etki eder (Güneş 2015) .

C. elegans laboratuvar ortamında *E.coli* OP50 ile beslenilmektedir. Faringeal öğütücü ile bakteriler parçalanmaktadır ve böylece bağırsakta canlı bakteri bulunmayacaktır. Ancak bazı durumlarda faringeal öğütücü bakterileri parçalamada yetersiz kalmaktadır ve bu bakteriler patojen olduğu takdirde bağırsağa geçtiğinde burada birikip enfeksiyona ve bağırsakların gerilmesine neden olmaktadır. Patojenin parçalayıcı etkene karşı dayanıklı olması, *C. elegans*'ın yaşlanması gibi durumlar kaynaklı enfeksiyon başlamaktadır (Rezaeianaran and Gijis 2023). Bağırsakta patojen birikimi ve etkileri sonucunda da *C. elegans* patojene göre değişmekle birlikte ortalama 10 gün içerisinde ölmektedir (Aballay, Yorgey, and Ausubel 2000).

C. elegans enfekte olduğunda bazı belirtiler görülür. Hareket yavaşlaması, kuyruk şişmesi, bağırsak şişkinliği, yutağın zarar görmesi, *C. elegans*'ın dış yapısı incelendiğinde görülen bozukluklar *C. elegans*'ın patojenler tarafından enfekte olduğuna işarettir (Viri et al. 2021) (Powell and Ausubel 2008)

1.5.3. *C. elegans*'ta Antimikrobiyal Yanıtlar

Memeli bağırsak hücrelerinin sürekli potansiyel patojenlere maruz kalması gibi *C.elegans*'ta da epidermis ve bağırsağında aynı durum söz konusudur. Doğal ortamında çürük meyvelerle bir arada olduğu için epidermisi sürekli olarak mikroorganizmalarla bir

aradadır ve sürekli olarak potansiyel patojenlere maruz kalmaktadır. Bu durum da onun doğal bağışıklık tepkisi ile bağlantılıdır, bazı peptit ve proteinler her zaman ifade edilebildiği gibi bazıları da sadece enfeksiyon zamanında ifade edilmektedir(Ewbank and Zugasti 2011a).

C. elegans'ta antimikrobiyal proteinler ve peptitler bulunmaktadır. Bunlar; Caenopores, Lizozimler ve lektinler, ABF peptidleri, NLP'ler ve CNC'lerdir (Ewbank and Zugasti 2011a).

Caenopores'lar (SPP): 28 farklı gen içeren 33 farklı protein kodlanan büyük bir protein ailesidir. Bu proteinler bakterileri öldürürken bakteri membranlarında gözenek oluşturan proteinlerdir. Ağırlıklı olarak *C. elegans* bağırsaklarında ifade edilirler (Roeder et al. 2010).

Lizozimler ve lektinler: Lizozimler bağırsaklarda bazı patojenler tarafından indüklenebilmektedir. Gram (-) ve Gram (+) patojen bakterilere karşı *C. elegans*'ın dirençli olmasını sağlamaktadır, lektinler de karmaşık gen düzenlemelerine sahip ve birçok farklı patojene yanıt veren ailedir (Mallo et al. 2002) (Wong et al. 2007).

ABF peptitleri: *Caenorhabditis elegans*'ta ASABF (*Ascaris suum* anti bacterial factor) tipi antimikrobiyal peptidleri patojen olma ya da olmama durumlarında ifade edilmektedir. ABF-1, ABF-2 ve ABF-3 patojen olmadığı durumlarda da sürekli olarak ifade edilmektedir. ABF-1 ve ABF-3 esas bağırsakta tespit edilmiş olup ABF-1 ve ABF-2 ise faringeal dokularda ifade edilmektedir(Kato et al. 2002) (Ewbank and Zugasti 2011b).

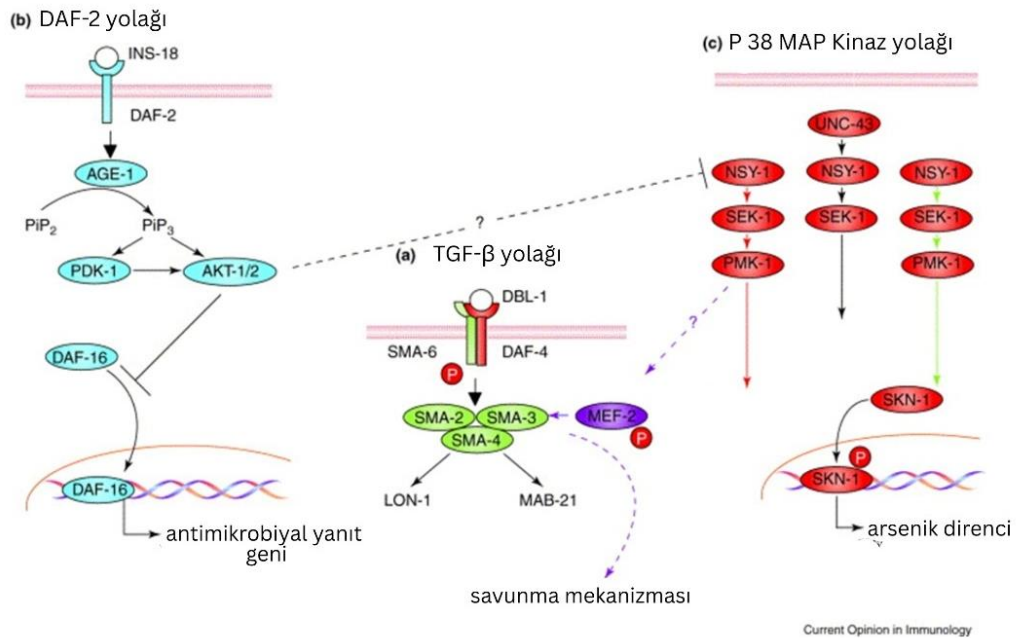
NLP'ler ve CNC'ler: Nöropeptit benzeri proteinler (NLP'ler) ve caenasinler (CNC'ler) aileleri, filogenetik olarak yakından ilişkili antimikrobiyal peptitlerdir. NLP'lerin ifadesinin Gram (-) bakteriler ve mantar enfeksiyonu sonrasında indüklendiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışma ile de *nlp-29* gen kümesinin ifadesinin mantar enfeksiyonlarına karşı *C. elegans*'ın dirençli olmasını sağladığını göstermiştir. CNC'nin ise *Drechmeria coniospora* veya *Candida albicans* enfeksiyonu sırasında up-regüle

1. GİRİŞ

olarak düzenlendiğini *S. marescens* veya *P. aeruginosa* gibi bakterilerle enfekte olma durumunda gen ifadesinde değişiklik tespit edilmemiştir. (Pujol et al. 2008; Zugasti and Ewbank 2009).

1.5.4. *C. elegans*, Patojen Varlığında veya Çevresel Sinyaller Aldığında Temel Olarak 3 Yolak ile Cevap Verir; MAPK, TGF- B ve DAF-2.

MAPK yolağı: Memelilerde, böceklerde ve bitkilerde doğuştan gelen bağışıklık sisteminde rol almaktadır. *C. elegans* 'ta 2002'de yapılan çalışmayla patojen direnci için gerekli olan iki gen tanımlanmıştır. Bunlar MAPK kinazı kodlayan *sek-1* ve MAPKK kinazı kodlayan *nys-1* 'dir. Memeli p38 MAPK ile homolog olan *pmk-1*'in *P. aeruginosa* savunması için gerekli olduğu RNA interferans (RNAi) inhibisyonu ve biyokimyasal analizlerle belirlenmiştir. *Sek-1*, *nys-1* ve *pmk-1* genleri aynı zamanda bağırsak bağışıklığında da rol oynamaktadır (Kim et al. 2002) (Sakaguchi, Matsumoto, and Hisamoto 2004). Bu yolak hem Gram (+) hem de Gram (-) patojen bakterilere karşı etkilidir (Aballay et al. 2003).



Şekil 1.8. *C. elegans* bağışıklık yolakları (Millet and Ewbank 2004a).

1. GİRİŞ

TGF- β yolağı: Heterodimerik yapıya sahip olan tip I SMA-6 ve tip II DAF-4 proteinlerini içeren reseptöre TGF- β ile homolog olan DBL-1 bağlanır ve Smad proteinleri SMA-2, SMA3 ve SMA-4 aracılığıyla çekirdeğe sinyal gönderir. Bu yolaktaki bir fonksiyon kaybının *C.elegans*'ı *P. aeruginosa* patojenine karşı daha duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir(Nicholas and Hodgkin 2004b).

DAF-2 insülin /IGF-I benzeri yolağı: Ligand INS-18 reseptör olan DAF-2' ye bağlanır ve AGE-1'i aktive eder bu da PİP-2'nin PİP-3' dönüşümünü katalize eder. Buradan sonra bir yol PİP-3 AKT-1/AKT-2 kompleksine bağlanmasıdır. Diğer yolda PDK-1 PİP-3'e bağlanır ve AKT-1'i aktive edebileceği membrana çekilir. AKT, DAF-16'yı fosforile eder ve sitoplazmik kısımda tutulmasını sağlar. *C.elegans*'larda Daf-2 mutantlarında yolak aktif olmayacaktır ve böylece DAF-16 sitoplazmada tutulmayacak ve antimikrobiyal etkili genlerin ifadelerinin düzenlenmesi için çekirdeğe taşınabilecektir. Örneğin antimikrobiyal etkili Lizozim geninin ifadesi DBL-1/TGF- β ve DAF-2 yolağı ile kontrol edilmektedir (Millet and Ewbank 2004b) .

1.6. Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasında evrimsel olarak korunmuş antimikrobiyal peptitlerin özellikleri baz alınarak veri tabanı filtreleme teknolojisi ile Pleurocidin peptidinin tespit edilmesiyle birlikte Pleurocidin petidinin temel alınarak antibiyofilm etkili kısa peptitler tasarlanması amaçlanmıştır. Yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda antibiyofilm etkinliği olan, hemolitik, sitotoksik ve model organizma olarak kullanılacak olan *C. elegans* üzerinde toksik etkisi olmayan, *C. elegans*'larda patojene maruz kalma sonucunda sağkalımı sağlayan ve *C. elegans*'larda immünomodülatör etkisi olan bir antibiyofilm peptit (ABP) belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pleurocidin, ilk olarak 1977'de Cole ve arkadaşları tarafından kış pisi balığının (*Pleuronectes americanus*) deri mukus salgılarında bulunmuş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Pleurocidin doğuştan savunma sisteminde yer alan bir antimikrobiyal peptittir. 25 residue uzunluğunda ve GWGSFFKAAHVKGKVGKAALTHYL amino asit dizisine sahip 2,7 kDa büyüklüğündedir. Ayrıca araştırmacılar, pleurocidinin suda bulunan 11 farklı Gram (-) ve Gram (+) bakteriye karşı MIC ve MBC değerlerini belirlemişlerdir. Pleurocidinin amfipatik olduğunu, α -helix konformasyonunda bulunduğunu, katyonik yapıda olduğunu, dermaseptin ve ceratotoxin sınıflarındaki antimikrobiyal peptitler ile birincil dizi homolojisi gösterdiğini tespit etmişlerdir (Cole, Weis, and Diamond 1997) .

Cole ve arkadaşları (2000) pleurocidini kodlayan cDNA ve geni tanımlamışlardır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile de pleurocidinin kış pisi balığında ince bağırsaklarında bulunan kadeh hücrelerinde üretildiğini tespit etmişlerdir. İnsan patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi test edilmiş ve bu patojenlerin 12.6 $\mu\text{g/mL}$ ila $>100 \mu\text{g/mL}$ (pleurocidine dirençli) MIC değerleri arasında farklı duyarlılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Pleurocidinin antibiyotiklerle sinerjistik etkisi çalışılmış ve D-cycloserine ile pleurocidinin sinerjistik etkisi ile elde edilen MIC değerinin her ikisinin ayrı ayrı MIC değerinden daha düşük konsantrasyon değerinde patojene karşı etkili olduğu tespit etmişlerdir (Cole et al. 2000a).

Jia ve arkadaşları (2000) bazı katyonik antimikrobiyal peptitlerinin balık patojeni *Vibrio anguillarum*'un neden olduğu enfeksiyona karşı korumada etkinliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada en etkili sonuç aldıkları peptitlerden biri de pleurocidin olarak belirtilmiştir. Pleurocidinin C-terminal amidlenmiş bir formu olan pleurocidin amid deneylerde kullanılmış ve enfeksiyon durumunda balıklarda hayatta kalma oranının arttırdığını belirtmişlerdir (Jia et al. 2000).

Cole ve arkadaşları (2000) pleurocidin geninin dört ekzon ve üç introndan oluştuğunu tespit etmişlerdir. Sinyal bölgesi ekzon-1 ve ekzon-2 tarafından

kodlanmaktadır. Olgun peptit, ekzon-2, ekzon-3 ve ekzon-4 tarafından kodlanır. Propeptit ekzon-4 tarafından kodlanır. TATA ve CAAT kutuları sırasıyla -56 ve -200'de bulunur. Olgun pleurocidinin oluşması için amino-terminal sinyalinin ve karboksi-terminal anyonik proparçasının proteolitik bölünmeye uğrayan, 68 residue içeren bir prepropeptit olarak var olduğu tahmin edilmektedir (Cole et al. 2000b).

Douglas ve arkadaşları (2001) pleurocidin ailesinde bulunan peptitlerin sinyal dizilerinin ve asidik karboksi-terminal dizilerinin yüksek oranda korunduğunu tespit etmişlerdir. Pleurocidin gen ailesinin gen yapısında ekzon-1'in sinyal dizisini ve antimikrobiyal peptidin ilk yarısını kodladığı, ekzon-2'nin sonraki on amino asidini kodladığı, ekzon-3'ün son üç amino asidini ve asidik karboksi terminal kısmını kodladığını belirtmişlerdir (Douglas et al. 2001).

Yoshida ve arkadaşları (2001) pleurocidinin yapı ve aktivitesini açıklamak için biyolojik özellik ve aktivitesi üzerine çalışmalarda bulunmuşlardır. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi ölçümleri sonucunda DOPC/DOPG (3: 1, anyonik) veziküllerin varlığında α -helisel bir yapıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Peptit 100 μ M uygulamada %6 tavşan kanında %15 insan kanında hemolitik aktivite ve orta düzeyde antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir. Pleurocidinin asidik fosfolipit ile güçlü bir şekilde etkileşime girdiğini belirtmiş ve lipit membranlarında gözenek oluşturarak etkileşime geçtiği tahmininde bulunmuşlardır. Ayrıca pleurocidinin α -helisitesi ve/veya hidrofobisitesindeki bir artışın aynı zamanda hemolitik ve antibakteriyel aktivitede de artışa sebep olacağını tespit etmişlerdir (Yoshida et al. 2001a).

Patrzykat ve arkadaşları (2002) pleurocidin (MIC 2 μ g/mL) ve pleurocidin türevi antimikrobiyal peptitlerden olan, peptit PM (MIC 4 μ g/mL), C terminalinde amidlenmiş pleurocidin P-CN (MIC 1 μ g/mL), pleurocidin ve kurbağa dermaseptinin amidatlanmış bir melezi (P-Der) (MIC 2 μ g/mL) peptitlerinin farklı MIC konsantrasyonlarının *Escherichia coli* sitoplazmik zarı ve makromoleküler sentezi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Pleurocidin ve P- peptitlerinin 5 katı MIC değerleri *E. coli* sitoplazma zarında hasara neden olmadan hücre içi işlevleri inhibe etme yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir. Tüm peptitlerin 10 kat MIC değeri uygulandığında, bakterinin sitoplazmik

membranının hızlı bir şekilde depolarizasyona uğradığını, makromoleküler sentezinin durdurulduğunu ve hücre ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir (Patrzykat et al. 2002).

Saint ve arkadaşları (2002) pleurocidinin membran geçirgenleştirme mekanizmasını belirlemek için yaptıkları çalışmada pleurocidinin farklı düzlemsel lipid katmanlarındaki etkisini araştırmışlardır. Antibakteriyel etkinin muhtemelen bakteri zarlarındaki iyon yolları oluşumundan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Mekanizma olarak ise torodial gözenek ve 'halı modeli' oluşumu yoluyla pleurocidinin geçirgenleştirme etkisinde bulunduğu belirtmişlerdir (Saint et al. 2002).

Patrzykat ve arkadaşları (2003) pleurocidinin korunan yan bölgelerine dayanan dizilere sahip primerler kullanarak yassı balık türlerinden 35 dizi çoğaltmışlardır. Ardından 20 peptit sentetik olarak üretilmiş (NRC-1 – NRC-20), peptitler Gram (+) ve gram negatif bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı test edilmiştir. En aktif peptit ise GWRTLKKAIEVKTGKLLALKHYL dizisine sahip, Amerikan pisi balığından elde edilen karboksi-terminus amidatlı dizidir ve 1 ila 8 µg/mL konsantrasyon aralığında antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Patrzykat et al. 2003)

Lüders ve arkadaşları (2003) ökaryot AMP olan pleurocidin ile prokaryot (laktik asit bakterileri (LAB)) AMP'leri olan pediosin PA-1, sakacin P veya curvacin A ile birleştirilmesi sonucu antimikrobiyal aktivite olarak oluşabilecek sinerjistik etki üzerinde çalışmışlardır. LAB AMP'lerinin Gram (-) *E.coli* üzerinde etkide bulunmadığını (>512 µg/mL MIC) pleurocidinin 16 µg/mL MIC konsantrasyonunda etkide bulunduğunu ve LAB AMP'lerinin 1 ila 8 ng/mL konsantrasyonlarının pleurocidinin etkisini dört kat arttırdığını tespit etmişlerdir. 2 µg/mL konsantrasyonunda pleurocidin, 18 saatlik inkübe edilmiş bakteri kültüründe inhibisyon etkisinde bulunmazken, 16 ila 32 µg/mL konsantrasyonlarında LAB AMP'ler ile 2 µg/mL pleurocidin uygulamasında %100 inhibisyon görüldüğü belirtilmiştir. Peptitlerin sinerjistik etkisini ise pleurocidinin Gram (-) bakterilerde dış zarlarda gözeneklere neden olduğu ve LAB AMP'lerin de bu gözeneklerden geçerek iç zarlara erişip etkinliklerini orada gerçekleştirebileceği şeklinde açıklamışlardır (Lüders et al. 2003).

Murray ve arkadaşları (2003) Kış pisi balığı solungaçlarında pleurocidin sentezinde görevli spesifik hücre tiplerini tespit etmek için pleurocidin-spesifik bir RNA probu ile Whole-mount in situ hybridization ve anti-pleurocidin antikorlu ile whole-mount immünohistokimya analizleri ile çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Pleurocidinin Kış pisi balığının solungaç filamentinin öncelikli olarak lamellar olmayan bölgeyle ilişkili belirli bir hücre popülasyonunda olduğunu ve bu hücrelerin de histolojik teknikler ile eozinofilik granüler hücreler (EGC'ler) olduğunu varsaymışlardır (Murray, Gallant, and Douglas 2003).

Lim ve arkadaşları (2004) pleurocidinin (Ple) 13. ve 17. aminoasidi olan glisin (Gly)'in alanin (Ala) ile değiştirilmesiyle (Gly→Ala) peptidin yapısı ve bakteri hücresi seçiciliği üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ala ikameli üç pleurocidin analogu sentezlemişlerdir, bunlar; Gly^{13,17}→Ala, Gly¹³→Ala, Gly¹⁷→Ala. 3 Gram (+) ve 3 Gram (-) bakteri ile yaptıkları MIC testinde analog peptitler ile pleurocidinin kendi MIC değerleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. Hemolitik aktivite açısından değerlendirildiğinde Ple 100 mM konsantrasyonda %2,5 lizisle düşük hemolitik aktivite göstermiştir. Gly^{13,17}→Ala süstitüsüyonu önemli bir hemolitik aktivite artışı göstermiştir (100 mM'de %37,4), diğer peptitler ise 100 mM'de %16,6 ve %15,4 oranında benzer hemolitik aktivite göstermiştir. Peptitlerin konformasyonel değişimlerini incelediklerinde sadece Gly^{13,17}→Ala peptidinde α -helix içeriğinde önemli bir artış tespit etmişlerdir (Lim et al. 2004).

Mason ve arkadaşları (2006) pleurocidinin antibiyotik mekanizmasını model membranlar kullanarak belirlemek için gerçekleştirdikleri çalışmada, bakteriyel zarları taklit eden çift katmanlarla pleurocidinin etkileşimini incelemişlerdir. Bunun için floresans ve katı hal Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemlerini kullanmışlardır. Pleurocidin anyonik fosfatidilgliserol model zarlarla güçlü bir şekilde etkileşime girmiştir. Döteryumlanmış zwitteriyonik lipitlere göre ise anyonik döteryumlanmış lipitlerdeki lipit zincir düzenini daha fazla bozma yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak, pleurocidin histidin açısından zengindir ve anyonik lipitler ile güçlü etkileşim içindedir bu yüzen ortamın asidik olması durumunun peptit üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Asidik pH'ta histidin kalıntılarının protonlanması, pleurocidinin membran bozma yeteneği üzerinde etkide bulunmadığını belirlemişlerdir

ve histidin kalıntılarının hücre içi bir öldürme stratejisine katkıda bulunabileceğini öngörüsünde bulunmuşlardır (Mason et al. 2006).

Ji-Young ve arkadaşları (2006) pelurocidinin analogu olan pleurocidin-AA (Gly¹³,¹⁷→Ala) peptidi ile yaptıkları çalışmalar sonucunda analog peptidin pleurocidinin aksine hücre seçici peptit olmadığını ve zwitteriyonik fosfolipid membranlarla güçlü bir şekilde etkileşime girdiğini belirtmişlerdir. Dairesel dihiroizm spektrumları, pleurocidin-AA'nın pleurocidine kıyasla α -helix konformasyon içeriğinin daha yüksek olduğu tespit etmişlerdir. NMR spektroskopisi ile belirlenen üçüncül yapı, konum olarak Gly(3)'ten Gly(17)'ye kadar olan uzun heliks ile Gly(17)'den Leu(25)'ye kadar olan kısa heliks arasında yapısal esneklik olduğunu ve bu esneklik yapısının pleurocidinin bakteriyel hücre membranı seçiciliğinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (Ji-Young et al. 2006).

Chiou ve arkadaşları (2006) üç doğrusal katyonik α -helisel antimikrobiyal peptitler olan böcek cecropin B, balık pleurocidini ve bir cecropin analogu CF17 peptitlerinin alabalık makrofaj hücre hattı olan RTS11'de temsili bağışıklık ile ilgili genlerin ifadesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Üç peptit de iki pro-inflamatuvar gen olan interlökin-1 β (IL-1 β) ve siklo-oksijenaz-2 (COX-2)'nin ifade seviyelerini arttırmıştır. Bu durumun peptitlerin genler üzerindeki etkilerinin bakteriyel büyümeyi engelleme yetenekleri ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Böylece peptitlerin konakta immünomodülasyonu düzenlemek için farklı bir mekanizma kullanıldığı ve patojenlere karşı antibakteriyel etki için daha farklı bir mekanizma kullandığı anlaşılmaktadır. Üç peptidin dört önemli balık patojeni olan *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio anguillarum*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri test edilmiş üç peptit de *P. fluorescens* ve *A. salmonicida*'ya karşı önemli inhibitör etkiler gösterirken *A. hydrophila* ve *V. anguillarum*'un pleurocidin ve CF17'ye karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir (Chiou et al. 2006).

Jung ve arkadaşları (2007) pleurocidinin antifungal aktivitesini araştırmış ve all-D-Ple peptidini sentezlemişlerdir. Pleurocidinin *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7296), *Trichosporon beigeli* (KCTC 7707) ve *Candida albicans* (TIMM 1768)'a karşı 2,5 ile 5 μ M arasında MIC değerlerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sentetik all-D-Ple, all-L-Ple'den iki kat daha güçlü antifungal aktivite göstermiştir ve proteazlara karşı

dayanıklılıkları test edildiğinde all- L- Ple'nin parçalandığı, all- D -Ple'nin ise dayanıklı kaldığını SDS-PAGE ile belirlemişlerdir. Çalışmalar sonucunda ise peptitlerin kararlılığının *in vitro* veya *in vivo* antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı sonucuna varılmıştır (Jung et al. 2007).

Lee ve arkadaşları (2008) pleurocidinin enantiyomerik analogu D- amino asit ikamesi ile bir peptit (D-Ple) tasarlayıp bu peptidin proteolitik direnç, antimikrobiyal aktivite ve hemolitik aktivite üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Proteolize duyarlılığı test etmek için alfa-kimotripsin, *Staphylococcus aureus* V8'den elde edilen endoproteinaz Glu-C ve tripsin gibi proteazlar ile sindirim yapılmıştır. HPLC sonuçlarına göre D-Ple, 30 dakikalık enzimlerle inkübasyon sonucunda tamamen sağlam kalmıştır, L-Ple ise kısmen ya da tamamen parçalanmıştır. D-Ple'nin antimikrobiyal aktivite olarak Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı etkinliği L-Ple'ye göre azalmıştır ancak yine de test edilen çoğu suşa karşı etkinliği iyi bir seviyedir. Yapılan hemolitik aktivite testinde 100 ila 0,39 μ M peptit çözeltileri kullanıldığında en yüksek seviye uygulamada D-Ple %19 hemoliz gösterirken L-Ple %77 hemoliz göstermiştir. 100 μ M konsantrasyonda uygulama hariç diğer konsantrasyonlarda D-Ple hemolitik etki göstermemiştir (Lee and Lee 2008).

Tsuda ve arkadaşları (2008) pleurocidin bazlı model peptitler sentezlemişlerdir. Sentezlenen peptitlerin C-terminal kısmından dört veya daha fazla amino asit eksiltmişlerdir. C- terminal kısımdan Thr-His-Tyr-Leu amino asitlerinin çıkarılması sonucunda antibakteriyel etkinin değişmediğini ve hemolitik aktivitenin azaldığını belirtmişlerdir (Tsuda et al. 2008).

Sung ve arkadaşları (2008) pleurocidinde hidrofobik yüzeyinde Arg (R) veya Ser (S) ikamesiyle analog peptitler tasarlamışlardır. Ser ikamesi ile peptidde hidrofobisitenin azaldığını ve Arg ikamesiyle hidrofobisitenin azalmasıyla beraber peptit katyonikliği +13 olacak şekilde artmıştır (pleurocidin +8). CD ölçümleri ile peptitlerin α -helix konformasyonunun Arg ikamesinde %11,4, Ser ikamesinde %13,7'ye düştüğü tespit edilmiştir (pleurocidin %60). Peptitlerdeki bu değişim ile hemolitik aktivitede de azalış görülmüştür ancak antifungal aktivitede bir değişiklik görülmemiştir (Sung and Lee 2008).

Mai ve arkadaşları (2011) karyojenik patojen olan *Streptococcus mutans*'a karşı hedef-spesifik bir füzyon AMP tasarlamışlardır. Tasarım peptit olan IMB-2 öldürme özelliğini pleurocidinden, hedef özelliğini ise *S. mutans* ComC sinyal peptidi feromonunun (CSP) hedefleme alanından almaktadır. Pleurosidinin 26 varyantı taranıp NRC-4 peptidi seçilmiştir ve peptidin farklı kısımları öldürücü alan olarak kullanılıp hedef alan ile füzyon peptitler elde edilmiştir. IMB-2 *S. mutans* hücrelerine karşı 5,65 µM konsantrasyonda uygulandıktan 1 dakika sonra bakterilerin %30'u hayatta kalırken 15 dakika sonra %5'ten azı hayatta kalmıştır. Aynı konsantrasyon *Streptococcus Sanguinis* ve *Streptococcus gordonii* bakterilerine de uygulandıktan 15 dakika sonra bakterilerin %20'sinden azının hayatta kaldığını belirtmişlerdir. IMB-2'nin 5,65 µM konsantrasyonda biyofilm hücrelerinin %60'ını 15 dakika içinde öldürdüğünü tespit etmişlerdir (Mai et al. 2011).

Cho ve arkadaşları (2011) pleurocidinin apoptozisin erken sinyal aşamasında özellikle sitotoksik hidroksil radikalleri ile hücre içi ROS'un artışı indüklendiğini ve oksidatif strese neden olduğunu patojen *C. albicans*'ta tespit etmişlerdir. Oksidatif stres oluşumu ile DNA ve çekirdeklerin hücrelerde parçalandığını ve pleurocidin uygulamasının mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir (Cho and Lee 2011).

Tao ve arkadaşları (2011) çeşitli karyojenik bakterilere karşı pleurocidini test etmişlerdir. Oral mikroorganizmalara karşı yapılan MIC testinde 2 µg/mL ile >256 µg/mL konsantrasyonlarda MIC değerleri elde etmişlerdir. MBC değerleri de 8 µg/mL ile 256 µg/mL arasında değişmiştir. *In vitro* BioFlux akış biyofilmelerine karşı pleurocidin denendiğinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca tükürükte çözünen pleurocidinin antimikrobiyal aktivitesini kaybetmediğini, *S. mutans* ve *Streptococcus sobrinus*'u 64 µg/mL konsantrasyonda 2 dakikada hızla öldürülebileceğini ve bu özellikleri kaynaklı sakız ve gargara gibi ürünlerin içeriğinde antimikrobiyal madde olarak pleurocidinin kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Tao et al. 2011).

Morash ve arkadaşları (2011) pleurocidinin 26 farklı varyantının antikanser aktivitesini belirlemek için bir hücre hattı ve zebra balığı embriyo modeli kullanmışlardır. Peptitlerden en amfipatik ve pozitif yüklü olanların insan lösemi (HL60) hücrelerine karşı

in vitro testlerde en etkili peptitler olduğunu ve hemolitik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Aktif peptitlerin kanser hücrelerinde *in vivo* olarak onkoz ve apoptozu seçici olarak indüklediğini tespit etmişlerdir. İnsan lösemi (HL60) hücrelerinde 12 peptidin (NRC-03, -04, -07, -11, -14, -16, -17, -19, -123, -125, -126 ve -127) MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür] testi ile değerlendirildiğinde oldukça toksik (litik aktivite değerleri 32 µg/mL'nin altında) olduğunu belirtmişlerdir (Morash et al. 2011).

Choi ve arkadaşları (2012) pleurocidinin antibiyotiklerle sinerjistik etkisini araştırmak için pleurocidin/ampicillin, pleurocidin/chloramphenicol, pleurocidin/erythromycin kombinasyonlarını Gram (-) ve Gram (+) bakteriler üzerinde uygulamışlardır. Kombinasyonların sinerjistik etki gösterip bakterilere karşı MIC değerlerinde azalmalar (*Enterococcus faecium* hariç) elde edilmiştir. Ayrıca pleurocidinin tek başına ve antibiyotiklerle kombinasyonu yapıldığında hidroksil radikallerin oluşumunu indüklediğini ve bunun sinerjizmi oluşturduğunu, antibiyofilm özellik göstererek önceden oluşmuş bakteriyel biyofilmi temizlediğini tespit etmişlerdir (Choi and Lee 2012).

Souza ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışma ile pleurocidinin peptit parçalarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini analiz etmişlerdir. Peptit dizisinden beş kısım seçilmiş ve bu peptitler Plc-1, Plc-2, Plc-3, Plc-4 ve Plc-5 olarak adlandırılmış. Plc-2 (KHVGKAALTHYL) pleurocidinin C-terminusundaki 12 amino asitlik kısımdır ve bu peptit diğer peptitlerin (Plc-1, Plc-3, Plc-4, Plc-5) aksine pleurocidin ile (*Enterococcus faecalis* hariç) benzer antibakteriyel etki göstermiştir, diğer peptitlerde MIC değerinin arttığı görülmüştür. Plc-2 amino asit içeriğinin pleurocidinin antimikrobiyal aktivitesini koruyan en küçük ve kritik amino asit dizi olduğunu belirtmişlerdir (Souza et al. 2013).

Hilchie ve arkadaşları (2013) pleurocidin peptitlerinden NRC-03 ve NRC-07'nin multipl miyelom hücrelerine bağlandığını ve hızlı bir şekilde öldürdüğünü tespit etmişlerdir. NRC-03'ün NRC-07'den daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiğini ve bağışıklığı yetersiz farelerde NRC-03'ün tümör içine enjeksiyonunun multipl miyelom ksenograftlarının büyümesini bozduğunu belirtmişlerdir (Hilchie et al. 2013).

Pundir ve arkadaşları (2014) 20 farklı pleurocidin peptidi (NRC-01 ila NRC-20) taraması sonucunda bazı peptitlerin insan mast hücre hattı LAD2'yi (Laboratory of Allergic Diseases 2) degranüle edebildiğini tespit etmişlerdir. Peptitlerden NRC-04'ün mast hücresi göçünde, adezyonunda, degranülasyonunda ve kemokin üretiminin indüklemesinde etkisinin olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca bu peptidin G proteinine bağlı reseptör sinyalizasyonu yoluyla insan mast hücrelerini aktive etmesini tespit etmeleri ile bu peptidin immünomodülatör etkilere sahip olabileceğini düşünmektedirler (Pundir et al. 2014).

Chuang ve arkadaşları (2014) pleurocidinin adjuvan olma potansiyeli üzerine çalışmışlardır. Pleurocidin peptidi ve rGAPDH proteini, poli(laktid-ko-glikolid) (PLG) polimerinden yapılmış polimerik mikropartiküllere kapsüllenmiştir ve *PLG-PLE/rGAPDH* mikropartikülleri elde edilmiştir. Bu mikropartekül *Epinephelus coioides* balığında *V. harveyi*'ye karşı %85 sağ kalım sağlamıştır. Bu oran, PLG-rGAPDH mikropartiküllerinde ise %67'dir, böylece PLG-PLE/rGAPDH mikropartikülleri tarafından oluşturulandan sağ kalım önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Uzun süreli GAPDH'ye özgü bağışıklık (serum titreleri ve lenfosit proliferasyonu) açısından kıyaslandığında PLG-PLE/rGAPDH mikropartikülleri, PLG-rGAPDH mikropartiküllerine göre daha iyi etkide bulunduğunu belirtmişlerdir (Chuang et al. 2014).

Wang ve arkadaşları (2015) pleurocidinin gıdalarda koruyucu olarak kullanılma potansiyelinin araştırmışlardır. Pleurocidin, ultra ince PVA (polivinil alkol) elyaf matlarına elektrospinning teknolojisi yoluyla dahil edilmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak pleurocidin elyaf matlardan salınmaktadır. Ple/PVA elyaflarının anti mikrobiyal etkisi incelendiğinde *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. PVA nanofiberinden salınan pleurocidinin serbest pleurocidine kıyasla 4 °C'de 14 gün içinde elma şarabındaki *Escherichia coli* O157:H7 azalımını 2,5 log₁₀ CFU/mL daha fazla gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak pleurocidinin PVA elektrospining nanofiberine hapsedilmesi ile antimikrobiyal aktivitesinin korunabileceğini ve gıdaları patojenlere karşı korumada ve raf ömrünü uzatmada potansiyel olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Wang, Yue, and Lee 2015).

Zhang ve arkadaşları (2016) pleurocidini temel alarak 15 farklı peptit (PM1–PM15) tasarlamışlardır. *S. mutans* UA159, *S. sanguinis* ATCC 10556 ve *S. sobrinus* ATCC 6715 bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite tayini yaptıklarında PM11 peptidi (8–16 µg/mL) pleurocidine (8–32 µg/mL) göre daha iyi MIC sonucu vermiştir. PM14, 12 amino asit içeriği ile serideki en kısa antibakteriyel etkinliğini (MIC aralığı, 16–32 µg/mL) koruyan peptittir. Ancak diğer peptitlerde antibakteriyel aktivitenin oldukça azaldığı görülmüştür (Zhang et al. 2016a).

Lee ve arkadaşları (2016) pleurocidin ve *E.coli* ile yaptıkları çalışmada pleurocidinin artan konsantrasyonlarda (0.5– 1- 2 MIC) konsantrasyona bağlı bir şekilde bakteri zarları üzerinde belirgin şekilde etki ederken, hücre canlılığının peptit konsantrasyonundan (0.5– 1- 2 MIC) bağımsız şekilde neredeyse benzer etkide olduğunu tespit etmişlerdir. Pleurocidinin düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etkisini nasıl gösterdiğini anlamak için hücre içi apoptoz benzeri ölümün (ALD) indüksiyonu üzerinde çalışmışlardır ve sub-letal pleurocidin konsantrasyonunun kaspaz benzeri protein ve RecA aracılığı ile *E. coli*'de ALD'ye yol açtığını belirtmişlerdir (Lee and Lee 2016).

Shi ve arkadaşları (2017) enfeksiyon durumunda kan dolaşımında bulunabilecek patojenlere karşı pleurocidin ile fonksiyonelleştirilmiş piezoelektrik sensöre dayalı hızlı tespit için bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada, pleurocidin/tek duvarlı karbon nanotüpler/interdijital elektrot-çok kanallı bir seri piezoelektrik kuvars kristal (pleurocidin/SWCNT/IDE-MSPQC) sensöründe pleurocidin, patojenleri tanıma probu olarak görev almıştır. Pleurocidin ile patojen arasında spesifik etkileşim ile pleurocidinin SWCNT modifiye edilmiş IDE'den ayrılmasına bu da MSPQC'nin hassas bir frekans kayması tepkisine yol açmıştır. Geliştirilen bu yöntem ile patojenlerin 15 dakika içinde tespit edilebileceğini belirtmişlerdir (Shi et al. 2017).

Talandashti ve arkadaşları (2019) pleurocidinin farklı membranlarla etkileşimi incelemek için 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [DOPC]; bir zwitteriyonik zar modeli, DOPC/1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol [DOPG] (3:1); anyonik lipid çift katman için bir model; 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine [POPE]/1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol [POPG] (3:1); Gram (-) bakteriyel membran model; POPE/POPG (1:3) Gram (+) bakteriyel membran model

üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Sonuç olarak pleurocidinin zwitteriyonik fosfolipitlere kıyasla anyonik lipid çift katmanında daha iyi etkileşim ve daha fazla düzensizliğe neden olabileceği belirlenmiştir. Eritrositlerde kolesterol moleküllerinin bulunmasının eritrositleri pleurocidine karşı korumaya yardımcı olduğunu ve peptitdeki Lys amino asidinin özellikle anyonik, Gram (-) ve Gram (+) membranlar ile etkileşimde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Talandashti et al. 2019).

Manzo ve arkadaşları (2020) pleurocidin, pleurocidin-KR, pleurocidin-VA ve bunların tüm D- amino asit analogları ile peptit-lipit moleküller arası hidrojen bağı yeteneklerinin artırılmasının, membran translokasyonu ile ilişkili konformasyonel esneklik, membran hasarı ve gücü üzerine olumlu etkiler sağladığını ve Gram (+) bakterilere karşı peptit etkinliğini arttıracaklarını tespit etmişlerdir. Çalışılan peptitlerden özellikle D- pleurocidin-KR olmak üzere pleurocidin analoglarının pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını tetiklemeden intravenöz olarak bakteriyel akciğer enfeksiyonlarını tedavi etmek için uygulanabileceğini belirtmişlerdir (Manzo et al. 2020).

Li ve arkadaşları (2021) içlerinde pleurocidinin de bulunduğu 14 temsili antibiyofilm peptidin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerini *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *P. aeruginosa* (ATCC27853) ve maya *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) üzerinde karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada 5 temsili peptit ve pleurocidinin (MBIC 0,025- 0,1 mg/mL) test edilen üç suşa karşı antibiyofilm aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Li, Chen, and Lin 2021b)

Talandashti ve arkadaşları (2021) pleurocidinin membranlarda gözenek oluşum mekanizmasının anlaşılabilmesi için tüm atom (AA) ve kaba taneli (CG) moleküler dinamik (MD) simülasyonlarını çalışmışlardır. Gözenek oluşumunun erken aşamaları 500 ns AA simülasyonları incelendiğinde pleurocidinin iki peptitli gözenek oluşturduğu ve su moleküllerinin buradan akabileceğini göstermiştir, 25 µs CG simülasyonlarında ise iki peptitten fazlasın gözenek oluşumu için biriktiğini tespit edilmiştir. 2,5 µs simülasyondan sonra peptitlerin bir araya gelip gözenek şeklinde zar boyunca kanal oluşturacağını belirtmişlerdir (Talandashti et al. 2021).

Sandín ve arkadaşları (2022) *E. coli* hücrelerini, içlerinde pleurocidinin de olduğu AMP'lerle toleranslı olacak şekilde evrimleştirmişlerdir. Ardından pleurocidin ele alındığında pleurocidine toleranslı suşların kanamisin, siprofloksasin ve nalidiksik aside karşı duyarlılığının değiştiğini ancak ampisiline karşı duyarlılığının değişmemiş olduğunu belirtmişlerdir. Evrimleşmiş suşlar antibiyotiklere karşı tolerans göstermiştir bu da yavaş öldürme eğrilerinde gösterilmiştir (Sandín et al. 2022).

Wang ve arkadaşları (2022) pleurocidinin C-terminusundaki 11 amino asidi kesip GK-1 peptidini elde etmişlerdir. Ardından α -helix oluşumu için uygun olmayan Glisin (Gly) yerine oldukça hidrofobik olan Trp ve hidrofilik Lys kullanılarak GK-1 peptit dizisi üzerinde amino asit değişiklikleri yapmışlardır böylece GK-2, GK-3 ve GK-4 peptidlerini tasarlamışlardır. Tasarlanan peptitlerden GK-4'ün en iyi bakteriyostatik aktivite, yüksek stabilite, düşük hemoliz ve pepsin uygulamasına karşı hidrolitik direnç gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca ROS oluşumunu desteklediği ve membrana özgü bileşenler ile etkileşime girip membran hasarına eden olduğu tespit edilmiştir. GK-4'ün SEM ve CD analizi, pepsin hidrolizine direnme yeteneğini doğrulamıştır ve bu kararlılığın da helix yapısından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Wang et al. 2022).

Popitool ve arkadaşları (2023) pleurocidinden türetilen PM11 peptidinin hem Gram (+) hem de Gram (-) sığır mastitis bakterilerine karşı test etmişlerdir. *E. coli* suşu SCM1249, *Klebsiella spp* suşu SCM1282, *S.aureus* suşu CM967, *Streptococcus agalactiae* suşu SCM1084 ve *Streptococcus uberis* suşu SCM1310 ile yapılan çalışmada PM11'in *Klebsiella spp.* hariç diğer bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Popitool et al. 2023).

Ramos ve arkadaşları (2024) yara ile ilişkili patojenlerin öldürülmesi için pleurocidinin topikal uygulaması üzerinde çalışmışlardır. Koaksiyel elektro-eğirme kullanılarak polivinil alkol (PVA) lif matrislerine dahil edilen ve AMP salınımı yapılan sistemde pleurocidin salındığında aktivitesini koruduğunu ve iki *Acinetobacter baumannii* suşu (AYE; ATCC 17978) ve diğer ESKAPE patojenlerinin büyümesini engellediğini belirtmişlerdir (Ramos et al. 2024)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (YUTAM), Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunmaktadır. Kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazların adı ve modelleri

Cihazlar	Marka-Model	Cihazlar	Marka-Model
+4 °C Soğutucu	Beko	Homojenizatör	Qiagen Tissue Lyser LT
-20 °C Soğutucu	Beko	Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad PowePac Basic
Mikrobiyoloji Steril Kabin	Bio Safety Cabinet ClassII	Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Quanta 250
Statik İnkübatör	Memmert	PCR Cihazı	Thermo Scientific
Çalkalayıcı İnkübatör	Nükleon Incubator	Vortex	XH-C Vortex
Otoklav	Hiramaya Hv 50-L	Işık mikroskobu	ZEISS, Prmo Star
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore Q-3W	qRT-PCR Cihazı	Rotor-Gene Q
Mikroplaka Spektrofotometrisi	BioTek Epoch	Homojenizatör	Qiagen Tissue Lyser LT

3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Mikroorganizmalar ve Hücre Hattı

Bakteri ve maya suşları Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir, patojen mikroorganizmalar Çizelge 3.2’de verilmiştir. İnsan dermal fibroblast hücre hattı ise (HDFa, ATCC® PCS-201-012) Erzurum Teknik Üniversitesi, Kanser Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan patojen mikroorganizmalar.

Bakteri 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)
Maya suşları	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 220199
<i>Candida tropicalis</i>	KUEN 1025

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları

3.1.3.1. Luria-Bertani (LB) Broth

LB broth toz besiyerinden 25 g tartılmış ve 1 L distile suda çözülmüştür. 121°C' de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.2. Luria-Bertani Agar (LBA)

LB agar toz besiyerinden 40 g tartılmış ve 1 L distile su ile çözülmüştür. 121°C' de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası petri kaplarına dökülmüş ve kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.3. Mueller-Hinton Broth (MHB)

MHB toz besiyerinden 26,5 g tartılmış 1 L distile suda çözölmüştür. 121°C' de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir.

3.1.3.4 Mueller-Hinton Agar (MHA)

MHA toz besiyerinden 36 g tartılmış ve 1 L distile suda çözölmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Ardından petri kaplarına dökölüp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.5 Triptik Soy Broth (TSB)

TSB toz besiyerinden 30 g tartılıp 1 L distile suda çözölmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası kullanılana kadar 4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.6. Patates Dekstrozo Agar (PDA)

PDA toz besiyerinden 39 g tartılmış ve 1 L distile su ile çözölmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Ardından petri kaplarına dökölerek kullanılmıştır. Kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.7. Plate Count Agar (PCA)

PCA toz besiyerinden 22,5 g tartılmış ve 1 L distile su ile çözölmüştür. Otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril hale getirilmiştir. Petri kaplarına dökölüp kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.8. Nematode Growth Medium (NGM)

C. elegans'ı költüre almak ve geliştirmek için Nematod Büyüme Ortamı (NGM) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriğı çizelge 3.2'de verilmiştir. Besiyeri içeriğı

hazırlandıktan sonra steril etmek için 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra otoklav sonrası maddeleri eklenmiş ardında 90 mm ve 16 mm petri kaplarına dökülmüştür. Kullanılana kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir. NGM besiyeri içeriği Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. NGM besiyeri içeriği.

NGM	1L için otoklav öncesi	1L için otoklav sonrası
NaCl	3g/mL	1 mL kolesterol (5mg/mL)
Pepton	2,5g/mL	1 mL 1M CaCl ₂
Agar	20g/mL	1 mL 1M MgSO ₄
		25 mL 1M KH ₂ PO ₄

3.1.4. Biyofilm Testi Solüsyonları

3.1.4.1. %0,1’lik Kristal Viyole Boyası

Granül halinde bulunan kristal viyole (KV) boyasından 50 mL’lik hazırlamak için 0,05 g tartılmış 35 ml %99’lık etil alkolde çözülmüştür. Ardından 15 mL saf su eklenip 1 gün bekletilmiştir. Süre sonunda boya 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.1.4.2. %30’luk Asetik Asit

50 mL %30’luk Asetik Asit hazırlamak için 35 ml saf suyun üzerine yavaş bir şekilde %99,9’luk asetik asitten 15 ml ilave edilmiştir.

3.1.5. *C. elegans* deneylerinde Kullanılan Solüsyonlar

3.1.5.1. M9 Buffer

M9 buffer hazırlamak için 0,3g KH₂PO₄, 0,6g Na₂HPO₄, 0,5g NaCl tartılmış ve üzerine 100 mL distile su eklenmiştir. Ardından otoklav ile 121°C’de 15 dakika steril

hale getirilmiştir. Otoklav sonrası solüsyon soğuduktan sonra 1M 100 µL MgSO₄ eklenmiştir. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.5.2. S Buffer

S buffer hazırlamak için Çizelge 3.4’deki maddeler kullanılmıştır. Solüsyon hazırlandıktan sonra steril hale getirmek için 121 °C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Çizelge 3.4. S buffer içeriği.

S Buffer	100 mL
K ₂ HPO ₄ (0,05M)	12,9 mL
KH ₂ PO ₄ (0,05M)	87,1 mL
NaCl	0,585 g

3.1.5.3. Yumuşak Agar Dondurma Çözeltisi

0,58 g NaCl, 0,68 g KH₂PO₄, 30 g gliserol, 0,56 mL 1M NaOH, 0,4 g agar bir araya getirilip üzerine 100 mL distile su eklenmiştir ardından steril etmek için 121 °C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

3.1.5.4. Floxuridine (5'-fluorodeoxyuridine, FUdR)

Ticari olarak 100 mg satın alınan FUdR 4 ml steril distile su ile çözündürülmüştür, böylece 100 mM (25 ug/ mL) konsantrasyonunda FUdR solüsyonu elde edilmiş ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.6. Primerler

3.1.6.1 Patojen Virülans Genlerinin Primerleri

qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek genlerin primerlerinin listesi Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Patojen bakteriler için qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek olan genlere ait primerler.

Bakteri türleri	Genler	Primer dizileri	Referanslar
<i>S. aureus</i> (MRSA)	<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'AGCAACTATATCATCTTTGTAAATATG3'	Alexander vd, 2020
	<i>pbp2a</i>	F: 5'ACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAG3' R: 5'AATTTGAGCATTATAAAATGGATAATCAC3'	Alexander vd, 2020
<i>P.aeruginosa</i> (PAO1)	<i>rpoD</i>	F: 5'CATCCGCATGATCAACGACA3' R: 5'GATCGATATAGCCGCTGAGG3'	Beaudoin et al. 2012
	<i>lasB</i>	F: 5'GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC3' R: 5'TTGCGTCGACGAACACCTCG3'	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 et al, 2004
	<i>oprI</i>	F: 5' AACAGCGGTGCCGTTGAC3' R: 5 GTCGGAGCTGTCGTACTCGAA3'	Beatrice et al, 2004

3.1.6.2. *C. Elegans* Bağışıklık Genlerinin Primerleri

qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek genlerin primerlerinin listesi Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. *C.elegans* için qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenecek olan genlere ait primerler.

Genler	Primer dizileri	Referanslar
<i>pmp-3</i>	F: 5'AGGATGATTGGCCGGATGAT3' R: 5'CGACGCCAATGACAATCCAT3'	Bu çalışma
<i>akt-1</i>	F: 5ACGTTGTGTTGATTGGTGGG3' R: 5'CCGGTGAGCAAAGTTCTAGC3'	Bu çalışma
<i>atf-7</i>	CCACAAAACGGTACACCTGG3' R: 5'TACCCTTTCGAGTTCCCGTC3'	Bu çalışma
<i>nlp-29</i>	F: 5GTTCTTGTCGTCCTTCTCGC3' R: 5'ACTTCCCCATCCTCCATACA3'	Bu çalışma
<i>Zip-2</i>	Zip-2 F: 5'ATGCATTTCGATTTCACCG3' Zip2 R: 5' CGCTGGAGGAGAAATGTGTG3'	Bu çalışma

3.2 Yöntem

3.2.1. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Tasarımı

Pleurocidin türevi peptitler olan GK-11 ve LF-12 peptitleri biyoinformatik araçlar kullanılarak tasarlanmıştır. Burada peptitlerin yükleri, hedef bölgeleri, uzunlukları, hidrofiliği gibi özellikleri göz önünde bulundurularak veri tabanlarında filtrelemeler sonucunda GK-11 ve LF-12 peptitlerinin dizileri elde edilmiştir.

3.2.2. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Sentezi

Tasarlanan peptitler (GenScript Biotech USA) mikrodalga destekli katı faz peptit sentezi metodu ile sentezlenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), C-18 kolonları ile saflaştırma işleminin ardından liyofilize peptitler elde edilmiştir. Sentez sonrası kontroller aynı firma tarafından HPLC ve kütle spektroskopisi ile yapılmıştır. (Merrifield 1986) .

3.2.3. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Yaspısının ve Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Sentezlenen peptit moleküllerinin karakterizasyonu ve sekonder yapılarının tayini için, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır.

3.2.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

FTIR-ATR, Bruker VERTEX 70 V cihazı kullanılarak, fosfat tamponu içerisinde çözölmüş olan 5 µg/mL ABP moleküllerinin 500-4000/cm⁻¹ frekans aralığında ölçömleri alınmıştır (Sadat and Joye 2020a).

3.2.3.2. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi

0,1 µg/mL fosfat tamponu içerisinde çözölmüş olan peptit örneklerin spektrumları, 50 nm/dakika tarama hızında, 190-260 nm aralığında 25°C sıcaklıkta ölçölmüştür. Elde edilen spektrumlar Bestsel algortması kullanılarak peptitlerin sekonder yapıları belirlenmiştir (Zhao et al. 2016).

3.2.4. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Bakteri ve Maya Suşlarının Kültüre Alınması

Peptitlerin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini değörlendirmek için, -80 stoklarında bulunan patojen mikroorganizmaları kullanılmıştır. Patojen bakteri suşları Mueller Hinton Agar (MHA) ve Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 37°C’de 24 saatlik kültürler halinde geliştirilmiştir. Antikandidal aktivite tayini için kullanılan *Candida* türleri Potato Dekstrose Agar (PDA) besiyerinde 30°C’de 24-48 saatlik kültürler ile geliştirilmiştir.

3.2.4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Mikrodilüsyon Testi ile Belirlenmesi

Peptitlerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) mikrodilüsyon testi ile belirlenmiştir. Peptitlerin bakterilere karşı MIC değerinin belirlenmesi için 96 kuyulu plaklara 100 µL steril MHB besiyeri dağıtılmış ve artan konsantrasyonda (0-512 µg/mL) GK-11 ve LF-12 peptitleri eklenmiştir. Ardından bu kuyuların üzerlerine 37°C’de overnight gelişmiş, 0,5 McFarland olarak ayarlanmış bakteri suşları 100 µL olarak eklenmiştir. Plaklar 37°C’de 24 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra üremenin olmadığı konsantrasyonlar peptitlerin bakterilere karşı MIC değerini vermiştir.

Candida türlerine karşı MIC değerlerinin belirlenmesi için, mayalar 24 saat PDB besiyerinde geliştirilip konsantrasyonları 1×10^6 - 5×10^6 hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. 96 kuyulu plaklara 100 µL RPMI 1640 besiyeri (MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) eklenmiş RPMI besiyeri) dağıtılmış ve artan konsantrasyonlarda (0-512 µg/mL) GK-11 ve LF-12 peptitleri eklenmiştir. Bu kuyuların üzerlerine konsantrasyonu ayarlanan maya hücrelerinden 100 µL eklenmiş ve 48 saat 37 °C’de statik inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda üremenin olmadığı konsantrasyonlar MIC değeri olarak belirlenmiştir (de Moraes et al. 2023).

3.2.4.3. Antibiyofilm Aktivitenin Kristal Viyole (KV) ile Belirlenmesi

3.2.4.3.1. Peptitlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin (MBIC) Belirlenmesi

96 kuyulu plaka kuyularına 100 µL MHB besiyeri konulmuştur ve artan konsantrasyonlarda (0-512 µg/mL) GK-11 ve LF-12 peptitleri eklenmiştir. Ardından 0.5 McFarland olarak ayarlanan PAO1 ve MRSA bakterileri 100 µL olarak kuyulara dağıtılmıştır. Plaklar 37°C’de 48 saat statik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyuların içeriği çıkarılmış ve 3 defa PBS ile tüm kuyular yıkanmıştır. Kuyu yüzeylerindeki biyofilmleri boyamak için %0,1’lik KV, 200 µL olarak kuyulara eklenip 20 dakika beklenmiştir. Süre sonunda musluk suyu ile boyaların fazlası kuyulardan temizlenmiştir. Ardından %30’luk asetik asit eklenmiş ve 5 dakika boyanın çözünmesi beklenip spektrofotometrede OD₅₉₅ nm’de ölçüm alınmıştır. Sadece besiyeri eklenen

kuyular negatif kontrol sadece patojen mikroorganizma içeren kuyular pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Boyama ve ölçüm sonucunda biyofilm yapısının oluşmadığı konsantrasyonlar MBIC değeri olarak belirlenmiştir (Li, Chen, and Lin 2021c).

3.2.4.3.2. Biyofilm Eradikasyon Testi

96 kuyulu plaka kuyularına 100 µL MHB besiyeri konulmuştur ve üzerlerine 0.5 McFarland PAO1 ve MRSA bakterileri eklenip 37°C’de 24 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyuların içerikleri 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Ardından 200 µL MHB besiyeri eklenmiş ve artan konsantrasyonlarda (0-512 µg/mL) GK-11 ve LF-12 peptitleri eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 24 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyuların içeriği 3 defa PBS temizlenmiş ve %0,1’lik KV ile 20 dakika boyanmıştır. Ardından boya musluk suyu ile temizlenmiş, kuyulara %30 asetik asit eklenip boyalar çözüldükten sonra OD₅₉₅ nm’de ölçüm alınmıştır (Haney, Trimble, and Hancock 2021).

3.2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

6 kuyulu plaka kuyularına steril lameller konulmuştur. Ardından kuyulara 3,5 ml MHB besiyeri ve ayrı ayrı 1,5 ml 0,5 McFarland PAO1 ve MRSA bakteri kültürleri onulmuştur. 1/2 ve 1 MIC konsantrasyonundaki GK-11 peptidi kontrol hariç kuyulara eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak sadece bakteri kültürü ve besiyeri eklenen kuyular kullanılmıştır. 37°C’de 48 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda lameller 3 kez PBS ile yıkanmış ve %5’lik glutaraldehit içinde 1 saat fikse edilmiştir. Ardından sırası ile, %20, %50, %80 ve %100 etanol içinde 10’ar dakika tutulmuştur. Bu işlem sonunda lameller SEM cihazında, SE modülünde, 10 paskal basınç altında, 60.000-100.000 kat büyütme ile görüntü alınmıştır (Howlin et al. 2017).

3.2.4.5. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve)

0,5 McFarland konsantrasyonunda 4 ml’lik PAO1 ve MRSA kültürleri hazırlanmıştır. Ardından tüplere 0, 1/4 MIC, MIC, 2MIC, 4MIC konsantrasyonlarında GK-11 peptidi uygulanmıştır. Tüpler 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona

bırakılmıştır ve 30. dakika, 1, 2, 4, 6, 12, 24. saatlerde örnekler alınıp 10^{-6} 'lık seyreltme yapılmıştır. Alınan örnekler PCA besiyerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Petriler 24 saatlik 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan koloniler sayılarak cfu/mL hesabı yapılmıştır (Zhang et al. 2016b)

Değerlendirmede kullanılan formül:

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

3.2.4.6. Bakteri Canlılık testi- SYTO 9 ve Propidyum İyodür Boyaması

PAO1 ve MRSA, MHB besiyerinde 37°C 'de 16 saat inkübasyonunun ardından, $1000\times\text{g}$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 1 mL %0,85 NaCl çözeltisinde yeniden süspanse edilmiştir. Ardından bakteri süspansiyonuna $4\times\text{MIC}$ GK-11 peptidi, floresan boyalar NucView Green (1,5 μL) ve propidyum iyodür (1,5 μL) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiş ve örnekler 3 μL olacak şekilde lam üzerinde floresan mikroskobu ile incelenmiştir (Tawakoli et al. 2013).

3.2.4.7. CVDK- 8 testi

Canlılık testi için CVDK-8 hücre canlılık test kiti (Eco-Tech, Türkiye) kullanılmıştır. PAO1 ve MRSA overnight kültürleri 1:1 MHB besiyeri ile seyreltilmiş ve 96 kuyulu plak kuyularına 100 μL 'si dağıtılmıştır. Ardından bu kuyuların üzerine 1/2 - 1- 2- 4 MIC konsantrasyonunda GK-11 petidinden eklenmiştir ve 37°C 'de 1 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. Ardından uygulama kuyularına 10 μL CVDK-8 solüsyonu eklenmiş ve 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 'de ölçüm alınmıştır.

3.2.5. GK-11 Peptidinin PAO1 ve MRSA Virülans Genleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Planktonik Kültür Hazırlanması

MRSA ve PAO1 overnight kültürleri 0,5 McFarland olarak ayarlanmıştır. Bu kültürlerden 6 ml yeni tüplere aktarılmıştır ve 1/2 MIC değerlerinde GK-11 peptidi uygulanmıştır ve 16 saat 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak peptit eklenmeyen bakteri kültürleri kullanılmıştır. Hazırlanan kültürler süre sonunda RNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.5.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Trizol® yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir Planktonik kültürlerden RNA izolasyonu için ilk olarak tüplerde bulunan kültürler oda sıcaklığında 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp tüpün dibinde kalan besiyeri pipet ile alınmıştır. Filtreli tip ile pellet üzerine 500 µL trizol eklenmiştir. Trizol eklendikten sonra vortex atılmış ve içerik 2 mL’lik tüplere aktarılmıştır. Tüplerin içine steril DEPC’li sudan geçirilmiş metal boncuklar konulmuştur. 30 Hz’de 10 dakika homojenizatörde homojenize edilmiştir. Süre sonunda süpernatant kısımları 1,5 mL’lik tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 100 µL kloroform eklenip tüpler alt üst edilerek içeriğin karışması sağlanıp 3 dakika bekletilmiştir. Ardından 4°C 10.000g’de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst fazlar yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 250 µL soğuk izopropanol eklenmiş ve alt üst edilerek karışması sağlanmıştır ardından 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 4°C 12.000 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatant dökülmüş ve 1mL %75’lik soğuk etanol eklenmiştir. Ardından 4°C 12.000 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve pellet (RNA) kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra 100 µL RNaz free su ile çözündürülmüştür. Ardından izole edilen RNA’nın konsantrasyonu ölçülmüş ve %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntü alınmıştır.

3.2.5.3. c-DNA Sentezi

RNA örnekleri ticari olarak satılan (A.B.T.TM) c-DNA sentez kiti kullanılarak c-DNA'ya çevrilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ölçülmüş c-DNA'ya çevrilmesi için 3,2 µL nukleaz free su, 2 µL 10x RT buffer, 0,8 µL 25xDNTP Mix (100m M), 2 µL 10xRT Random Primer, 1 µL RNase İnhibitör, 1 µL Revers transkriptaz kullanılarak totalde 10 µL'lik reaksiyon kurulmuştur. Ardından konsantrasyon eşitlemesi yapılan RNA örneklerinden 10 µL reaksiyona eklenmiştir. Reaksiyon koşulları 25°C 10 dk; 37°C 120 dk ve 85°C 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen c-DNA'lar -20 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.5.5. qRT-PCR

Real time PCR için (EvaGreen® Dye) kullanılmıştır, 2 µl 5x Master Mix, 0,2 µL primerler, 2 µL c-DNA ve 5.2 µL dH₂O ile reaksiyon kurulmuştur. PCR reaksiyonu, 95°C, 12 dk; 95°C, 15 sn; 60°C, 20 sn; 72°C, 20 sn ve 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 2^{-(ΔΔCT)} yöntemine göre hesaplanmıştır.

3.2.6. GK-11 Peptidinin Hemolitik ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Ticari olarak satın alınan kan örneğinden 5mL falkon tüpüne alınmış ve üzerine 5mL PBS eklenmiştir. Ardından 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üst faz rengi arınana kadar PBS ile yıkama işlemine devam edilmiştir. Yıkama sonunda üst faz atılıp alt faz yeni falkona alınmıştır. Alt faz kadar (1:1) PBS eklenip ependorf tüplerine 200 µL dağıtılmıştır. Tüplere GK-11 peptidi 4-256 µg/ mL konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından 10 dakika 13,500 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Üst fazlar alınıp 96 kuyulu plak kuyularına eklenip OD_{405 nm}'de ölçüm alınmıştır. Pozitif kontrol olarak %100 hemoliz oluşturan Tween-20, negatif kontrol olarak %0 hemoliz oluşturan PBS kullanılmıştır.

3.2.6.2. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.6.2.1. Hücre Kültürü Koşullarının Hazırlanması

İnsan dermal fibroblast hücre hattı (HDFa, ATCC® PCS-201-012), bazal besin ortamı olarak Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (DMEM, Gibco®) kullanılarak kültüre edilmiştir. Ayrıca ortama %1'lik bir penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich®) çözeltisiyle birlikte %10 konsantrasyonda fetal sığır serumu (FBS, Sigma-Aldrich®'ten elde edildi) eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de ve %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir. İstenilen tutunma noktasına ulaşıldığında, HDFa hücreleri bir tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma-Aldrich®) kullanılarak ayrılmıştır. Ayrılmanın ardından, hücreler 48-kuyulu plakalara eşit şekilde dağıtılmış ve sonraki deneysel aşamalar için hazırlanmıştır.

3.2.6.2.2. MTT Testi

MTT testi ticari olarak satın alınan kit yardımı ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 96 kuyulu plaklarda optimum etkileşime elverişli yoğunluklarında (%70-80) olan HDFa (Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult) hücrelerine artan konsantrasyonlarda (0-256 µg/mL) GK-11 peptidi uygulanmıştır. Ardından plaklar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, her bir kuyuya 10 µL MTT reaktifi (5 mg/mL konsantrasyon) eklenmiş ve 3 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her bir kuyuya 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich®) eklenmiş ve OD_{570 nm}'de ölçüm alınmıştır.

3.2.6.2.3. LDH Testi

LDH testi ticari olarak satın alınan kit ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 48 kuyulu plaklara mL'de 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin tutunmasının ardından artan konsantrasyonlarda (0-256 µg/mL) GK-11 peptidi uygulaması yapılmıştır. 48 saat 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yeni plak kuyularına besiyerlerinin 90 µL'si aktarılmıştır. Üzerlerine 10 µL LDH sitotoksikite testi bileşeni eklenip 30 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından OD_{495 nm}'de ölçüm alınmıştır. Pozitif kontrol olarak 15 µL TritonX-100 kullanılmıştır.

3.2.7. *In Vivo* Model Olan *C. elegans*'ta GK-11 Peptidinin Toksik ve İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.7.1 *C. elegans*'ın Kültüre Alınması

C. elegans kültüre alınırken *E.coli* OP50 suşundan bir öze dolusu alınıp NGM besiyeri üzerine dağıtılmıştır. Bir önceki kültürdeki besiyerinden *C. elegans* olan kısımlardan besiyeri parçası alınıp yeni hazırlanan NGM üzerine konulmuş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.7.2. *C. elegans* Frozen Hazırlanması

C. elegans'lardan yumurta izolasyonu yaptıktan sonra yumurtalar L1 larva aşamasına geldiğinde *E.coli* OP50 olmayan NGM besiyerine aktarılmıştır. Burada L2 larva aşamasına kadar geliştirilmiştir. Ardından L2 *C. elegans*'lar petriden S buffer ile steril 15'lik falkona toplanmış ve falkon 15 dakika buzda tutulmuştur. Ardından tüpe 1:1 oranında yumuşak agar dondurma çözeltisi konulup cryo tüplere 1 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler -80°C'de muhafaza edilmiştir. Frozen *C. elegans*'ların 24 saat sonra ve 3 ay sonra canlılıkları kontrol edilmiştir (Barranco and Risco 2022) .

3.2.7.3. *C. elegans* Yaş Senkronizasyonu

Yaş senkronizasyonu ilk olarak *C. elegans*'tan yumurta izolasyonu ile başlamaktadır. 2-3 günlük *C. elegans* kültüründeki *C. elegans*'lar M9 buffer ile toplanmıştır. 2 mL'lik tüpe 1.5 mL aktarılıp 400 g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pellet şeklinde çöken *C. elegans*'lar iki defa M9 buffer ile 400g'de yıkanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpe 1 mL M9 buffer, 160 µL çamaşır suyu ve 160 µL NaOH (5M) eklenmiştir. Tüpler birer dakika ara ile 20 saniye vortex yapılmıştır, pellet yoğunluğuna göre değişmekle birlikte ortalama olarak 5 dakika bu işlem gerçekleştirilmiştir. Ardında 400 g'de santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır. Pellet (yumurtalar), M9 buffer ile 3 defa yıkanmıştır. Süpernatant atılıp pellet yani yumurtalar elde edilmiştir ve içinde 10 mL M9 buffer bulunan 50'lik falkona aktarılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre

sonunda santrifüj yapılmış ve yaş senkronizasyonu gerçekleşen L1 larvalar, üzerinde *E.coli* OP50 bulunan NGM besiyerlerine aktarılmıştır. L1'ler L4 evresine gelince deneylerde kullanılmıştır (Mishra, Gaur, and Agarwal 2020).

3.2.7.4. Toksisite Belirlenmesi

6 kuyulu plaklara NGM besiyeri konulmuştur. Besiyerlerinin ortalarına 50 µL overnight *E.coli* OP50 bakterisi eklenip 48 saat 25°C inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaklara 32 – 512 µg/mL konsantrasyonlarında GK-11 peptidi uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece *E.coli* olan ve peptit olmayan kuyular kullanılmıştır. Peptitlerin emilmesi için 30 dakika beklenmiştir. Ardından yaş senkronizasyonu yapılan L4 aşamasındaki *C. elegans*'lardan 25 adet her bir kuyuya eklenmiştir. Plakalar 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. *C. elegans*'lar 24 saatte bir ışık mikroskobu ile incelenmiş ve ölü-canlı sayımı yapılmıştır (Xiong, Pears, and Woollard 2017).

3.2.7.5. Yavaş Öldürme (Slow Killing) Testi

PAO1, MRSA ve *E.coli* OP50 overnight bakteri kültürlerinden 50 µL alınmış ve içinde NGM bulunan petrilerin ortalarına eklenmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda inkübatörden alınan petrilerin 30 dakika soğuması beklenmiştir. Ardından yumurta çatlamasını engellemek için 5'-fluorodeoxyuridine (FUdR) besiyerinde bakteri çiminin etrafına 25 ug/ mL'lik konsantrasyondan 40 µL dağıtılmıştır. FUdR emildikten sonra yaş senkronizasyonu yapılmış L4 seviyesindeki *C. elegans*'lardan 25 tane alınıp her petriye eklenmiştir. Petriler 25°C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda PAO1 ve MRSA bulunan kuyulara GK-11 peptidi patojenlere karşı MIC değerinde uygulanmıştır. Ardından petriler 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır ve 24 saatte bir MIC değerlerinde GK-11 uygulaması yapılmıştır. Her peptit uygulaması yapılmadan hemen önce ışık mikroskobu ile ölü- canlı *C. elegans* sayımı yapılmıştır. Sadece patojen ve *C. elegans* bulunan petriler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Burkhardt et al. 2023).

3.2.7.6. İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.7.6.1. *C. elegans*'lara Patojen ve Peptit Uygulanması

PAO1, MRSA ve *E.coli* OP50 overnight bakteri kültürleri 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır. NGM besiyeri üzerine MRSA ve PAO1 bakteri kültürlerinden 50 µL konulup GK-11 peptidinin MIC değerlerinde uygulaması yapılmıştır. Ardından petrilere 25 adet L4 evresindeki *C. elegans* konulmuştur. Petriler 25°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olan, *E.coli* OP50 bakterisi için aynı işlem peptit uygulanmadan gerçekleştirilmiştir (Hummell, Revtovich, and Kirienko 2021b).

3.2.7.6.2. *C.elegans*'dan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Trizol® yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Patojen ve peptit uygulaması yapılan *C. elegans*'lar petrilere M9 buffer ile 15'lik falkonlara toplanmıştır ve santrifüjle 400g'de çöktürülmüştür. Çöktürülen *C. elegans*'lar 3 defa M9 ile yıkamıştır. Sıvı kısım atıldıktan sonra *C. elegans* pelleti 1 mL trizol ile çözündürülüp 2 mL'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin içine steril DEPC'li sudan geçirilmiş metal boncuklar eklenmiştir. Homojenizatörde 40 hZ'de 10 dakika homojenize edilmiştir. Ardından 12.000 g 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüpe alınmış 200 µL kloroform eklenip tüp alt-üst edilmiştir ardından 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 12.000 g 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınmıştır, üzerine 500 µL (1:1) izopropanol eklenmiştir ve alt-üst yapıp 10 dakika bekletilmiştir. Ardından 12.000 g 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatant atılmış ve pellet üzerine 1 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 7.500 g 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet (RNA) yıkanmıştır. Süpernatant dökülüp pellet hava ile kurutulmuştur ve 50 µL RNase free su ile çözülmüştür. Ardından izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ölçülüp %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2.7.6.3. c-DNA Sentezi

İzolasyonu yapılan RNA örnekleri ticari olarak satılan (A.B.T.™) c-DNA sentez kiti yardımıyla, c-DNA'ya çevrilmiştir. İlk olarak izole edilen RNA örneklerinin

konsantrasyonu ölçülmüş c-DNA'ya çevrilmesi için 3,2 µL nukleaz free su, 2 µL 10 x RT buffer, 0,8 µL 25 x DNTP mix (100m M), 2 µL 10x RT Random Primer, 1 µL RNase İnhibitörü, 1 µL Revers transkriptaz kullanılarak totalde 10 µL'lik reaksiyon kurulmuştur. Ardından konsantrasyon eşitlemesi yapılan RNA örneklerinden 10 µL reaksiyona eklenmiştir. Reaksiyon koşulları 25°C 10 dk; 37°C 120 dk; 85°C 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen c-DNA'lar -20 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.7.6.4. qRT-PCR

Real time PCR için 2 µl 5x master mix, 0,2 µl primerler, 2 µl c-DNA ve 5,2 µl dH₂O ile reaksiyon kurulmuştur. PCR reaksiyonu, 95°C, 12 dk; 95°C, 15 sn; 60°C, 20 sn; 72°C, 20 sn ve 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 2-(ΔΔCT) yöntemine göre hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Tasarımı

Antibiyofilm etkili peptit tasarımı için ilk olarak veri tabanı filtreleme teknolojisi kullanılmıştır. Evrimsel olarak, antimikrobiyal peptitlerde korunan özellikler temel alınarak yapılan bu tarama sonucunda *Pleuronectes americanus*'da bulunan pleurocidin peptidi tespit edilmiştir.

Peptit dizayn etmek için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak doğal olarak bulunan AMP moleküllerin şablon olarak kullanılması, rastgele kombinasyonlar ile yapılan rasyonel tasarım (*de nova*), bir peptit dizisindeki amino asitlerin pozisyonlarının değiştirilmesi, AMP motiflerinin hibridizasyonu ve veri tabanlarında geliştirilen biyoinformatik yaklaşım uygulamaları verilebilmektedir (Mishra and Wang 2012).

Temelde antibiyofilm aktivitesine sahip, toksik ve hemolitik aktivitesi olmayan sentetik peptitler tasarlanması amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda peptitler sentezlenmeden dizileri ile biyoinformatik araçlar kullanılarak peptitler kontrol edilmiştir. Tasarlanan peptidlere GK-11 ve LF-12 adları verilmiştir. GK-11 ve LF-12 peptitleri, doğal olarak bulunan AMP moleküllerinin şablon olarak kullanılması ve veri tabanlarında geliştirilen biyoinformatik yaklaşım uygulamaları ile tasarlanmıştır. Ayrıca peptitlerin proteazlara karşı korunabilmesi için C-terminal kısımlarında amidasyon (-NH₂) modifikasyonu yapılmıştır. Doğal olarak bulunan pleurocidin amino asit dizisi Çizelge 4.1. ve tasarlanan GK-11 ile LF-12'ye ait peptitlerin amino asit dizisi Çizelge 4.2. verilmiştir.

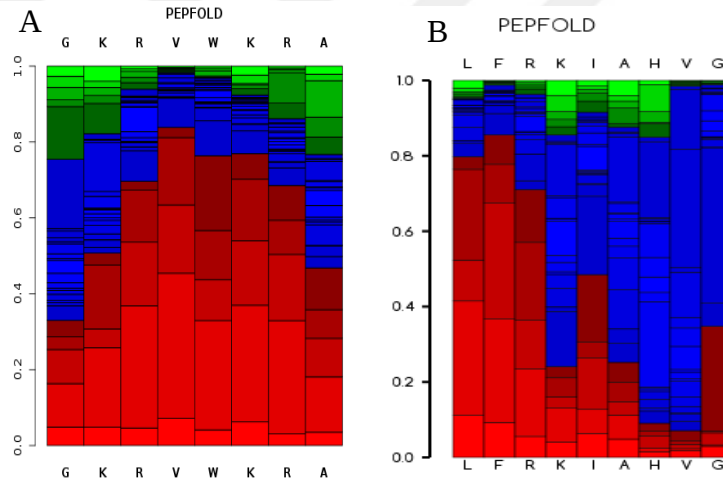
Çizelge 4.1. Pleurocidin amino asit dizisi.

Peptit	Amino Asit Dizisi	Referans
Pleurocidin	GWGSFFKKAHVKGKGVKAALTHYL	Code vd, 1997

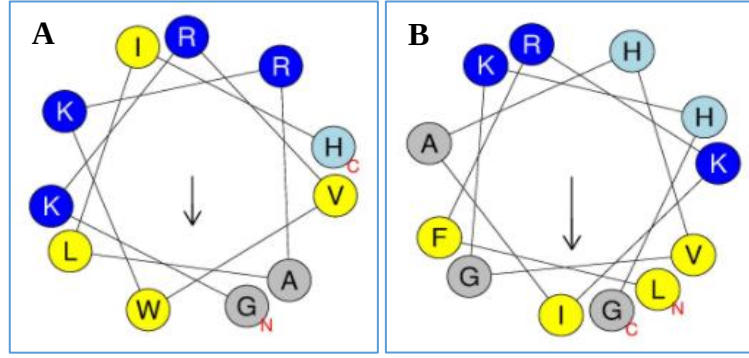
Çizelge 4.2. GK-11 ve LF-12 peptitlerinin amino asit dizileri.

Tasarlanan Peptit Kodu	Amino Asit Dizisi
GK-11	GKRVWKRALIH-NH ₂
LF-12	LFRKIAHVGKHG-NH ₂

Peptitler dizayn edildikten sonra yapı tahmini yapmak için PEP2D (<http://crdd.osdd.net/raghava/pep2d/submit.html>) aracı kullanılmıştır. Peptitlerinin pepfold grafik analizi şekil 4.1’de verilmiştir. Bu grafik, yapısal tahmin profilini göstermektedir. Grafikte kırmızı renk sarmal yapı, mavi renk koil ve yeşil renk genişletilmiş yapıları temsil etmektedir. Bu olasılık analizi ile peptitlerin muhtemel helix yapısı tahmin edilmektedir.

**Şekil 4.1.** A: GK-11 ve B: LF-12 sentetik peptitlerinin Pepfold analiz grafiği.

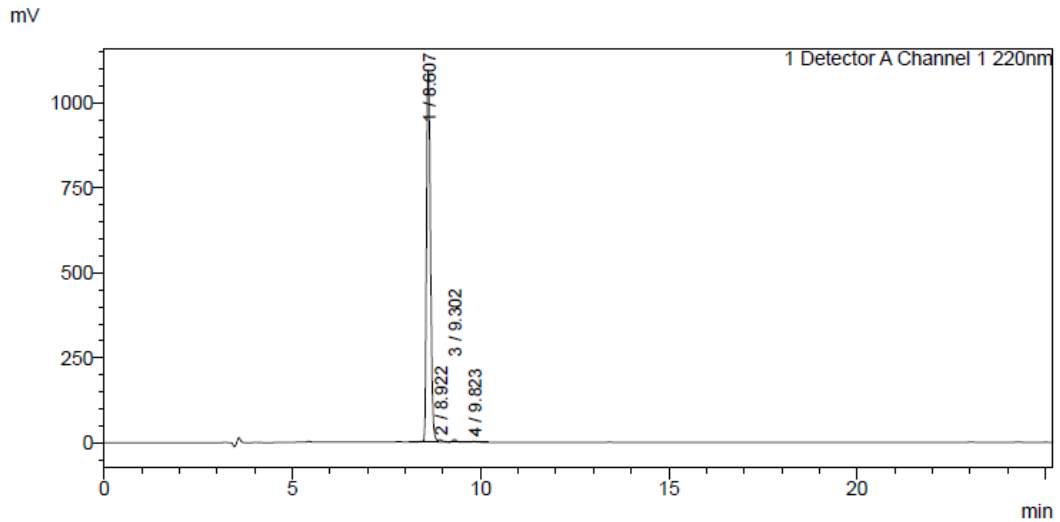
Peptidlere ait helical wheel diagram’ı şekil 4.2’de verilmiştir. Biyoinformatik araçlarla yapılan tahminlere göre peptitler α -sarmal yapı oluşturmaktadır. Helical wheel diagram’ında hidrofobik momentin yönü ok ile gösterilmiştir. Pozitif yüklü amino asitler mavi renk, hidrofobik amino asitler ise sarı renk ile gösterilmiştir.



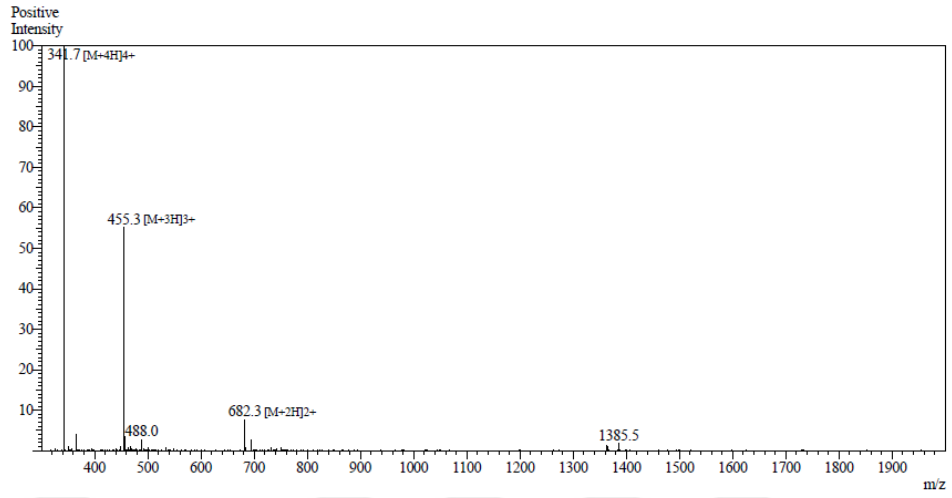
Şekil 4.2. A: GK-11 ve B: LF-12 peptidlerine ait helical wheel diagram'ı.

4.2. Pleurocidin Türevleri Olan GK-11 ve LF-12'nin Sentezi

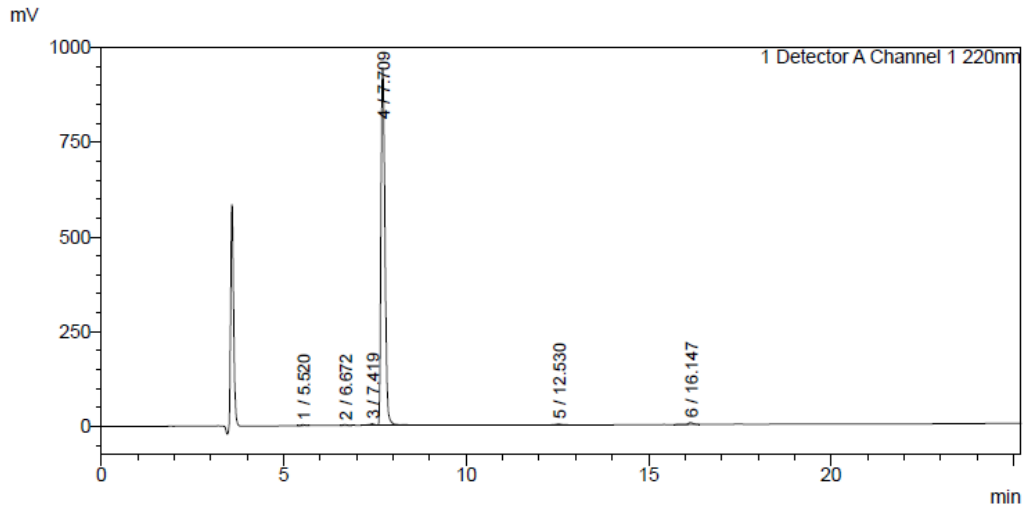
Tasarlanan peptitler katı faz peptit sentezi metodu ile sentezlenmiştir. Peptitlerin karakterizasyonu için gerçekleştirilen HPLC ve kütle spektroskopisine ait veriler Şekil 4.3;4.4;4.5;4.6'da verilmiştir. Grafiklerde başka bir peak görülmemesi peptitlerde kirlilik olmadığı ve saf olarak sentezlendiğini göstermektedir. Peptitler HPLC ile saflaştırılıp saflıkları da kütle spektroskopisi ile kontrol edilmiştir.



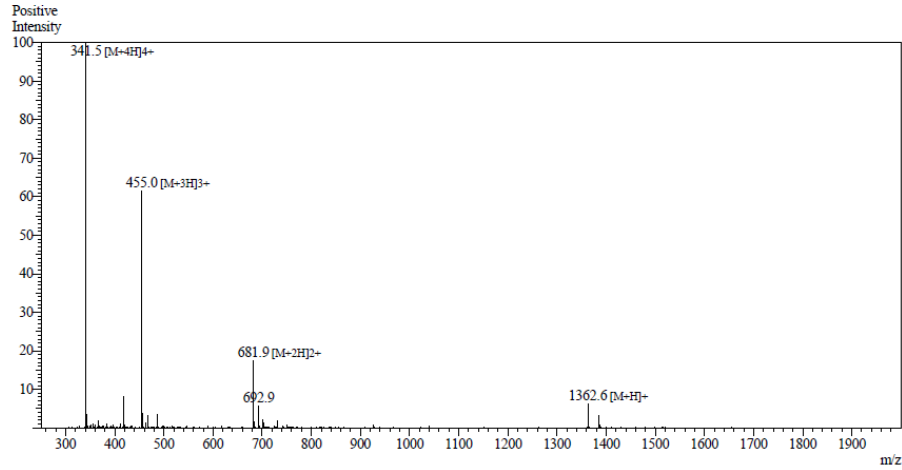
Şekil 4.3. GK-11 peptidine ait HPLC grafiği.



Şekil 4.4. GK-11 peptidine ait kütle spektroskopisi grafiği.



Şekil 4.5. LF-12 peptidine ait HPLC grafiği.



Şekil 4.6. LF-12 peptidine ait kütle spektroskopisi grafiği.

Yapılan analizler sonucunda GK-11 ve LF-12 peptitlerin elde edilme saflığı, moleküler ağırlığı, hidrofobiklik oranı ve net yükü Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. GK-11 ve LF-12 peptidlerine ait molekül özellikleri.

Peptit Kodu	Aminoasit Dizisi	Elde Edilme Saflığı	Moleküler Ağırlık (Da)	Hidrofobik oranı	Net Yük
GK-11	GKRVWKRALIH-NH ₂	% 98.3	1.363.669	% 45	(+) 4.25
LF-12	LFRKIAHVGKHG-NH ₂	% 98.3	1.362.638	% 42	(+) 3.5

4.3. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Yapısının ve Karakterizasyonunun Belirlenmesi

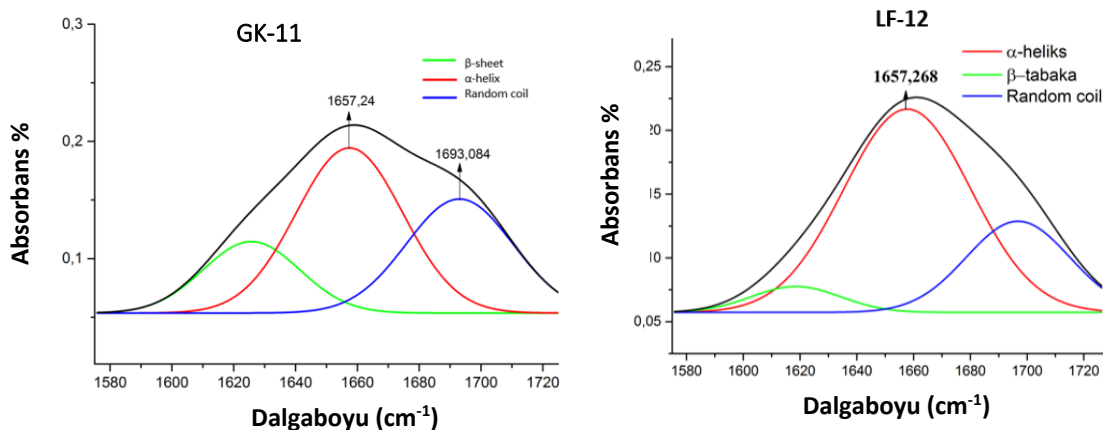
4.3.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

İki farklı yaklaşım kullanılarak GK-11 ve LF-12’nin ikincil yapısını belirlenmiştir. Bunlar FT-IR ve CD spektroskopisidir. FT-IR analizi ile biyoinformatik sonuçların doğrulaması ve peptitlerin su içerisinde çözöldüğünde hangi formlarda olduğu incelenmiştir. Originlab programı ile FT-IR cihazından alınan ham veriler analiz edilmiştir

FT-IR analizinde, 5 µg/mL peptit numunesi Zayıflatılmış Toplam Yansıma (ATR) modülü yardımıyla analiz edildi. 1600-1700 cm⁻¹ dalga boyu bölgesi, amid I pozisyonu olarak incelenmiştir. 1610-1627 cm⁻¹ aralığı moleküller arası β-tabaka; 1628-1642 cm⁻¹ β-tabaka; 1643-1650 cm⁻¹ düzensiz şekil (rastgele bobin); 1650-1659 cm⁻¹ α-sarmal yapı; 1660-1699 cm⁻¹ β-dönüş yapısı olarak incelenmiştir.

Originpro yazılımı kullanılarak peptitlerin amid I bağı zirvesinin tepe dekonvolüsyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, amid I bölgesinde bir temel düzeltme de yapılmıştır. Ardından Gauss dağılımına sahip 3 tepe belirlenmiştir ve her tepenin altındaki alan, toplam alana göre değerlendirilmiştir (Sadat and Joye 2020b).

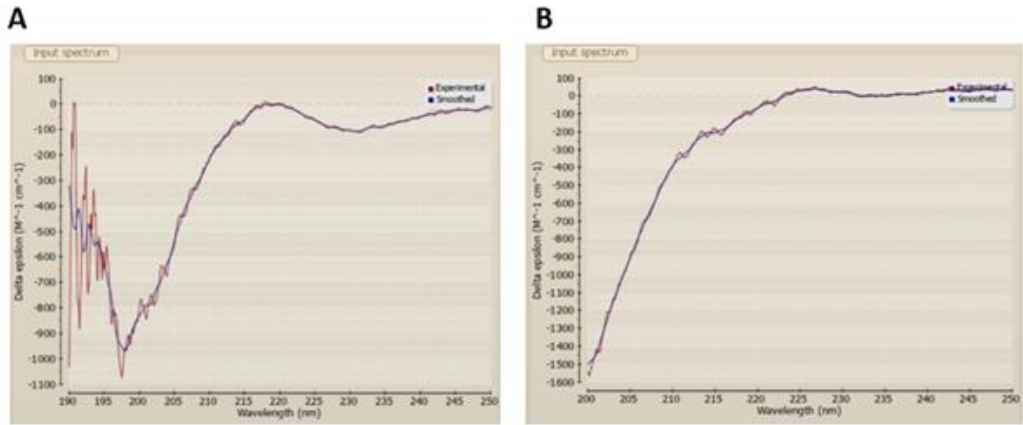
GK-11 ve LF-12 peptitlerinin sekonder yapı tahminlerine ait grafikler Şekil 4.7’de verilmiştir. GK-11 ve LF-12’nin FT-IR peak analiz grafiklerine göre iki peptidin de α-heliks yapısı ve β-dönüş yapısına sahip olabileceği görülmektedir.



Şekil 4.7. GK-11 ve LF-12’nin FT-IR peak analiz grafikleri.

4.3.2. Circular Dichroism (CD) Spektrometresi

Peptitlerin sekonder yapını belirlemek için kullanılan CD spektroskopisi analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Bestsel programı aracılığıyla incelenmiştir, sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Bestsel algoritması ile yapılan LF-12, GK-11 peptitlerinin analiz sonuçları.
A: LF-12 B: GK-11.

CD spektroskopisi sonuçlarına göre, GK-11'in %70,3 Sarmal ve %29,7 Dönüş ikincil yapıları sahip olduğu belirlenmiştir. Pleurocidin peptidinde α -helix yapısı %60 iken bu orana göre GK-11'de artış LF-12'de azalış meydana gelmiştir. GK-11 ve LF-12 peptitlerinin sekonder yapı oranlarının tahmini şekil 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. GK-11 ve LF-12 peptitlerinin sekonder yapı tahminleri.

Peptit Kodu	Sekonder Yapı Tahmini
GK-11	% 70,3 Heliks, % 29,7 Turn, % 0 Diğer
LF-12	% 48,3 Heliks, % 48,3 Paralel, % 3,4 Diğer

α -helix oranının yüksek olması peptidin bakteriye karşı öldürücü etkisinin artmasını sağlayan etkenlerden biridir. Ancak bazı durumlarda peptidin hemolitik aktivitesinin de artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Yoshida et al. 2001b).

4.4. GK-11 ve LF-12 Peptitlerinin Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.4.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Mikrodilüsyon Testi ile Belirlenmesi

MIC değeri mikroorganizmaların üremelerinin inhibe edildiği en düşük etken madde konsantrasyon miktarıdır (Lambert and Pearson 2000). GK-11 ve LF-12

peptitlerinin antimikrobiyal aktivite tespiti, mikrodilüsyon testi EUCAST (Eucast Discussion Document E. Dis 5.1) kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir.

Peptitlerin antimikrobiyal etkisinin taranması amacıyla çeşitli Gram (-) ve Gram (+) patojen bakteriler ile *Candida* suşlarına karşı MIC değerleri belirlenmiştir. Peptitlerin Patojen bakterilere karşı MIC değerleri Çizelge 4.5'te patojen mayalara karşı MIC değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tez çalışmasında ileriki çalışmalarda ise *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) bakterileri kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. GK-11 ve LF-12 peptidinin patojen bakteri suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.

Patojen	GK11	GK-11	LF-12	LF-12
Bakteri Suşları	MIC	MBIC	MIC	MBIC
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128	>256	256	>256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	64	32	256	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	128	>256	128	>256
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>256	>256	256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	256	16	256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	>256	>256	256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256	>256	256	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>256	>256	128	128
<i>Escherichia coli</i> çoklu antibiyotik direncine sahip klinik izolat (EC1)	>256	>256	256	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	64	128	128	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> çoklu antibiyotik direncine sahip klinik izolat (KP1)	128	>256	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> çoklu antibiyotik direncine sahip klinik izolat (KP2)	>256	>256	>256	>256

Çizelge 4.6. GK-11 ve LF-12 peptidinin patojen *Candida* suşlarına karşı MIC ve MBIC değerleri.

PATOJEN <i>Candida</i> Suşları	GK-11	GK-11	LF-12	LF-12
	MIC µg/mL	MBIC µg/mL	MIC µg/mL	MBIC µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	256	>256	128	>256
<i>Candida tropicalis</i> KUEN 1025	128	>256	64	>256
<i>Candida propilosis</i> ATCC 22019	256	>256	>256	>256
<i>Candida dupliniensis</i> CBS 7987	256	>256	>256	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	256	>256	>256	>256

GK-11 peptidinin MIC değerleri PAO1 ve MRSA için sırasıyla 256 µg/mL ve 64 µg/mL olarak belirlenmiştir. LF-12 peptidinde ise iki patojen için de MIC değeri 256 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Pleurocidin temel dizisi ile karşılaştırıldığında GK-11 ve LF-12 peptidlerinde antimikrobiyal aktivitede azalma görülmüştür. Literatüre göre Pleurocidin baz alınarak tasarlanan sentetik peptitlerde çeşitli patojenlere karşı, temel pleurocidine göre, antimikrobiyal aktivitede artışlar (MIC 1 µg/mL) veya azalışlar (MIC >512 µg/mL) tespit edilmiştir (Patrzykat et al. 2003)

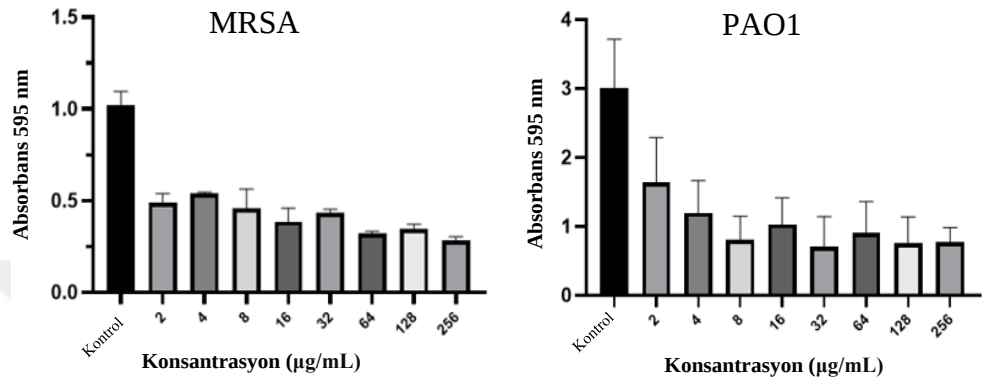
Antimikrobiyal aktivite kaybı peptitlerin α -helix yapısı ve stabilizasyon gücü ile ilişkilidir. Peptitler tasarlanırken yapılan bazı amino asit değişiklikleri peptitlerin α -helix yapısında azalışa, stabilizasyonunun kaybına veya peptit-patojen elektrostatik etkileşiminde zayıflamaya sebep olabilmektedir. Bu durum sonucunda da peptitlerin MIC değerlerinde artış gerçekleşebilmektedir (Tossi, Sandri, and Giangaspero 2000).

4.4.2. Antibiyofilm Aktivitenin Kristal Viyole (KV) ile Belirlenmesi

4.4.2.1. Peptitlerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin (MBIC) Belirlenmesi

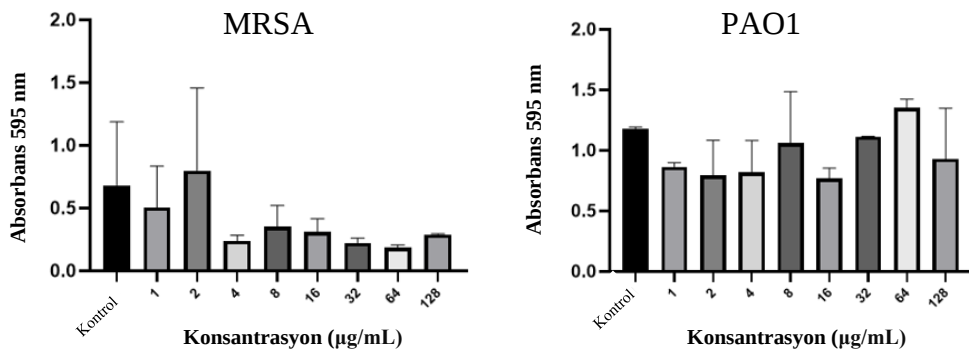
Peptitlerin minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonunu (MBIC) belirlemek için kristal viyole boyaması yöntemi kullanılmıştır. Pozitif kontrol ile kıyaslanan

peptitlerin biyofilm oluşumunu engelleme yeteneği test edilmiştir. GK-11 peptidinin MBIC sonuç grafiği Şekil 4.9’da ve LF-12 peptidinin MBIC sonuç grafiği Şekil 4.10’da verilmiştir. GK-11 peptidi biyofilm oluşumunu PAO1 için, MIC değerinin yaklaşık 16 kat daha düşük değerinde (8-16 µg/mL) engellemektedir; MRSA için ise yaklaşık 2 kat daha düşük değerinde (16-32 µg/mL) etki etmektedir. LF-12 peptidi MRSA için 32 µg/mL konsantrasyonda etki ederken PAO1 için antibiyofilm aktivite göstermemiştir.



Şekil 4.9. GK-11 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı MBIC grafiği.

GK-11 peptidi antibiyofilm peptitlerin özelliği olan, MIC değerinden daha düşük MBIC değerine sahip olma özelliğindedir bu da onun ABP olma özelliğini sağlamaktadır.



Şekil 4.10. LF-12 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı MBIC grafiği.

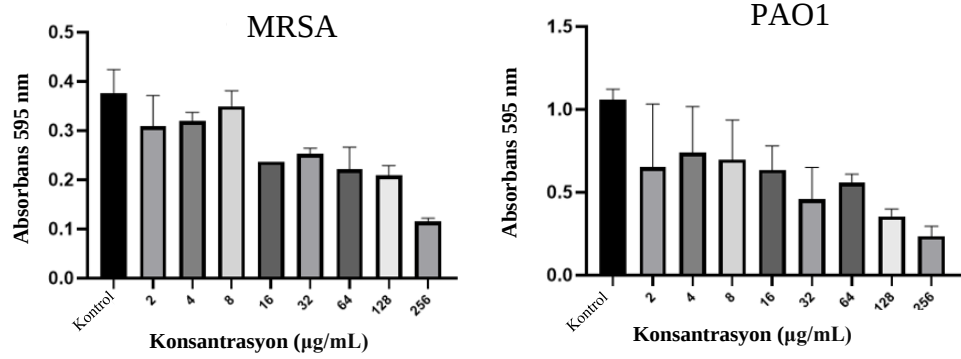
Literatüre göre ve tez çalışmamızın da sonuçlarına göre peptitlerin uygulama konsantrasyonu arttıkça biyofilm oluşumunu engelleme aktivitesi de artmaktadır. İçlerinde pleurocidin türevi peptitlerin de olduğu sentetik antibiyofilm etkili peptitlerin

patojenlere karşı MBIC değerleri; peptit NRC-16 (pleurocidin türevi)'nin *Pseudomonas aeruginosa*' karşı 8–35 µg/mL, BMAP27-Melittin ise *S. aureus* ve *P. aeruginosa* karşı 23,56 µg/mL MBIC değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sentetik peptit 1037'nin 304 µg/mL konsantrasyonda MIC değerine sahipken, PAO1 ve PA14 biyofilm oluşumunun %50'sini 10 µg/mL konsantrasyonda engellediğini tespit etmişlerdir. Tasarladığımız GK-11 peptidi ise hem PAO1 hem de MRSA'da biyofilm oluşumunun %50'sini 2-4 µg/mL konsantrasyonlarında engelleyerek düşük konsantrasyonlarda biyofilm üzerinde etkili olan bir ABP molekülü olduğu belirlenmiştir. Temel pleurocidin peptidinin genel olarak patojenlere etki ettiği MBIC değerinin 8 µg/mL ile 256 µg/mL gibi geniş bir aralıkta olduğu görülmüştür (Li et al. 2021a; Tao et al. 2011).

Pleurocidin ve pleurocidin türevi peptitlerin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı farklı konsantrasyonlarda MBIC değeri olduğu tespit edilmiştir bu da peptitlerin farklı patojen ve biyofilm yapılarını farklı özellikleri ile inhibe ettiğini işaret etmektedir. Bu durum aynı zamanda patojenlerin de biyofilmler ile bu peptidlere karşı geniş ve etkili bir savunma mekanizması olduğunu göstermektedir. Peptidlerin biyofilm oluşma ve temizleme mekanizması ile bakterilerin ve biyofilm yapılarının peptidlere karşı direncinin daha ayrıntılı çalışılması ve bu durumlara uygun ABP tasarımlarının yapılması, antimikrobiyal direnç gibi küresel halk sağlığı sorunlara karşı spesifik-etkin antibiyofilm maddeler elde edilmesini sağlayabilecektir.

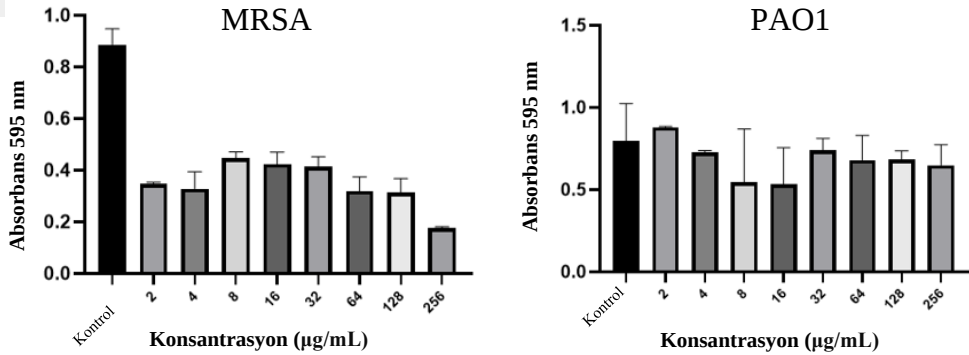
4.4.2.2. Biyofilm Eradikasyon Testi

GK-11 ve LF-12 peptitlerinin oluşmuş biyofilmi temizleme etkinliği eradikasyon testi ile belirlenmiştir. GK-11 peptidinin PAO1 ve MRSA kaynaklı oluşmuş biyofilme 16-32 µg/ml konsantrasyonlarında etki ettiği belirlenmiştir, Şekil 4.11'de GK-11 peptidine ait biyofilm eradikasyon testi grafiği verilmiştir.



Şekil 4.11. GK-11 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı biyofilm eradikasyon grafiği.

LF-12 peptidi ise MRSA kaynaklı oluşmuş biyofilme tüm uygulama konsantrasyonunda (2 ila 256 µg/mL) etki etmiştir. PAO1’de ise eradikasyon aktivitesinin bulunmadığı tespit edilmiştir. LF-12 peptidinin biyofilm eradikasyon testi grafiği Şekil 4.12.’de verilmiştir.



Şekil 4.12. LF-12 peptidinin MRSA ve PAO1 patojen bakterilerine karşı biyofilm eradikasyon grafiği.

Eradikasyon testinde de MBIC testinde olduğu gibi artan peptit konsantrasyonu ile birlikte biyofilm temizleme etkinliğinin arttığı görülmüştür.

Oluşmuş biyofilmin temizlenme etkinliği peptitlerin enfeksiyon tedavisinde, enfeksiyon vücutta yer edindikten sonra tedavinin hızlanması açısından önemli bir etkidir (Srivastava et al. 2024). Enfeksiyon hastalıklarının zor tedavi edilme nedeninin

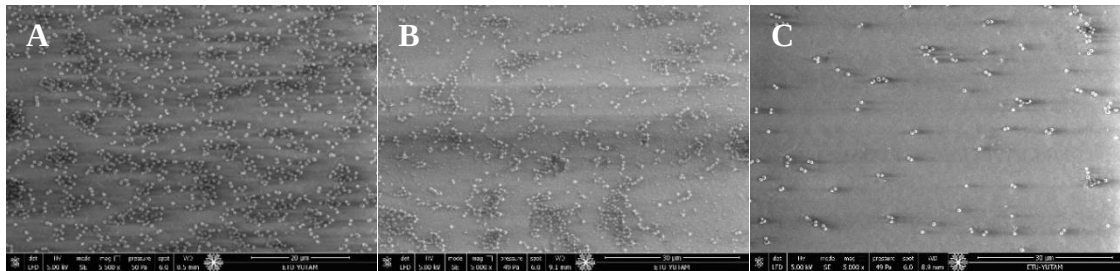
altına patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları ve antimikrobiyal etkili maddelerin genellikle bu biyofilm yapılarının içine giremeyip etki edememesinden kaynaklanmaktadır (Liu, Prentice, and Webber 2024b). Biyofilm engelleme ve biyofilm eradikasyon etkinliğini düşük konsantrasyonlarda sağlayabilen peptitler, enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde günümüz antibiyotiklerinin yerini alma potansiyeline sahip olabilmektedir (Mishra et al. 2025).

LF-12 peptidi MRSA için olumlu sonuç vermesine rağmen, tez çalışmasında diğer deneylere her iki bakteriye de sonuç aldığımız GK-11 peptidinden devam edilmiştir.

4.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

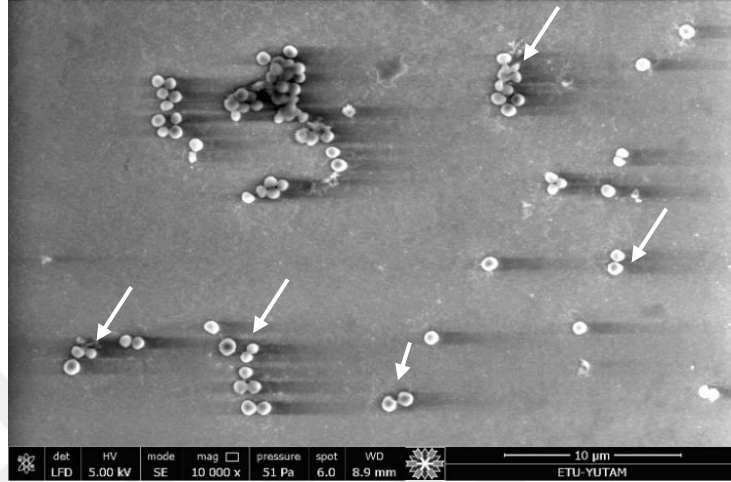
SEM analizi, GK-11 peptidinin PAO1 ve MRSA bakteri hücreleri üzerindeki morfolojik değişim, hücre tutunması ve biyofilm oluşumu-yapısı üzerine olan etkilerinin tespit edilmesi için gerçekleştirilmiştir (Vice et al. 2025). Peptit, 1/2 MIC ve MIC konsantrasyonlarında patojenlere uygulanmıştır.

MRSA’da kontrol grubunda hücrelerin birbirlerine ve lamele tutunma eğiliminde olduğu görülmüştür. GK-11 uygulaması yapıldığında MRSA hücrelerinin birbirlerine ve lamele tutunmalarının engellediği görülmüştür. Şekil 4.13’de MRSA’ya ait SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler 5,000- 5,500 kat büyütme ile alınmıştır.



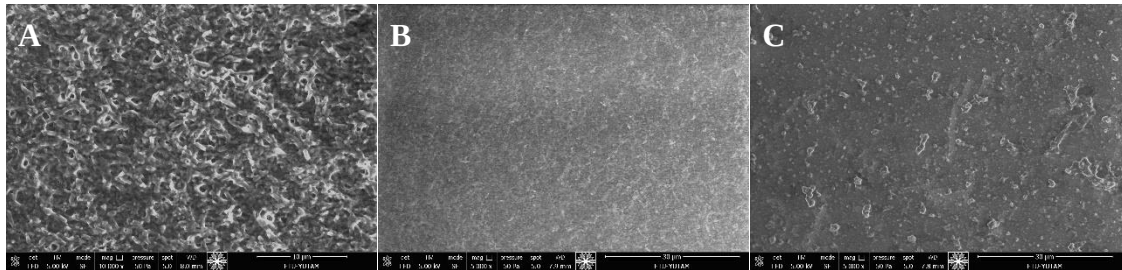
Şekil 4.13. MRSA SEM görüntüleri. A. MRSA kontrol hücreleri. B. 1/2 MIC değerinde GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri. C. MIC değerinde GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri.

MRSA hücrelerinde, 1 MIC değerinde GK-11 peptidi uygulaması sonucunda morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir. Peptit uygulaması ile kontrol hücrelerine kıyasla hücrelerde içe doğru çökmeler ve biçim bozuklukları görülmüştür. Şekil 4.14’de MRSA hücrelerinin SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.14. GK-11 uygulanmış MRSA hücreleri.

PAO1’de kontrol grubunda bakteri hücrelerinin yoğun bir şekilde lamelle tutunduğu görülmüştür. GK-11 uygulaması yapıldığında PAO1 bakteri hücre yoğunluğu uygulama gruplarında azalmıştır ancak peptidin bakteri hücrelerinin lamel üzerine tutunmasını engelleme yeteneğinin MRSA’da daha etkili olduğu görülmüştür. Şekil 4.15’de PAO1’e ait SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler 5,000- 10,000 kat büyütme ile alınmıştır.



Şekil 4.15. PAO1 SEM görüntüleri. A. PAO1 kontrol hücreleri. B. ½ MIC değerinde GK-11 uygulanmış PAO1 hücreleri. C. MIC değerinde GK-11 uygulanmış PAO1 hücreleri.

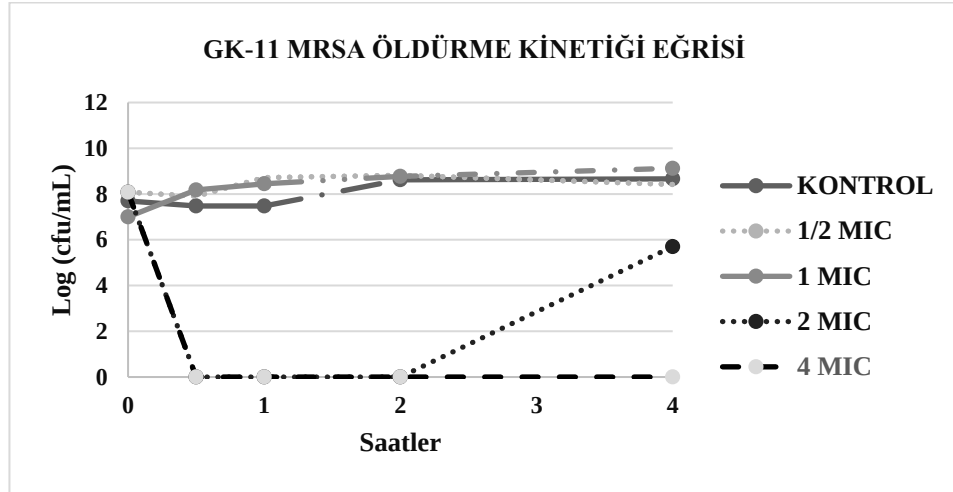
4.4.5. Öldürme Kinetiği Eğrisi (Time Kill Curve)

PAO1 ve MRSA bakteri suşlarına karşı artan konsantrasyonlarında GK-11 peptidi uygulaması yapılmıştır. GK-11'in 30 dakika içinde 2 MIC ve 4 MIC konsantrasyonlarında tüm PAO1 bakterilerini öldürmüş ve bunu 2 saat boyunca koruduğu tespit edilmiştir. Bu süre zarfında Peptidin daha düşük konsantrasyonlarda uygulandığı gruplar ile kontrol grupları yaklaşık aynı değerleri vermiştir. GK-11'in PAO1'e karşı etkinliğine ait grafik Şekil 4.16'da verilmiştir. Grafikte, Log (cfu/ mL) değerinin azalması peptit uygulaması ile birlikte patojen bakterilerinin canlılığının baskılandığı anlamına gelmektedir.



Şekil 4.16. GK-11 uygulaması yapılmış PAO1 öldürme kinetiği eğrisi.

MRSA bakterisine karşı ise GK-11, 30 dakika içerisinde 2 MIC ve 4 MIC konsantrasyonlarında tüm bakteri hücrelerini ölmüştür. 4 MIC peptit konsantrasyonunda bu durumu 4 saat koruyabilirken 2 MIC konsantrasyonunda 2 saat korumuştur. GK-11'in MRSA'ya karşı etkinliğine ait grafik Şekil 4.17'da verilmiştir.



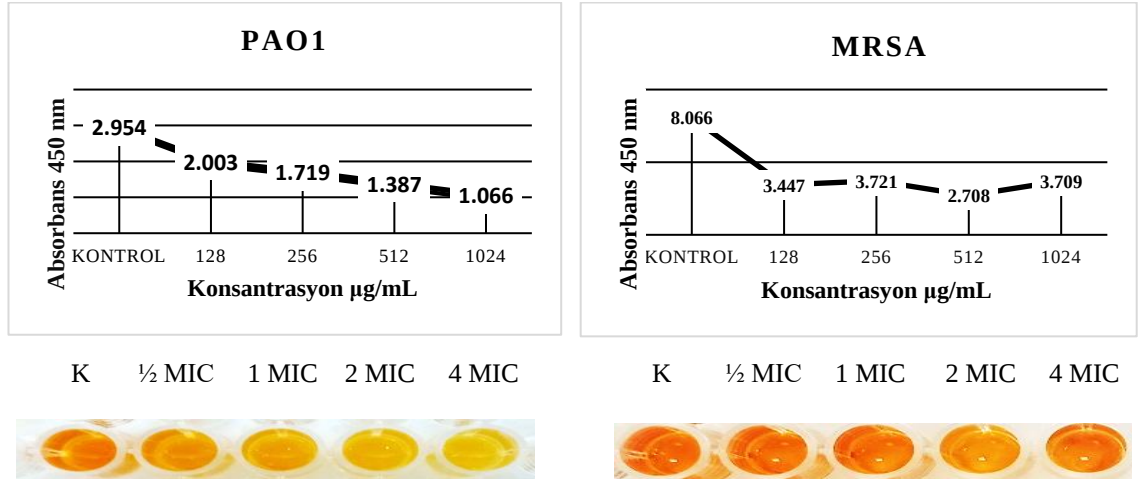
Şekil 4.17. GK-11 uygulaması yapılmış MRSA öldürme kinetiği eğrisi.

GK-11 gibi kısa süre içerisinde patojenleri öldürücü etkisi bulunan peptitlerin bu özelliği ile gargara veya cilt kremleri gibi ürünlerin içerisinde antibakteriyel madde olarak kullanılma potansiyelleri olabilmektedir. Hızlı etkisi ile enfeksiyon tedavilerinin iyileştirilmesini kolaylaştırabileceklerdir.

4.4.6. CVDK- 8 testi

Patojen bakterilere karşı 1/2- 1- 2- 4 MIC konsantrasyonlarında GK-11 uygulama yapılmıştır ve kontrole kıyasla uygulama gruplarında kontrole kıyasla renk açıklığı görülmüştür bu da tüm GK-11 konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.

Planktonik PAO1 ve MRSA hücrelerine karşı GK-11 peptidin uygulanması sonucunda planktonik hücre canlılığı CVDK-8 testi ile tespit edilmiştir. Bakteri suşları 2 saat boyunca GK-11'e (4xMIC) maruz bırakıldığında PAO1'de hücre canlılığının %35,85'e düştüğü, MRSA'da ise %45,98'e düştüğü belirlenmiştir. Şekil 4.18'de CVDK-8 testinin plaka görüntüsü ve OD₄₅₀ ölçümleri, şekil 4.19'da CVDK-8 testi sonuç grafiği verilmiştir.



Şekil 4.18. PAO1 ve MRSA bakteri hücrelerine CVDK-8 testi uygulaması sonucu plaka görüntüsü ve absorbans₄₅₀ grafiği.

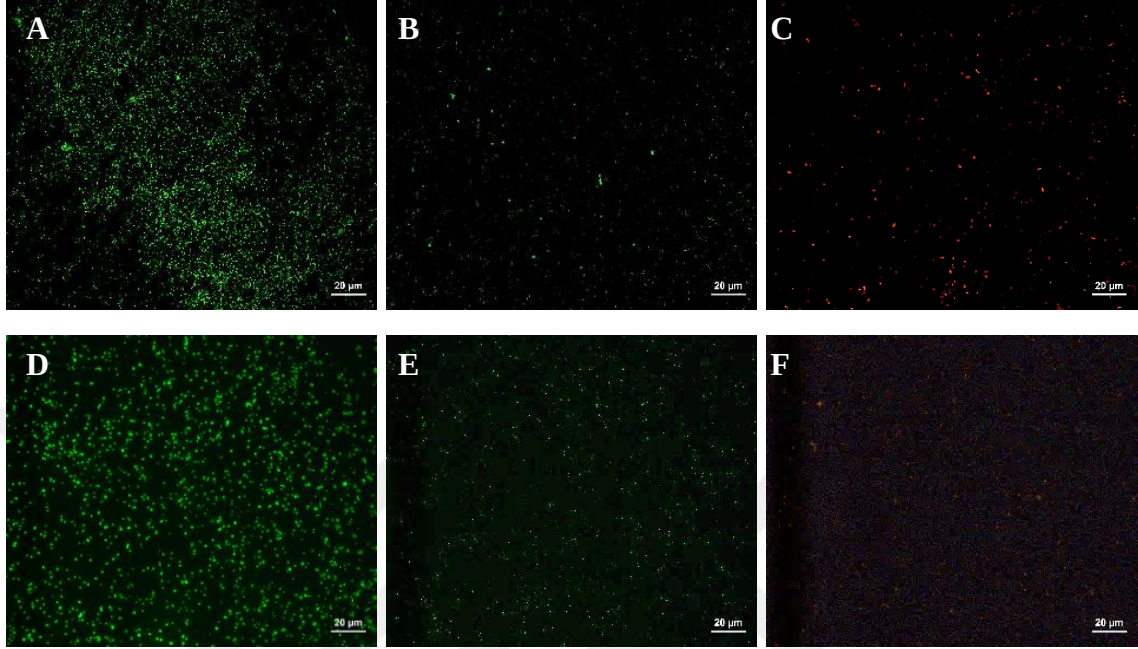
İnsanlarda enfeksiyon tedavisi yapıldığında GK-11 peptidi gibi biyofilm oluşumunu engelleme ve oluşmuş biyofilm yapısını temizleme özelliği olan peptitler ile vücutta patojenler tarafından oluşturulmuş biyofilm yapısını dağıtılabilecek ardından planktonik halde bulunan ve açığa çıkacak olan bakteriyel hücreleri de ortadan kaldıracak peptitlerin tasarlanması ve geliştirilmesi, biyofilm oluşturan ve zor tedavi edilen enfeksiyon hastalıklarının daha etkili bir şekilde tedavi edilmesini sağlayabilecektir.

4.4.7. Bakteri Canlılık testi- SYTO 9 ve Propidyum İyodür Boyaması

Bakteri canlılığı ilk olarak CVDK8 testi ile belirlenmiştir ve peptidin 4xMIC ile uygulanması sonucunda hem MRSA hem de PAO1'de hücrelerin yarısından daha azının canlı kaldığı görülmüştür. Bu sonucu doğrulamak için SYTO 9 ve propidyum iyodür boyaması ile floresan mikroskopunda GK-11 uygulanmış planktonik patojen hücrelerinin canlılığı 4xMIC değerinde incelenmiştir

Patojen bakteri hücrelerinin kontrol grubu incelendiğinde önemli miktarda yeşil floresan sinyal vermiştir bu da orada yüksek oranda bakteri canlılığı olduğunu işaret etmektedir. 2 saat boyunca GK-11'e maruz kalan PAO1 ve MRSA hücreleri incelendiğinde ise kırmızı floresan sinyalinin arttığını bu da GK-11 peptidinin hücreleri öldürdüğünü işaret etmektedir. Floresan mikroskopunda inceleme sonucunda da CVDK-

8 testini doğrulayacak şekilde GK-11 uygulaması ile patojen hücrelerinin kontrole kıyasla yarısından daha azının canlı kaldığı görülmüştür. Floresan mikroskopisi görüntüleri Şekil 4.19’de ve grafik sonuçları Şekil 4.20’de verilmiştir.

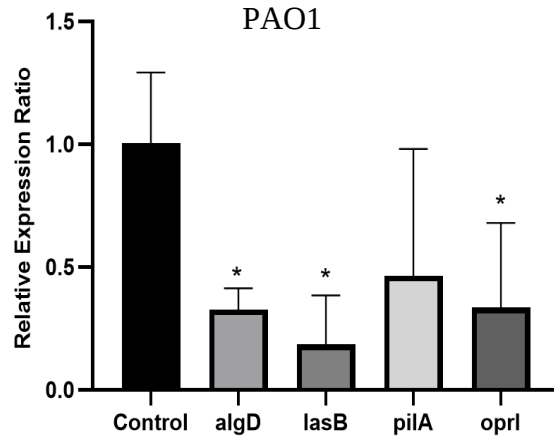


Şekil 4.19. GK-11 uygulanmış PAO1 ve MRSA floresan mikroskopu görüntüleri. A: PAO1 KONTROL, B: GK-11 uygulanmış PAO1 kültürü canlı hücreler, C: GK-11 uygulanmış ölü hücreler. D: MRSA kontrol, E: GK-11 uygulanmış MRSA kültürü canlı hücreler, F: GK-11 uygulanmış MRSA kültürü ölü hücreler.

4.5. GK-11 Peptidinin PAO1 ve MRSA Virülans Genleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bir patojen mikroorganizmanın konakçıyı hasta etme veya sağlığı üzerinde olumsuz etki yaratma yeteneği virülans olarak adlandırılır(Alsuwat et al. 2025). PAO1 ve MRSA bakteri kültürlerine $\frac{1}{2}$ MIC değerinde GK-11 peptidi uygulanmış ardından RNA izolasyonu ve qRT-PCR ile GK-11’in bu patojen bakterilerin virülans genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Planktonik evredeki bakterilere uygulama yapılmıştır. Sonuçlar PAO1 için şekil 4.21’de ve MRSA için şekil 4.22’de verilmiştir.

qRT-PCR’da housekeeping gen olarak PAO1’de *rpoD* MRSA’da ise *gyrB* genleri kullanılmıştır.



Şekil 4.20. GK-11’in PAO1 virülans genlerinin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi.

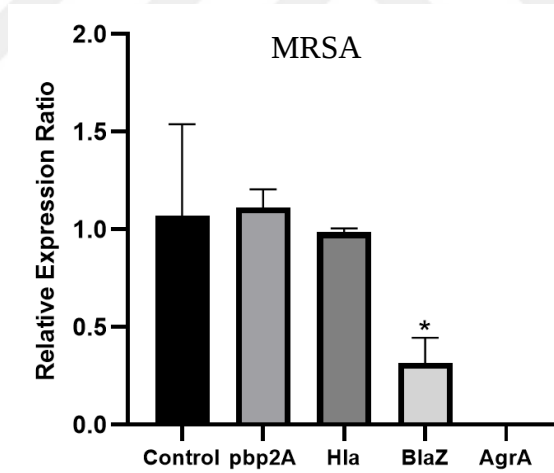
Virülans genlerin mRNA seviyeleri GK-11 uygulanmamış bakteri grubu (kontrol) ile karşılaştırılmıştır. *P. aeruginosa*’nın *algD*, *lasB* ve *oprL* genlerinin ifadesi GK-11 uygulaması ile kontrole kıyasla aşağı düzenlenmiştir. *pilA* geninde kontrole kıyasla bir azalma gerçekleşmiştir ancak diğerleri kadar önemli bir azalış olmamıştır.

AlgD geni *Pseudomonas aeruginosa*’da bakterinin mukoid fenotipini ve biyofilm oluşumunu sağlayan alginat ekzopolisakkaritin biyosentezinde görevlidir. Mukoid fenotip özellikle kistik fibroz hastalarından izole edilen suşlarda görülen fenotiptir (Boyd and Chakrabarty 1995; Mohr, Sonstebly, and Deretic 1994). GK-11 uygulaması ile bu genin ekspresyon seviyesi qRT-PCR sonuçlarına göre azalmıştır. Böylece *P. aeruginosa*’nın virülansında ve kronik enfeksiyon durumunda *algD* ve alginat biyosentez yolunun hedeflenmesi ile özellikle kistik fibrozis gibi durumlarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde potansiyel olarak kullanılabilir bir peptit olabileceğini göstermektedir. Tez çalışmasında yapılan MBIC, eradikasyon ve SEM testleri de bu sonucu destekleyecek şekilde, GK-11 uygulaması yapılmasıyla biyofilm oluşumunun engellendiği ve oluşmuş biyofilmin dağılmasının sağlandığı görülmüştür.

LasB geni bakterinin virülansında ve biyofilm oluşumunda rol alan proteolitik enzim olan LasB elastaz enzimini kodlar ve bu hücre dışı proteazdır. Elastaz ökaryotik hücre yapısal proteinlerini parçalamaktadır. Biyofilm oluşumunda ise bakteri hücrelerinin

kolonizasyonu aşamasında rol oynar(Sarkheili et al. 2025). *PilA* geni, bakterinin konakçıya veya yüzeye tutunmasında, biyofilm yapısının olgunlaşmasında rol oynayan tipIV pilusun ana bileşenidir (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, and McClean 2021). GK-11 uygulaması ile bu genlerin ekspresyon seviyelerinin azaldığı dolayısıyla bakterilerin virülans özelliğinin azalacağı ve hasta edici özelliklerinin de baskılanabileceği öngörülmektedir.

OprL geni bakterinin dış zarında bulunan ve membran bütünlüğünün korunmasını sağlayan proteinlerini kodlamaktadır. Bu proteinler antibiyotik direnci ve virülanslıkla ilişkilidir (Algammal et al. 2023)(Jassim, Mahdi, and Al-Obaidi 2025). Peptid uygulaması ile bu genin ekspresyon seviyesi azalmıştır. GK-11'in bu geni baskılaması bakteriyi antibakteriyel maddelere karşı açık hale getirmektedir. Peptidin bu özelliği ile antibakteriyel etkisi olan başka bir molekülle birleştirilip sinerjistik etki oluşturarak daha etkin bir antimikrobiyal ve antibiyofilm etkili maddeler elde edilebilecektir.



Şekil 4.21. GK-11'in MRSA virülans genlerinin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi.

MRSA'da *blaZ* ve *agrA* genlerinin ifadesi GK-11'in uygulaması ile kontrol kültürüne kıyasla aşağı düzenlenmiştir. Ancak *pbp2A* ve *hla* genlerinde kontrole kıyasla önemli bir değişiklik olmamıştır.

AgrA geni bakterinin virülansını ve enfeksiyon etkisini kontrol etmektedir. virülans faktörlerini düzenlemesi de Qs mekanizmasının düzenlenmesi ile ilgilidir (Tan

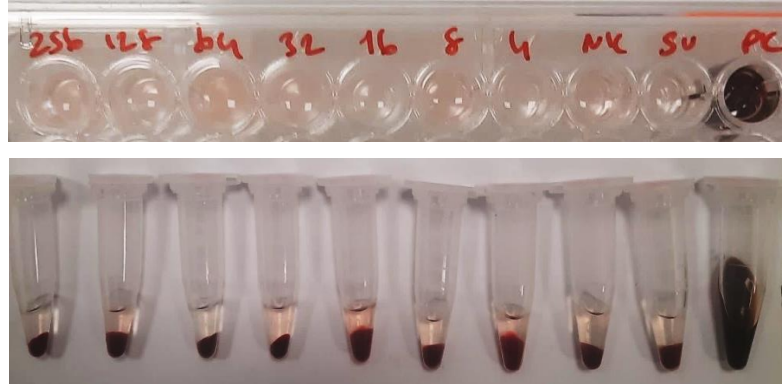
et al. 2022). GK-11 uygulaması ile bu genin aşağı düzenlenmesi bu bakterinin virülanlığını baskılayacağı için antibiyotiğe karşı dirençli olan suşların antibiyotiğe karşı duyarlı olmasını sağlayacaktır ve oluşan enfeksiyon hastalıklarının daha kolay bir şekilde tedavi edilmesini sağlayacaktır (Singh and Ray 2014). *BlaZ*, β -laktamaz (beta-laktamase) enzimini kodlayan gendir. Bu gen bakterinin β -laktam antibiyotiklere (penisilin, ampisilin, vb.) karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır (Clarke and Dyke 2001). GK-11 uygulaması ile bu genin ifadesi kontrole göre azalmıştır. Böylece bu peptit ile bir antibiyotik kullanılarak hibrit bir molekül elde edilip daha etkin bir antimikrobiyal ve antibiyofilm madde elde edilebilecektir. Ayrıca peptidin bu geni baskılaması ile antibiyotik tedavisi yapılacağı zaman verilecek antibiyotiğin dozu azaltılabilecektir ve antibiyotik kullanımına bağlı vücutta oluşan hasarlar, örneğin bağırsak mikrobiyotasının zayıflaması, azaltılabilecektir. (Pimenta et al. 2023).

Pbp2a geni antibiyotik dirençliliği ilgilidir (Łeski and Tomasz 2005). *hla*, alfa-hemolizin (*hla*) toksini ise eritrositler epitel hücreler, T-hücreleri gibi konakçı hücrelere etki eden bir sitotoksindir (Zhu et al. 2023). GK-11 peptidinin MRSA bakterilerine uygulanması bu virülans genler üzerinde önemli bir etkide bulunmamıştır

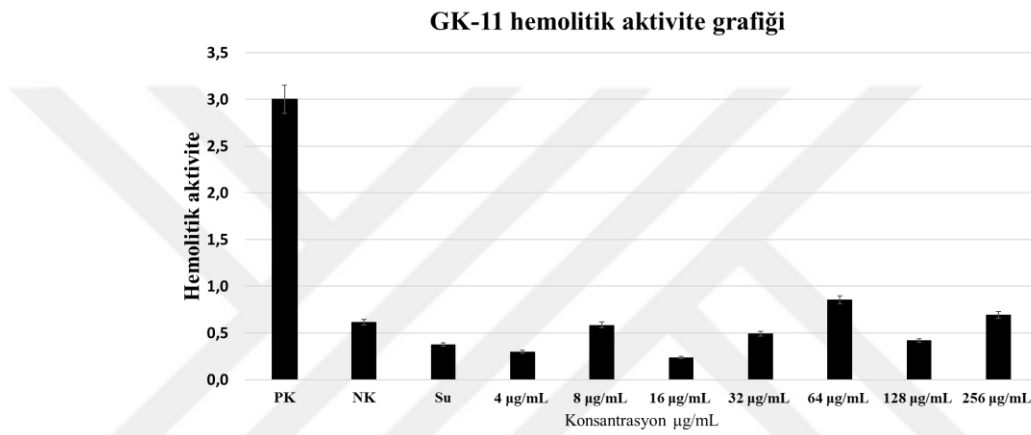
4.6. GK-11 Peptidinin Hemolitik ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.6.1. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal peptitlerden hemolitik aktivitesinin düşük olması istenmektedir, aynı şekilde antibiyofilm peptitlerde de düşük hemolitik aktivite beklenmektedir. GK-11 peptidinin hemolitik aktivitesinin belirlenmesi için artan konsantrasyonlarda GK-11, eritrosit hücrelerine uygulanmıştır. Pozitif kontrole kıyasla en yüksek konsantrasyon olan 256 $\mu\text{g/mL}$ (188 μM)’de %5 hemolitik aktivite sınırı aşılarak hemolitik aktivite görülmüştür. Hemoliz testinin plaka görüntüleri ve ependorf tüplerindeki sonuçları Şekil 4.23’de ve grafik sonuçları Şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.22. GK-11 peptidinin hemolitik aktivite testi plaka ve ependorf tüpü görüntüleri.



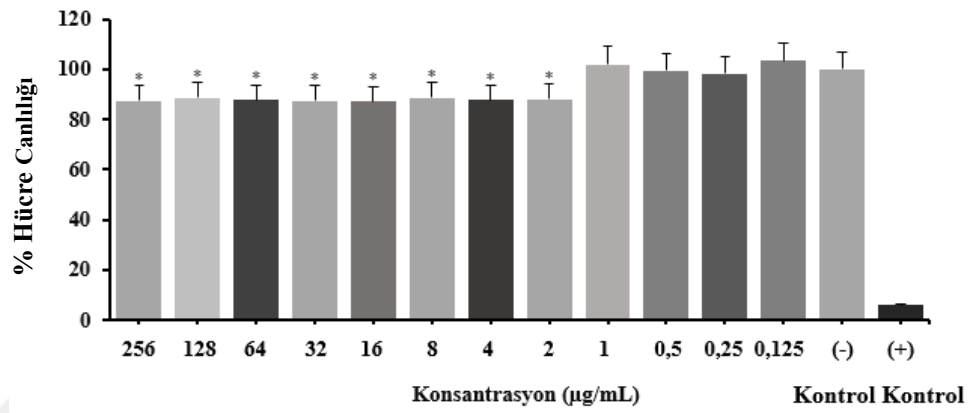
Şekil 4.23. GK-11 peptidine ait hemolitik aktivite testi absorbans₄₅₀ ölçüm grafiği.

Pleurocidin peptidinin 100 μM olacak şekilde tavşan ve insan eritrositlerine uygulanması sonucunda ise sırasıyla %6 ve %15 oranlarında hemolitik aktivite göstermiştir. Yapılan bir çalışmada pleurocidin türevi tasarladıkları ve α -heliks yapısı artmış olan bir peptidin hemolitik aktivitesinin 100 μM konsantrasyonda %90 hemolitik aktivite tespit etmişlerdir, ancak bu peptidin antimikrobiyal aktivitesinde de pleurocidine göre daha iyi bir değer elde edilmiştir. (Yoshida et al. 2001b). GK-11 peptidinin artan konsantrasyonlarda pleurocidin peptidine göre düşük hemolitik aktiviteye sahip olması bu peptidin klinik uygulamalarda potansiyel olarak kullanılabilir bir peptit olma potansiyelini göstermiştir.

4.6.2. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

4.6.2.1 MTT Testi

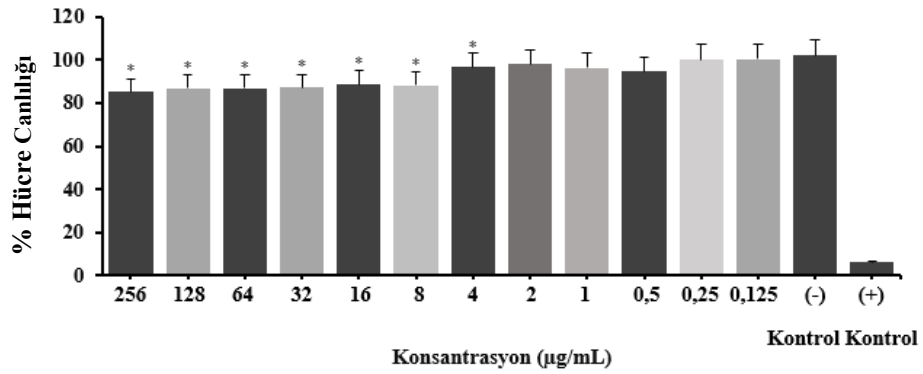
GK-11'in insan dermal fibroblast yetiştin (HDFa) hücre kültürleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için MTT hücre canlılığı analizi yapılmıştır. 2 µg/mL'den yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının yaklaşık %88 olduğu tespit edilmiştir. MTT analizinin grafiği Şekil 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.24. GK-11 peptidi MTT testi sonuç grafiği.

4.6.2.2. LDH Testi

GK-11'in dermal fibroblast yetiştin (HDFa) hücre kültürleri üzerine sitotoksik etkilerin belirlenmesi için LDH analizi yapılmıştır. 4 µg/mL'den itibaren artan konsantrasyonlarda hücre canlılığının yaklaşık %87 olduğu görülmüştür. LDH analiz grafiği Şekil 4.26'de verilmiştir.



Şekil 4.25 GK-11 peptidi LDH testi sonuç grafiği.

4.7. *In Vivo* Model Olan *C. elegans*'ta GK-11 Peptidinin Toksik ve İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi

4.7.1. Toksisite Belirlenmesi

Gk-11 peptidinin, model organizma olarak kullanılan *C. elegans*'a karşı toksik etkisinin belirlenmesi için *E.coli* OP50 bulunan NGM plaklarına yaş senkronizasyonu yapılmış L4 evresindeki *C. elegans*'lar konulmuştur. Hazırlanan plaklara 32 µg/mL ila 512 µg/mL konsantrasyonları arasında GK-11 peptidi uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak peptit uygulaması olmayan *C. elegans* plakaları kullanılmıştır. Uygulamalar yapıldıktan sonra 24 saatte bir 7 gün boyunca plaklarda ölü-canlı sayımı için kontrol yapılmıştır. 7 günün sonunda peptidin toksik etkide bulunmadığını ve *C. elegans* plaklarında ölüm olmadığı görülmüştür.

Toksisite testi yapılırken hazırlanan *C. elegans* plakları deney boyunca 25 °C'de inkübatörde tutulmuştur. Burada 25°C'nin kullanılmasının iki nedeni bulunmaktadır. İlk olarak *C. elegans* yaşam sıcaklığının en fazla bu sıcaklık derecesi olmasıdır. İkinci neden ise, tez çalışmasında kullanılan patojenlerin optimum yaşam sıcaklığı 37°C'dir ve ilerleyen deneylerde de kullanılan patojenlerin yaşamını ve patojenlik etkinliğini olduğunca devam ettirilebileceği en yüksek sıcaklığın korunması amacıyla en yüksek 25°C'de çalışılmıştır.

4.7.2. Yavaş Öldürme (Slow Killing) Testi

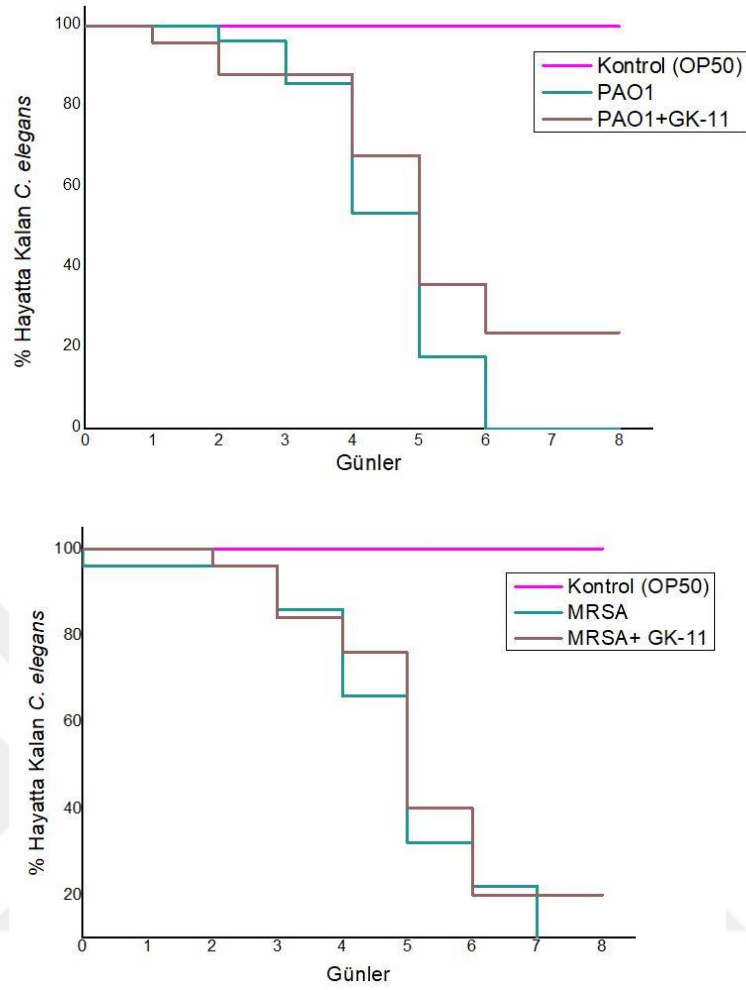
C. elegans'lar üzerinde enfeksiyon modelinin çalışılması için yavaş öldürme testi gerçekleştirilmiştir. Patojenlerin olduğu kontrol gruplarındaki ve uygulama gruplarındaki *C. elegans*'lar patojenle enfeksiyon sonucunda farklı zamanlarda felç geçirip ölmüşlerdir. Yaşayan ve sağlıklı *C. elegans* görüntüsü Şekil 4.28'de, felç geçirmiş *C. elegans* görüntüleri Şekil 4.29'da verilmiştir. Görüntüler ışık mikroskobunda 4X ve 10X büyütme ile alınmıştır. Yavaş öldürme testi sonuç grafiği Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Yaşayan ve sağlıklı *C. elegans* (yazar tarafından görüntülenmiştir).



Şekil 4.27. Felç geçirmiş *C. elegans*'lar (yazar tarafından görüntülenmiştir).



Şekil 4.28. PAO1 ve MRSA patojenlerine karşı yavaş öldürme testi grafiği .

Yavaş öldürme testi sonuçlarında hem PAO1 hem de MRSA gruplarında GK-11 peptidi uygulanan *C. elegans* petrilerinde yaklaşık %20 sağkalım sağlanmıştır. PAO1 bulunan petrideki *C. elegans*'ların hepsi 6. günde, MRSA petrisinde bulunanların ise 7. günde tamamı ölmüştür.

Ölmeden önce ise yaklaşık enfeksiyonun 2. günü *C. elegans*'ların hareketlerinin oldukça yavaşladığı görülmüştür ve sinuzodial hareketlerinde de bozulmalar meydana gelmiştir. Enfeksiyonun 4. gününde yaşamaya devam eden *C. elegans*'larda artık vücutsal hareket görülmemeye başlanmıştır ve sadece ağız kısmında ya da yutak kısmında çok az hareketlenmeler kalmıştır. Ölü *C. elegans*'lara ait görüntüler Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.29. Ölü *C. elegans*'lar (yazar tarafından görüntülenmiştir).

Yavaş öldürme testinde sağkalım sağlanması iki şekilde gerçekleşebilmektedir. İlki her gün petriye peptit uygulaması ile patojenin virülans etkinliğinin azaltılmasıyla gerçekleşir. Azalan virülans aktivitesi *C. elegans*'lar üzerindeki enfeksiyon yükünü azaltacağı için uygulama gruplarındaki *C. elegans*'ların yaşam süreleri kontrol gruplarına göre daha fazla olabilmektedir.

Tez çalışmasında GK-11 peptidinin PAO1 ve MRSA belirlenen virülans genleri üzerine olan etkileri tespit edilmiştir. GK-11, PAO1 virülans geni *lasB*'yi aşağı regüle etmiştir. Bu gen, ökaryot hücrelerin yapısal proteinlerini parçalayarak hücrelere zarar vermektedir. Yavaş öldürme testinde de PAO1 grubuna peptit uygulanmasıyla bu genin baskılanması sonucu *C. elegans*'lara PAO1 kaynaklı oluşturulan hasarlardan biri azaltılmış olmaktadır. Ayrıca PAO1'de ve MRSA'da çalışan totalde 8 virülans genin 5'i, üzerinde GK-11'in aşağı regüle etkisinde olması, bu peptidin patojenlerde başka virülanslık sağlayan genleri üzerinde de baskılayıcı bir etkide olabileceğini ve böylelikle peptit uygulama gruplarında *C. elegans*'larda sağkalımı oranı artmış olabilmektedir.

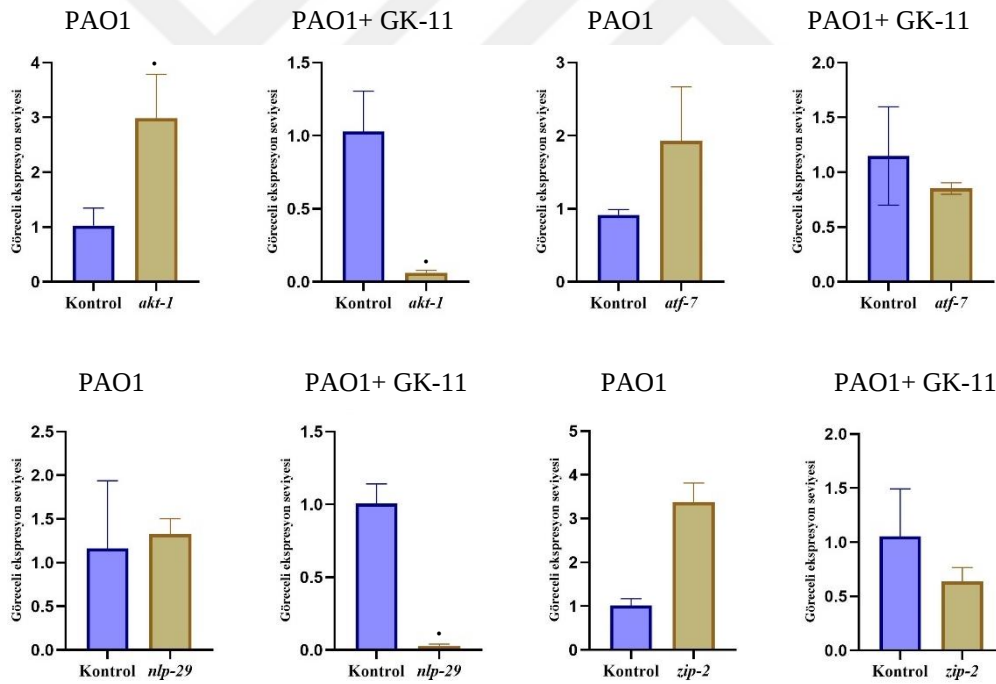
İkinci neden ise petrilere peptit uygulaması yapıldığında *C. elegans*'ların bu peptitleri yutmaları ve peptitlerin *C. elegans*'lar üzerinde immünomodulator etkisinin olmasıdır. GK-11 peptidi ile *C. elegans*'ların patojenlere karşı verdiği yanıtın arttırılması, yolakların veya genlerin modüle edilmesi sonucunda peptit uygulaması yapılan gruplarda sağkalım artmış olabilmektedir.

Bu iki durum farklı yolakların düzenlenmesi ile gerçekleştiği için aynı anda gerçekleşip sağkalım oranını arttırmaktadır.

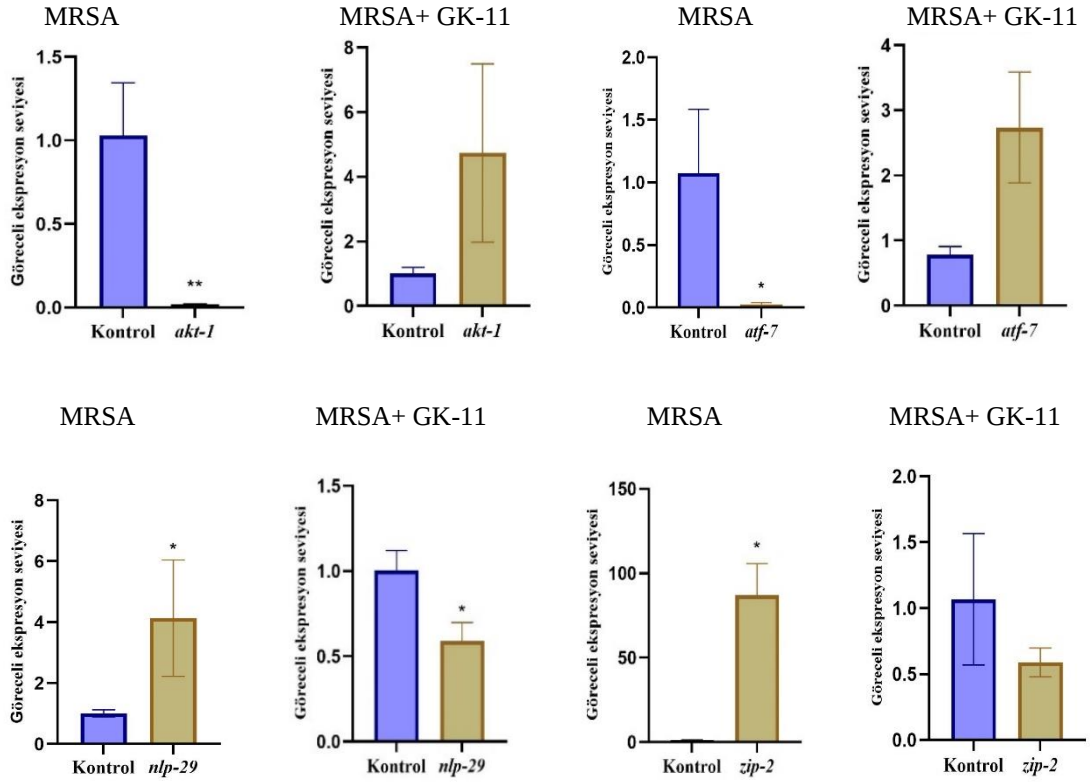
Yapılan yavaş öldürme testinde enfekte olmuş *C. elegans*'ın enfeksiyona neden olan patojeni ortamda varlığına devam ederken, peptit uygulamasının her gün yapılmasıyla *C. elegans*'ta enfeksiyonu tedavi etme modeli gerçekleştirilmiştir. Peptit uygulaması *C. elegans* sağkalımı oranında kontrole göre olumlu sonuç vermiştir.

4.7.3. İmmünomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi

GK-11 peptidinin enfeksiyona neden olan patojen *C. elegans* ortamında varlığına devam ederken *C. elegans*'lar üzerindeki immünomodülatör etkisi çalışılmıştır. qRT-PCR sonuçları şekil 4.32 ve şekilde 4.32'de verilmiştir. PAO1 veya MRSA yazan başlıklı grafikler sadece patojen ortamında bulunan *C. elegans*'ların gen ekspresyon seviyelerinin ifade etmektedir. PAO1+GK-11 veya MRSA+GK-11 yazan grafikler ise patojen ve GK-11 ortamında bulunan *C. elegans*'ların genlerinin ekspresyon seviyelerini vermektedir.



Şekil 4.30. GK-11'in PAO1 patojenine karşı *C. elegans* immünomodülatör genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri.



Şekil 4.31. GK-11'in MRSA patojenine karşı *C. elegans* immünomodülatör genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri.

qRT-PCR'da housekeeping gen olarak PMP-3 kullanılmıştır.

akt-1, *atf-7*, *nlp-29* ve *zip-2* genlerinin ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır. Literatüre göre enfeksiyon durumunda *akt-1* geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı, *atf-7*, *nlp-29* ve *zip-2* genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Engelmann and Pujol 2010).

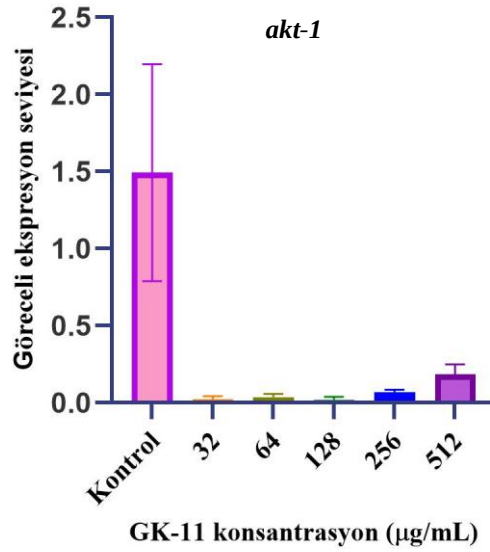
GK-11 uygulanan patojen ve *C. elegans* bulunan gruplardan yapılan qRT-PCR sonuçlarına göre. PAO1– GK-11 grubundaki *C. elegans*'larda *akt-1* geninde anlamlı bir azalış görülmüştür. *akt-1* geninin ifadesinin azalması durumunda DAF-16 transkripsiyon faktörü sitoplazmada tutulmaz ve çekirdekte *lys-7* gibi antimikrobiyal etkili genlerin ifadesinin artmasını sağlar. Literatüre göre *P. aeruginosa* enfeksiyonu durumunda *C. elegans*'ta DAF-16'nın inhibe olduğu görülmektedir ancak bu durum patojenlere göre farklılık göstermektedir. *E. faecalis* ve *S. Typhimurium*'a maruz kalma durumunda ise bu genin ekspresyon seviyesi artmaktadır (Radeke and Herman 2021). *nlp-29* geninde

ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. *atf-7*, *zip-2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu olan PAO1-*C. elegans* grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

MRSA- GK-11 grubundaki *C. elegans*'larda *nlp-29* geninin ekspresyon seviyesinde azalış tespit edilmiştir. *akt-1*, *atf-7* ve *zip-2* genlerinin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir farklılık gerçekleşmemiştir. *nlp-29* geninin ekspresyon seviyesi genel olarak mantar enfeksiyonları durumlarında artmaktadır, bakteri patojenleri ile ilişkisi tam olarak kurulmamıştır ancak bazı çalışmalarda ekspresyon seviyelerinde farklılıklar görülmüştür. Ayrıca *nlp-29*'un ekspresyonunun azalıp artması mantar türleri arasında da değişiklik göstermektedir (Pop et al. 2024). Bir çalışmada *S. aureus*'a ile enfekte olan *C. elegans*'larda *nlp-29*'un ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmiştir (JebaMercy and Balamurugan 2012). *atf-7* geni ise antimikrobiyal etkili genlerin düzenlenmesinde görevlidir ve doğal bağışıklık yolağı olan p38MAPK sinyal yolağı tarafından ifadesi düzenlenir. *atf-7*, Lizozimler, C-tipi lektinler gibi *C. elegans* bağışıklığında önemli olan antimikrobiyal etkili genlerin ekspresyon seviyesinin düzenlenmesinde görev almaktadır (Fletcher et al. 2019). *zip-2* ise transkripsiyon faktörüdür ve doğal bağışıklık yollarından ayrı bir şekilde protein sentezi inhibe edildiğinde strese yanıt olarak *irg-1* ve *irg-2* gibi antimikrobiyal etkili genlerin ifadesinin arttırılmasında görevlidir. Bu gen *P. aeruginosa* enfeksiyonunda önemlidir, *zip-2* mutant *C. elegans*'larda *P. aeruginosa*'ya duyarlılık artarken *S. aureus*'a karşı duyarlılığında bir değişiklik tespit edilmemiştir (Estes et al. 2010).

Ayrıca ortamda patojen yokken, *C. elegans*'ın besini olan *E.coli* OP50 varken GK-11 peptidinin ortama verilmesinin *C.elegans* üzerindeki etkisini tespit etmek için artan konsantrasyonlarda GK-11 peptidi *C. elegans*'lara uygulanmış ardından qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için *C. elegans*'larda immün yanıtta önemli bir yolak olan *daf-2* sinyal yolağında görev alan *akt-1* geni ile çalışılmıştır. *E.coli* ortamında bulunan *C. elegans*'larda bu genin ekspresyonunun yüksek olması beklenmektedir. Ancak antimikrobiyal etkili genlerin ifadesinin artması için *akt-1*'in ekspresyon seviyesinin azalması gerekmektedir. GK-11 peptidi uygulanan *C. elegans*'larda ise bu genin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Bu durum ortamda enfeksiyona neden olan patojen olmasa dahi antimikrobiyal etkili genlerin ekspresyon

seviyesinin artması için *akt-1* geninin baskılanması gereken daf-2 yolağında *akt-1*'in baskılandığını ve peptidin potansiyel olarak immünmodülatör etkide bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca bağışıklık uyarıcı etkide olabileceği için ileri çalışmalarda insanlarda bağışıklık güçlendirici takviye olarak kullanılabilir özelliğinin bulunduğunu göstermektedir. qRT-PCR sonuçları şekil 4.34'de verilmiştir.



Şekil 4.32. GK-11'in *E.coli* OP50 ortamında *C. elegans* üzerinde immünomodülatör etkisinin belirlenmesi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Konvansiyonel antibiyotiklerin etkinliğinin giderek azalması sonucunda antimikrobiyal direnç sorunu artmakta ve antibiyotikler biyofilm oluşturan patojenlerle mücadelede yetersiz kalmaktadır. Antibiyofilm etkili AMP'ler veya direk olarak ABP'ler patojen mikroorganizmalara uygulandığında genel olarak yapılan çalışmalar sonucunda patojenlerin bu peptidlere antibiyotiklere kıyasla çok daha az direnç oluşturdıkları görülmüştür (Liu et al. 2021) . Bu yüzden bu peptitler umut vadeden terapötik ajanlar olarak dikkat çekmektedir. Ancak peptitlerin güçlü biyolojik aktivitelerine rağmen üretimleri ve klinik uygulamalara entegrasyonu üretim zorluğu veya üretim maliyetinin yüksekliği, proteolitik degradasyona karşı hassasiyetleri gibi durumlar peptidlerin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır.

Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalar ile antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi güçlü, hemolitik ve toksik aktivitesi bulunmayan, stabilitesi artırılmış ve üretim süreçleri optimize edilmiş yeni peptitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bunun yanında AMP'lerin veya ABP'lerin hedefe yönelik taşınmasını ve taşınmasını yaparken onu koruyacak nanoteknolojik sistemlerin entegrasyonu enfeksiyonel hastalıkların çalışılması alanında daha etkili çözüm sağlayabilecektir.

Tez kapsamında,

- Veri tabanı filtreleme teknolojisi kullanılarak ve evrimsel olarak korunmuş antimikrobiyal peptitlerin net yük, amino asit sayısı, hidrofilik özellikleri ele alınarak yapılan filtreleme sonucunda kış pisi balığında bulunan bir AMP olan pleurocidin tespit edilmiştir.
- Pleurocidin dizisi baz alınarak farklı veri tabanları ve biyoinformatik araçlar kullanılarak peptit dizisinin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisine sahip olabilecek kısa AMP dizileri tespit edilmiştir.
- Sentezlenmesine karar verilen peptitlerin adı GK-11 ve LF-12'dir. Bu peptitlerin sentezlenmeden önce biyoinformatik araçlar ile yapı tahmini yapılmıştır.

- Peptitler sentezlendikten sonra saflıkları HPLC ve kütle spektroskopisi ile kontrol edilmiştir. Adından FT-IR ve CD spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonu tespit edilmiştir.
- GK-11 ve LF-12 peptitlerinin antimikrobiyal ve antibiyofilim aktiviteleri test edilmiştir.
- GK-11 peptidinin PAO1 ve MRSA patojenlerinin virülans genlerinin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri tespit edilmiştir.
- GK-11 peptidinin düşük hemolitik ve sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir.
- GK-11 ve LF-12 peptitlerinin *in vivo* etkinliği *C. elegans* ile test edilmiştir. Peptidin toksik aktivitesi olmadığı, patojen bakteriler varlığında sağ kalımı arttırdığı ve immünmodülatör özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R., and Ausubel, F. M. 2003. *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Current Biology*, 13(1), 47–52.
- Aballay, A., Yorgey, P., and Ausubel, F. M. 2000. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 10(23), 1539–1542.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 195–199.
- Ahmed, T. A. E., and Hammami, R. 2019. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12546.
- Akar, S., And Çetin Uyanıkgil, E. Ö. 2020. Antimikrobiyal Peptitlerin Proinflamatuvar Yanıttaki Potansiyelleri. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 27(1).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. *Caenorhabditis Elegans*: development from the perspective of the individual cell. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- Alexander, J. A. N., Radaeva, M., King, D. T., Chambers, H. F., Cherkasov, A., Chatterjee, S. S., and amp; Strynadka, N.C. 2020. Structural analysis of avibactam-mediated activation of the bla and mec divergons in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 29532, 10870-10884
- Algammal, A. M., Eidaroos, N. H., Alfifi, K. J., Alatawy, M., Al-Harbi, A. I., Alanazi, Y. F., Ghobashy, M. O. I., Khafagy, A. R., Esawy, A. M., and El-Sadda, S. S. 2023. Opr l gene sequencing, resistance patterns, virulence genes, quorum sensing and antibiotic resistance genes of xdr *Pseudomonas aeruginosa* isolated from broiler chickens. *Infection and Drug Resistance*, 853–867.
- Alsuwat, M. A., Shah, A. A., Ullah, S., Khan, R. U., Alissa, M., and Khan, M. S. 2025. Microbial Biofilm Formation to Mitigate Foodborne Pathogens Strategies and Control Measures. *Indian Journal of Microbiology*, 1–16.
- Ambreetha, S., and Balachandar, D. 2022. Pathogenesis of plant-associated *Pseudomonas aeruginosa* in *Caenorhabditis elegans* model. *BMC Microbiology*, 22(1), 269.
- Apfeld, J., and Alper, S. 2018. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*? *Disease Gene Identification: Methods and Protocols*, 53–75.
- Bakke, R., Trulear, M. G., Robinson, J. A., and Characklis, W. G. 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(12), 1418–1424.
- Balls, A. K., Hale, W. S., and Harris, T. H. and 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem*, 19(19), 279–288.

- Barranco, D., and Risco, R. 2022. Long-term cryostorage does not negatively affect the recovery of *Caenorhabditis elegans*. *Cryobiology*, 109, 86–88.
- Béatrice, J., Maud, P., Stéphane, A., François, C., Frédéric, G., Benoit, G., and Marie-Odile, H. 2005. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. *FEMS microbiology letters*, 2431, 271–278
- Beaudoin, T., Zhang, L., Hinz, A. J., Parr, C. J., and Mah, T.-F. 2012. The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3128–3136.
- Bezar, I. F., Mashruwala, A. A., Boyd, J. M., and Stock, A. M. 2019. Drug-like fragments inhibit agr-mediated virulence expression in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 9(1), 6786.
- Boyd, A., and Chakrabarty, A. M. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 162–168.
- Brancatisano, F. L., Maisetta, G., Di Luca, M., Esin, S., Bottai, D., Bizzarri, R., Campa, M., and Batoni, G. 2014. Inhibitory effect of the human liver-derived antimicrobial peptide hepcidin 20 on biofilms of polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-positive and PIA-negative strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Biofouling*, 30(4), 435–446.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94.
- Bucataru, C., and Ciobanasu, C. 2024. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. *Microbiological Research*, 127822.
- Burkhardt, W., Salzinger, C., Fischer, J., Malorny, B., Fischer, M., and Szabo, I. 2023. The nematode worm *Caenorhabditis elegans* as an animal experiment replacement for assessing the virulence of different *Salmonella enterica* strains. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1188679.
- Caswell-Chen, E. P., Chen, J., Lewis, E. E., Douhan, G. W., Nadler, S. A., and Carey, J. R. 2005. Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history: ecology of longevity. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(40), pe30–pe30.
- Chakravarty, B. 2022. The evolving role of the *Caenorhabditis elegans* model as a tool to advance studies in nutrition and health. *Nutrition Research*, 106, 47–59.
- Chege, P. M., and McColl, G. 2014. *Caenorhabditis elegans*: a model to investigate oxidative stress and metal dyshomeostasis in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 89.
- Cheng, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Chen, J., Wang, W., and Zhu, G. 2024. Multiple strategies of HSP antimicrobial peptide optimization to enhance antimicrobial activity. *Amino Acids*, 56(1), 1–10.
- Chettri, D., Rani, A., Sharma, B., Selvaraj, M., Assiri, M. A., and Verma, A. K. 2024. Antimicrobial Peptides: Source, application and recent developments. *Process Biochemistry*.

- Chiou, P. P., Khoo, J., Bols, N. C., Douglas, S., and Chen, T. T. 2006. Effects of linear cationic α -helical antimicrobial peptides on immune-relevant genes in trout macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(9), 797–806.
- Cho, J., and Lee, D. G. 2011. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochimie*, 93(10), 1873–1879.
- Choi, H., and Lee, D. G. 2012. Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(12), 1831–1838.
- Chuang, S.-C., Huang, W.-L., Kau, S.-W., Yang, Y.-P., and Yang, C.-D. 2014. Pleurocidin peptide enhances grouper anti-*Vibrio harveyi* immunity elicited by poly (lactide-co-glycolide)-encapsulated recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Vaccines*, 2(2), 380–396.
- Clarke, S. R., and Dyke, K. G. H. 2001. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase operon are inducible. *Microbiology*, 147(4), 803–810.
- Cole, A. M., Darouiche, R. O., Legarda, D., Connell, N., and Diamond, G. 2000a. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8), 2039–2045.
- Cole, A. M., Darouiche, R. O., Legarda, D., Connell, N., and Diamond, G. 2000b. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8), 2039–2045.
- Cole, A. M., Weis, P., and Diamond, G. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008–12013.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322.
- de Carvalho, C. C. C. R. 2017. Biofilms: Microbial strategies for surviving UV exposure. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*, 233–239.
- De La Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Mansour, S. C., Reckseidler-Zenteno, S. L., Hernández, D., Brackman, G., Coenye, T., and Hancock, R. E. W. 2015. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry and Biology*, 22(2), 196–205.
- de Morais, M. C., de Oliveira Lima, E., Perez-Castillo, Y., and de Sousa, D. P. 2023. Synthetic cinnamides and cinnamates: antimicrobial activity, mechanism of action, and in silico study. *Molecules*, 28(4), 1918.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., and Bevins, C. L. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3952–3956.
- Douglas, S. E., Gallant, J. W., Gong, Z., and Hew, C. 2001. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Developmental and Comparative Immunology*, 25(2), 137–147.

- Dsouza, F. P., Dinesh, S., and Sharma, S. 2024. Understanding the intricacies of microbial biofilm formation and its endurance in chronic infections: a key to advancing biofilm-targeted therapeutic strategies. *Archives of Microbiology*, 206(2), 85.
- Dubos, R. J. 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*, 70(1), 1.
- Emmons, S. W. 2014. The development of sexual dimorphism: studies of the *Caenorhabditis elegans* male. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(4), 239–262.
- Engelmann, I., and Pujol, N. 2010. Innate immunity in *C. elegans*. *Adv Exp Med Biol*, 708, 105–121.
- Ermolaeva, M. A., and Schumacher, B. 2014. Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. *Seminars in Immunology*, 26(4), 303–309.
- Estes, K. A., Dunbar, T. L., Powell, J. R., Ausubel, F. M., and Troemel, E. R. 2010. bZIP transcription factor zip-2 mediates an early response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2153–2158.
- Ewbank, J. J. 2002. Tackling both sides of the host–pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes and Infection*, 4(2), 247–256.
- Ewbank, J. J., and Zugasti, O. 2011a. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Disease Models and Mechanisms*, 4(3), 300–304.
- Ewbank, J. J., and Zugasti, O. 2011b. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Disease Models and Mechanisms*, 4(3), 300–304.
- Faraji, F., Mahzounieh, M., Ebrahimi, A., Fallah, F., Teymournejad, O., and Lajevardi, B. 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.
- Fielenbach, N., and Antebi, A. 2008. *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes and Development*, 22(16), 2149–2165.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Fletcher, M., Tillman, E. J., Butty, V. L., Levine, S. S., and Kim, D. H. 2019. Global transcriptional regulation of innate immunity by ATF-7 in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 15(2), e1007830.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1427–1435.
- Garcia-Clemente, M., de la Rosa, D., Máiz, L., Girón, R., Blanco, M., Oliveira, C., Canton, R., and Martinez-García, M. A. 2020. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection on patients with chronic inflammatory airway diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3800.

- Garrett, T. R., Bhakoo, M., and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056.
- Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V, Murray, B. E., Calderwood, S. B., and Ausubel, F. M. 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10892–10897.
- Gause, G. F. (1946). Colistatin: a new antibiotic substance with chemotherapeutic activity. *Science*, 104(2700), 289–290.
- Gerbersdorf, S. U., and Wieprecht, S. 2015. Biostabilization of cohesive sediments: revisiting the role of abiotic conditions, physiology and diversity of microbes, polymeric secretion, and biofilm architecture. *Geobiology*, 13(1), 68–97.
- Giunti, S., Andersen, N., Rayes, D., and De Rosa, M. J. 2021. Drug discovery: Insights from the invertebrate *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology Research and Perspectives*, 9(2), e00721.
- Gómez-Orte, E., Cornes, E., Zheleva, A., Sáenz-Narciso, B., De Toro, M., Iñiguez, M., López, R., San-Juan, J.-F., Ezcurra, B., and Sacristán, B. 2017. Effect of the diet type and temperature on the *C. elegans* transcriptome. *Oncotarget*, 9(11), 9556.
- Güneş, M. 2015. Kefirin stres direncine ve ömür uzunluğuna etkisinin, *Caenorhabditis elegans*' ta araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 58, Antalya.
- Guttenplan, S. B., and Kearns, D. B. 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 849–871.
- Haisma, E. M., de Breij, A., Chan, H., van Dissel, J. T., Drijfhout, J. W., Hiemstra, P. S., El Ghalbzouri, A., and Nibbering, P. H. 2014. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4411–4419.
- Hajdú, G., Szathmári, C., and Söti, C. 2024. Modeling host–pathogen interactions in *C. elegans*: Lessons learned from *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7034.
- Haney, E. F., Mansour, S. C., Hilchie, A. L., De La Fuente-Núñez, C., and Hancock, R. E. W. 2015. High throughput screening methods for assessing antibiofilm and immunomodulatory activities of synthetic peptides. *Peptides*, 71, 276–285.
- Haney, E. F., Trimble, M. J., and Hancock, R. E. W. 2021. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, 16(5), 2615–2632.
- Hilchie, A. L., Conrad, D. M., Power Coombs, M. R., Zemlak, T., Doucette, C. D., Liwski, R. S., and Hoskin, D. W. 2013. Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides mediate lysis of multiple myeloma cells and impair the growth of multiple myeloma xenografts. *Leukemia and Lymphoma*, 54(10), 2255–2262.
- Hirsch, J. G. (1956). Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 103(5), 589.
- Hodgkin, J., and Partridge, F. A. 2008. *Caenorhabditis elegans* meets microsporidia: the nematode killers from Paris. *PLoS Biology*, 6(12), e1000005.

- Hošťacká, A., Čižnár, I., and Štefkovičová, M. 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 55, 75–78.
- Howlin, R. P., Winnard, C., Angus, E. M., Frapwell, C. J., Webb, J. S., Cooper, J. J., Aiken, S. S., Bishop, J. Y., and Stoodley, P. 2017. Prevention of *Propionibacterium acnes* biofilm formation in prosthetic infections in vitro. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 26(4), 553–563.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H. G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106(1), 7–16.
- Hummell, N. A., Revtovich, A. V, and Kirienko, N. V. 2021a. Novel immune modulators enhance *Caenorhabditis elegans* resistance to multiple pathogens. *Mosphere*, 6(1), 10–1128.
- Hummell, N. A., Revtovich, A. V, and Kirienko, N. V. 2021b. Novel immune modulators enhance *Caenorhabditis elegans* resistance to multiple pathogens. *Mosphere*, 6(1), 10–1128.
- Imai, Y., Meyer, K. J., Iinishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., Manuse, S., Caboni, M., Mori, M., Niles, S., and Ghiglieri, M. 2019. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 576(7787), 459–464.
- Izadpanah, A., and Gallo, R. L. 2005. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381–390.
- Jacobsen, A. S., and Jenssen, H. 2012. Human cathelicidin LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*, 4(12), 1587–1599.
- Jassim, A. A., Mahdi, W. M., and Al-Obaidi, O. R. K. 2025. Identification of *algD* and *oprL* genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from multiple environments and different local sources in Iraq. *Kuwait Journal of Science*, 52(1), 100302.
- JebaMercy, G., and Balamurugan, K. 2012. Effects of sequential infections of *Caenorhabditis elegans* with *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Microbiology and Immunology*, 56(12), 825–835.
- Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R. H., Ackerman, P. A., Iwama, G. K., and Hancock, R. E. W. 2000. Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1928–1932.
- Ji-Young, Y., Song-Yub, S., Shin-Saeng, L., and Kyung-Soo, H. 2006. Structure and bacterial cell selectivity of a fish-derived antimicrobial peptide, pleurocidin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 880–888.
- Jones, S. E., and Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9, 1–9.
- Jung, H. J., Park, Y., Sung, W. S., Suh, B. K., Lee, J., Hahm, K.-S., and Lee, D. G. 2007. Fungicidal effect of pleurocidin by membrane-active mechanism and design of enantiomeric analogue for proteolytic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(6), 1400–1405.

- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., and McClean, S. 2021. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128.
- Kao, L.-T., Yang, T.-Y., Hung, W.-C., Yang, W.-T., He, P., Chen, B.-X., Wang, Y.-C., Chen, S.-S., Lai, Y.-W., and Wang, H.-Y. 2024. In Vivo Effect of Halicin on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Infected *Caenorhabditis elegans* and Its Clinical Potential. *Antibiotics*, 13(9), 906.
- Kato, Y., Aizawa, T., Hoshino, H., Kawano, K., Nitta, K., and Zhang, H. 2002. abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 361(2), 221–230.
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., and Tan, M.-W. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*, 297(5581), 623–626.
- Kimble, J., and Nüsslein-Volhard, C. 2022. The great small organisms of developmental genetics: *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 485, 93–122.
- Kyriakakis, E., Markaki, M., and Tavernarakis, N. 2015. *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(2), e975027.
- Lambert, R. J. W., and Pearson, J. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790.
- Lee, J., and Lee, D. G. 2008. Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its enantiomer. *Experimental and Molecular Medicine*, 40(4), 370–376.
- Lee, J., and Lee, D. G. 2016. Concentration-dependent mechanism alteration of pleurocidin peptide in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 72, 159–164.
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., and He, Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919.
- Łeski, T. A., and Tomasz, A. 2005. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1815–1824.
- Leslie, M. 2005. Death in the Dirt: Long-lived in the petri dish, mutant worms bite the dust in soil. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(19), nf35–nf35.
- Li, J., Chen, D., and Lin, H. 2021a. Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1647–1656.
- Li, J., Chen, D., and Lin, H. 2021b. Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1647–1656.
- Li, J., Chen, D., and Lin, H. 2021c. Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1647–1656.
- Li, Y., Li, S., Yang, K., Guo, R., Zhu, X., Shi, Y., and Huang, A. 2022. Antibiofilm mechanism of a novel milk-derived antimicrobial peptide against *Staphylococcus aureus* by

- downregulating agr quorum sensing system. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2198–2209.
- Lim, S. S., Song, Y. M., Jang, M. H., Kim, Y., Hahm, K.-S., and Shin, S. Y. 2004. Effects of two glycine residues in positions 13 and 17 of pleurocidin on structure and bacterial cell selectivity. *Protein and Peptide Letters*, 11(1), 35–40.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., and Epstein, S. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455–459.
- Liu, H. Y., Prentice, E. L., and Webber, M. A. 2024a. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27.
- Liu, H. Y., Prentice, E. L., and Webber, M. A. 2024b. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27.
- Liu, Y., Shi, J., Tong, Z., Jia, Y., Yang, B., and Wang, Z. 2021. The revitalization of antimicrobial peptides in the resistance era. *Pharmacological Research*, 163, 105276.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Qin, L., and Tay, J.-H. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*, 110(3), 251–256.
- Lüders, T., Birkemo, G. A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Nes, I. F. 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1797–1799.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 194–222.
- Mai, J., Tian, X.-L., Gallant, J. W., Merkley, N., Biswas, Z., Syvitski, R., Douglas, S. E., Ling, J., and Li, Y.-H. 2011. A novel target-specific, salt-resistant antimicrobial peptide against the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5205–5213.
- Mallo, G. V., Kurz, C. L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y., and Ewbank, J. J. 2002. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Current Biology*, 12(14), 1209–1214.
- Mangoni, M. L., and Casciaro, B. 2020. Development of antimicrobial peptides from amphibians. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 11, p. 772). MDPI.
- Manzo, G., Hind, C. K., Ferguson, P. M., Amison, R. T., Hodgson-Casson, A. C., Ciazynska, K. A., Weller, B. J., Clarke, M., Lam, C., and Man, R. C. H. 2020. A pleurocidin analogue with greater conformational flexibility, enhanced antimicrobial potency and in vivo therapeutic efficacy. *Communications Biology*, 3(1), 697.
- Marsden, A. E., Grudzinski, K., Ondrey, J. M., DeLoney-Marino, C. R., and Visick, K. L. (2017). Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *PLoS One*, 12(1), e0169521.
- Marsh, E. K., and May, R. C. 2012a. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2075–2081.
- Marsh, E. K., and May, R. C. 2012b. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2075–2081.

- Mason, A. J., Chotimah, I. N. H., Bertani, P., and Bechinger, B. 2006. A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide Pleurocidin. *Molecular Membrane Biology*, 23(2), 185–194.
- Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., and Rose, J. K. 2019a. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19(1), e35.
- Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., and Rose, J. K. 2019b. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19(1), e35.
- Merrifield, B. 1986. Solid phase synthesis. *Science*, 232(4748), 341–347.
- Millet, A. C. M., and Ewbank, J. J. 2004a. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 4–9.
- Millet, A. C. M., and Ewbank, J. J. 2004b. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 4–9.
- Mishra, B., and Wang, G. 2012. Ab initio design of potent anti-MRSA peptides based on database filtering technology. *Journal of the American Chemical Society*, 134(30), 12426–12429.
- Mishra, S., Gaur, A. V., and Agarwal, R. 2020. Standardization of synchronization procedure to collect the similar aged *C. elegans*. *Peer Rev. J. Forens. Gen. Sci*, 4, 268–271.
- Mishra, S. K., Akter, T., Urmi, U. L., Enniful, G., Sara, M., Shen, J., Suresh, D., Zheng, L., Mekonen, E. S., and Rayamajhee, B. 2025. Harnessing Non-Antibiotic Strategies to Counter Multidrug-Resistant Clinical Pathogens with Special Reference to Antimicrobial Peptides and Their Coatings. *Antibiotics*, 14(1), 57.
- Mohaideen, N. S. M. H., Vaani, S., and Hemalatha, S. 2023. Antimicrobial peptides. *Current Pharmacology Reports*, 9(6), 433–454.
- Mohamed, M. F., Brezden, A., Mohammad, H., Chmielewski, J., and Seleem, M. N. 2017. A short D-enantiomeric antimicrobial peptide with potent immunomodulatory and antibiofilm activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 7(1), 6953.
- Mohr, C. D., Sonsteby, S. K., and Deretic, V. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* homologs of hemC and hemD are linked to the gene encoding the regulator of mucoidy AlgR. *Molecular and General Genetics MGG*, 242, 177–184.
- Moons, P., Michiels, C. W., and Aertsen, A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 157–168.
- Morash, M. G., Douglas, S. E., Robotham, A., Ridley, C. M., Gallant, J. W., and Soanes, K. H. 2011. The zebrafish embryo as a tool for screening and characterizing pleurocidin host-defense peptides as anti-cancer agents. *Disease Models and Mechanisms*, 4(5), 622–633.
- Morizane, S., and Gallo, R. L. 2012. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of Dermatology*, 39(3), 225–230.

- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., and Wool, E. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655.
- Murray, H. M., Gallant, J. W., and Douglas, S. E. 2003. Cellular localization of pleurocidin gene expression and synthesis in winter flounder gill using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cell and Tissue Research*, 312(2), 197–202.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., and De Maria, L. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975–980.
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J., and Calderwood, S. B. 2002. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15675–15680.
- Nicholas, H. R., and Hodgkin, J. 2004a. Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Immunology*, 41(5), 479–493.
- Nicholas, H. R., and Hodgkin, J. 2004b. Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Immunology*, 41(5), 479–493.
- Nigon, V. M., and Félix, M.-A. 2018. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology* [Internet].
- Nobile, C. J., and Johnson, A. D. 2015. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92.
- Otvos Laszlo, J. 2000. Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 6(10), 497–511.
- Panayidou, S., Georgiades, K., Christofi, T., Tamana, S., Promponas, V. J., and Apidianakis, Y. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence. *Scientificreports*, 10(1), 1–19.
- Pandey, A., and Pandey, G. K. 2014. The UNC-53-mediated Interactome: Analysis of its Role in the Generation of the *C. elegans* Connectome. Springer.
- Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V., and Hancock, R. E. W. 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 605–614.
- Patrzykat, A., Gallant, J. W., Seo, J.-K., Pytyck, J., and Douglas, S. E. 2003. Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2464–2470.
- Pimenta, L. K. L., Rodrigues, C. A., Filho, A. R. G., Coelho, C. J., Goes, V., Estrela, M., de Souza, P., Avelino, M. A. G., Vieira, J. D. G., and Carneiro, L. 2023. *Staphylococcus* spp. causatives of infections and carrier of blaZ, femA, and mecA genes associated with resistance. *Antibiotics*, 12(4), 671.

- Poirel, L., Jayol, A., and Nordmann, P. 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596.
- Pop, M., Klemke, A.-L., Seidler, L., Wernet, N., Steudel, P. L., Baust, V., Wohlmann, E., and Fischer, R. 2024. *Caenorhabditis elegans* neuropeptide NLP-27 enhances neurodegeneration and paralysis in an opioid-like manner during fungal infection. *IScience*, 27(4).
- Popitool, K., Wataradee, S., Wichai, T., Noitang, S., Ajariyakhajorn, K., Charoenrat, T., Boonyaratanakornkit, V., and Sooksai, S. 2023. Potential of Pm11 antimicrobial peptide against bovine mastitis pathogens. *American Journal of Veterinary Research*, 84(1).
- Powell, J. R., and Ausubel, F. M. 2008. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. *Innate Immunity*, 403–427.
- Pujol, N., Zugasti, O., Wong, D., Couillault, C., Kurz, C. L., Schulenburg, H., and Ewbank, J. J. 2008. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathogens*, 4(7), e1000105.
- Pundir, P., Catalli, A., Leggiadro, C., Douglas, S. E., and Kulka, M. 2014. Pleurocidin, a novel antimicrobial peptide, induces human mast cell activation through the FPRL1 receptor. *Mucosal Immunology*, 7(1), 177–187.
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H.-C., Mayer, C., Busscher, H. J., and van der Mei, H. C. 2022. Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 283–302.
- Radeke, L. J., and Herman, M. A. 2021. Take a walk to the wild side of *Caenorhabditis elegans*-pathogen interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(2), 10–1128.
- Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y., Sundaram, M. V, and Pack, A. I. 2008. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451(7178), 569–572.
- Ramos, C., Lorenz, K., Putrinš, M., Hind, C. K., Meos, A., Laidmäe, I., Tenson, T., Sutton, J. M., Mason, A. J., and Kogermann, K. 2024. Fibrous matrices facilitate pleurocidin killing of wound associated bacterial pathogens. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 192, 106648.
- Rezaeianaran, F., and Gijs, M. A. M. 2023. Difference in Intestine Content of *Caenorhabditis elegans* When Fed on Non-Pathogenic or Pathogenic Bacteria. *Micromachines*, 14(7), 1386.
- Rodríguez, A. A., Otero-González, A., Ghattas, M., and Ständker, L. 2021a. Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1381.
- Rodríguez, A. A., Otero-González, A., Ghattas, M., and Ständker, L. 2021b. Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1381.
- Roeder, T., Stanisak, M., Gelhaus, C., Bruchhaus, I., Grötzinger, J., and Leippe, M. 2010. Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans*

- instrumental in nutrition and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(2), 203–209.
- Roman, A., Palanski, K., Nemenman, I., and Ryu, W. S. 2023. A dynamical model of *C. elegans* thermal preference reveals independent excitatory and inhibitory learning pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(13), e2215191120.
- Sadat, A., and Joye, I. J. 2020a. Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, 10(17), 5918.
- Sadat, A., and Joye, I. J. 2020b. Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, 10(17), 5918.
- Saint, N., Cadiou, H., Bessin, Y., and Molle, G. 2002. Antibacterial peptide pleurocidin forms ion channels in planar lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1564(2), 359–364.
- Sakaguchi, A., Matsumoto, K., and Hisamoto, N. 2004. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biochemistry*, 136(1), 7–11.
- Sandín, D., Valle, J., Morata, J., Andreu, D., and Torrent, M. 2022. Antimicrobial peptides can generate tolerance by lag and interfere with antimicrobial therapy. *Pharmaceutics*, 14(10), 2169.
- Santos-Silva, C. A. dos, Zupin, L., Oliveira-Lima, M., Vilela, L. M. B., Bezerra-Neto, J. P., Ferreira-Neto, J. R., Ferreira, J. D. C., Oliveira-Silva, R. L. de, Pires, C. de J., and Aburjaile, F. F. 2020. Plant antimicrobial peptides: state of the art, in silico prediction and perspectives in the omics era. *Bioinformatics and Biology Insights*, 14, 1177932220952739.
- Sarkheili, M., Asghari-Sana, F., Asli, S. A., and Daghdari, S. G. 2025. Biofilm formation, pigment production, and virulence gene profiles in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from respiratory and urinary tract infections. *Gene Reports*, 39, 102184.
- Sato, H., and Feix, J. B. 2006. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1245–1256.
- Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W., and Lehrer, R. I. 1985. Primary structures of three human neutrophil defensins. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1436–1439.
- Shen, P., Yue, Y., Zheng, J., and Park, Y. 2018. *Caenorhabditis elegans*: a convenient in vivo model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer’s disease. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 1–22.
- Shi, X., Zhang, X., Yao, Q., and He, F. 2017. A novel method for the rapid detection of microbes in blood using pleurocidin antimicrobial peptide functionalized piezoelectric sensor. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 69–75.
- Singh, R., and Ray, P. 2014. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(5), 669–681.
- Soravia, E., Martini, G., and Zasloff, M. 1988. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Letters*, 228(2), 337–340.

- Souza, A. L. A., Díaz-Dellavalle, P., Cabrera, A., Larrañaga, P., Dalla-Rizza, M., and De-Simone, S. G. 2013. Antimicrobial activity of pleurocidin is retained in Plc-2, a C-terminal 12-amino acid fragment. *Peptides*, 45, 78–84.
- Srivastava, A., Verma, N., Kumar, V., Apoorva, P., and Agarwal, V. 2024. Biofilm inhibition/eradication: exploring strategies and confronting challenges in combatting biofilm. *Archives of Microbiology*, 206(5), 212.
- Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. WormBook: The Online Review of *C. Elegans* Biology [Internet].
- Sukmarini, L., Atikana, A., and Hertiani, T. 2024a. Antibiofilm activity of marine microbial natural products: potential peptide-and polyketide-derived molecules from marine microbes toward targeting biofilm-forming pathogens. *Journal of Natural Medicines*, 78(1), 1–20.
- Sukmarini, L., Atikana, A., and Hertiani, T. 2024b. Antibiofilm activity of marine microbial natural products: potential peptide-and polyketide-derived molecules from marine microbes toward targeting biofilm-forming pathogens. *Journal of Natural Medicines*, 78(1), 1–20.
- Sun, F., Qu, F., Ling, Y., Mao, P., Xia, P., Chen, H., and Zhou, D. 2013. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 8(7), 877–886.
- Sung, W. S., and Lee, D. G. 2008. Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(3), 858–861.
- Talandashti, R., Mahdiuni, H., Jafari, M., and Mehrnejad, F. 2019. Molecular basis for membrane selectivity of antimicrobial peptide pleurocidin in the presence of different eukaryotic and prokaryotic model membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(7), 3262–3276.
- Talandashti, R., Mehrnejad, F., Rostamipour, K., Doustdar, F., and Lavasanifar, A. 2021. Molecular insights into pore formation mechanism, membrane perturbation, and water permeation by the antimicrobial peptide pleurocidin: a combined all-atom and coarse-grained molecular dynamics simulation study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(26), 7163–7176.
- Tan, L., Huang, Y., Shang, W., Yang, Y., Peng, H., Hu, Z., Wang, Y., Rao, Y., Hu, Q., and Rao, X. 2022. Accessory gene regulator (*agr*) allelic variants in cognate *Staphylococcus aureus* strain display similar phenotypes. *Frontiers in Microbiology*, 13, 700894.
- Tang, K. W. K., Millar, B. C., and Moore, J. E. 2023. Antimicrobial resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387.
- Tao, R., Tong, Z., Lin, Y., Xue, Y., Wang, W., Kuang, R., Wang, P., Tian, Y., and Ni, L. 2011. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides*, 32(8), 1748–1754.
- Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., and Hannig, C. 2013. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 17, 841–850.

- Thula, O. Y. S. 2022. Neuronal mechanisms implementing a hierarchy of rhythmic movements in *C. Elegans*. Doctor of Philosophy, University Vienna.
- Tolker-Nielsen, T. 2015. Biofilm development. *Microbial Biofilms*, 51–66.
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. 2000. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 55(1), 4–30.
- Tsuda, N., Koba, Y., Hatakeyama, T., ando, S., Shindo, M., Uchida, Y., and Aoyagi, H. 2008. Antibacterial Activity of Short Peptides Based on Pleurocidin and Their Interaction with Phospholipid Membranes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 81(10), 1299–1303.
- Vice, Z., Zhou, Y., Chitlapilly Dass, S., and Wang, R. 2025. Microscopic Analysis of Temperature Effects on Surface Colonization and Biofilm Morphology of *Salmonella enterica*. *Foods*, 14(2), 268.
- Viri, V., Arweiler, M., Lehnert, T., and Gijs, M. A. M. 2021. An in vivo microfluidic study of bacterial load dynamics and absorption in the *C. elegans* intestine. *Micromachines*, 12(7), 832.
- Vuong, C., and Otto, M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481–489.
- Wang, D., Shi, J., Chen, C., Wang, Z., and Liu, Y. 2022. Truncated pleurocidin derivative with high pepsin hydrolysis resistance to combat multidrug-resistant pathogens. *Pharmaceutics*, 14(10), 2025.
- Wang, X., Yue, T., and Lee, T. 2015. Development of Pleurocidin-poly (vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food Control*, 54, 150–157.
- Wang, Y., Ezemaduka, A. N., Tang, Y., and Chang, Z. 2009. Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: from genetics to biochemistry. *IUBMB Life*, 61(6), 607–612.
- Wong, D., Bazopoulou, D., Pujol, N., Tavernarakis, N., and Ewbank, J. J. 2007. Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biology*, 8, 1–18.
- Wu, Q., Patočka, J., and Kuča, K. 2018. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10(11), 461.
- Xiong, H., Pears, C., and Woollard, A. 2017. An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. *Scientific Reports*, 7(1), 9839.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. 2019. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423.
- Yoshida, K., Mukai, Y., Niidome, T., Takashi, C., Tokunaga, Y., Hatakeyama, T., and Aoyagi, H. 2001a. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *The Journal of Peptide Research*, 57(2), 119–126.
- Yoshida, K., Mukai, Y., Niidome, T., Takashi, C., Tokunaga, Y., Hatakeyama, T., and Aoyagi, H. 2001b. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *The Journal of Peptide Research*, 57(2), 119–126.

- Yue, Y., Li, S., Shen, P., and Park, Y. 2021. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *Current Research in Food Science*, 4, 692–697.
- Zarroug, S. H. O., Bajaman, J. S., Hamza, F. N., Saleem, R. A., and Abdalla, H. K. 2023. *Caenorhabditis elegans* as an In Vivo Model for the Discovery and Development of Natural Plant-Based Antimicrobial Compounds. *Pharmaceuticals*, 16(8), 1070.
- Zhang, L., and Gallo, R. L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19.
- Zhang, M., Wei, W., Sun, Y., Jiang, X., Ying, X., Tao, R., and Ni, L. 2016a. Pleurocidin congeners demonstrate activity against *Streptococcus* and low toxicity on gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 70, 79–87.
- Zhang, M., Wei, W., Sun, Y., Jiang, X., Ying, X., Tao, R., and Ni, L. 2016b. Pleurocidin congeners demonstrate activity against *Streptococcus* and low toxicity on gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 70, 79–87.
- Zhang, Y., Lu, H., and Bargmann, C. I. 2005. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438(7065), 179–184.
- Zhao, Y., Zhang, M., Qiu, S., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Zhu, R., Wang, H., Li, Y., and Wang, K. 2016. Antimicrobial activity and stability of the D-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide polybia-MPI. *AMB Express*, 6, 1–11.
- Zhu, Z., Hu, Z., Li, S., Fang, R., Ono, H. K., and Hu, D.-L. 2023. Molecular characteristics and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* exotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 395.
- Zugasti, O., and Ewbank, J. J. 2009. Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF- β signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nature Immunology*, 10(3), 249–256.