

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL PEPTİT ANTİBİYOTİKLERDEN ESİNLENEREK YENİ ETKİN
ANTİBAKTERİYELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

NİHAN ÜNÜBOL

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL PEPTİT ANTİBİYOTİKLERDEN ESİNLENEREK YENİ ETKİN
ANTİBAKTERİYELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nihan ÜNÜBOL tarafından hazırlanan tez çalışması 07.11.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK
İstanbul Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle, bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım kıymetli hocam Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e ve danışman hocam Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum. Yine çalışmamda yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunan Yrd. Doç. Dr. Tuğba Arzu Özal İLDENİZ'e, Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, Sümeyye AKÇELİK'e ve Merve ELMAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamda bana kattığı her bilgi için Doç. Dr. Özge CAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Sevgili eşim Hüsnü ÜNÜBOL ve oğlum Metehan ÜNÜBOL'a gösterdikleri anlayış, sabır ve her konuda destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum. Beni sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştiren ve bu günlere getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan kıymetli annem Türkan AYTEKİN, babam Murat AYTEKİN ve kardeşim Aziz Cihan AYTEKİN'e sonsuz teşekkürler.

Kasım, 2017

Nihan ÜNÜBOL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Antibiyotik Etki ve Direnç Mekanizması	7
2.1.1 Antibiyotikler ve Seçici Toksisite	7
2.1.1.1 Bakteri Hücre Duvar Sentezi İnhibisyonu.....	9
2.1.1.2 Bakteri DNA Sentez İnhibisyonu	9
2.1.1.3 Bakteri Protein Sentez İnhibisyonu	10
2.1.1.4 Folat Sentez İnhibisyonu	10
2.1.2 Antibiyotik Direnci	10
2.1.2.1 Antibiyotik Direnç Mekanizması	11
2.2 Antimikrobiyal Peptitler	12
2.2.1 Antimikrobiyal Peptitlerin Etkisi	13
2.2.2 Antimikrobiyal Peptitlerin Modifikasyonu	17
2.2.3 Hücrelerin Antimikrobiyal Peptitlerin Etkisinden Koruması.....	18
2.2.4 Antimikrobiyal Peptitlerin Tıp ve Halk Sağlığı İçin Önemi	19

2.3	Canlılarda Bulunan Antimikrobiyal Peptitlerin Gruplandırılması	20
2.3.1	Bakterilerde Bulunan Antimikrobiyal Peptitler	20
2.3.2	Böceklerde Bulunan Antimikrobiyal Peptitler	22
2.3.3	Amfibilerde Bulunan Antimikrobiyal Peptitler	22
2.3.4	Bitkilerde Bulunan Antimikrobiyal Peptitler.....	24
2.3.5	Memelilerde Bulunan Antimikrobiyal Peptitler	26
2.4	İnsan Antimikrobiyal Peptitleri	29
2.4.1	Defensinler	35
2.4.2	Histatinler	36
2.4.3	Katolisidinler	36
2.4.4	Dermisidinler	37
2.4.5	Hepsidinler.....	37
2.5	İnsan Antimikrobiyal Peptitlerinin Etki Mekanizması	38
2.6	Bakterilerin Antimikrobiyal Peptitlere Gösterdiği Direnç Mekanizması...	39
2.7	Antimikrobiyal Peptitlerin Potansiyel Stratejileri	41
2.8	Antimikrobiyal Peptitlerin Rekombinant Sentezi	42
2.9	Antimikrobiyal Peptitlerin Geleceği.....	44
2.10	Antimikrobiyal Peptitlerin Etkinliğinin Belirlenmesinde Moleküler Modelleme Yöntemleri	45
BÖLÜM 3		
DENEYSEL ÇALIŞMALAR		48
3.1	Materyal.....	48
3.1.1	Çözeltilerin Hazırlanması	51
3.1.1.1	LB Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	51
3.1.1.2	Tris Salin Tamponunun Hazırlanması	51
3.1.1.3	DMEM Besiyerinin Hazırlanması	51
3.2	Yöntem.....	51
3.2.1	Antimikrobiyal Peptitlerin Moleküler Modelleme ile İncelenmesi ...	51
3.2.2	Antimikrobiyal Peptitlerin Sentezi.....	53
3.2.3	Kullanılan Bakteri Kökenleri.....	54
3.2.4	Antimikrobiyal Aktivite	54
3.2.5	Hemolitik Aktivite ve Sitotoksikite	55
3.2.6	Transmisyon Elektron Mikroskobu.....	57
3.2.7	Floresan Mikroskobu	58
BÖLÜM 4		
SONUÇLAR		59
4.1	Antimikrobiyal Peptitlerin Tasarımı ve Olası Yapısı	59
4.2	TN Antimikrobiyal Peptitlerinin Antimikrobiyal Etkinlik Sonuçları	60
4.3	TN Antimikrobiyal Peptitlerinin Hemolitik ve Sitotoksik Etkisi	61
4.4	TN Antimikrobiyal Peptitlerinin Bakteriler Üzerine Etkisinin TEM Sonucu (TEM ile değerlendirme)	62
4.5	TN Antimikrobiyal Peptitlerinin Bakteri Hücre Zarına Etkisi (Floresan Mikroskop ile değerlendirme)	63

4.6 TN Antimikrobiyal Peptitlerin Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları	64
BÖLÜM 5	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	88



SİMGE LİSTESİ

a	İvme
C	Santigrad
Ca ⁺²	Kalsiyum
CO ₂	Karbondiyoksit
F	Kuvvet
HC ₅₀	Hücrelerin %50 sini parçalayan hemolitik konsantrasyon
IC ₅₀	Hücrelerin %50 sini öldüren sitotoksik konsantrasyon
kDa	Kilo Dalton
M	Molarite
m	Kütle
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
rpm	Sabit bir ekseninde, 1 dakika içerisinde gerçekleşen dönüş/devir sayısı
β	Beta
α	Alfa
θ	Teta
%	Yüzde
>	Büyüktür
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

KISALTMA LİSTESİ

AAMP	Anyonik Antimikrobiyal Peptit
ABC	ATP Binding Cassette
AMP	Antimikrobiyal Peptit
Arg	Arginin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
CAMP	Katyonik Antimikrobiyal Peptitler
CAP-18	18-kDa Katyonik Antimikrobiyal Protein
CCR-6	Kemokin Reseptör 6
CFU	Colony Forming Unit
CL	Kardiyolipin
CPP	Hücreye Nüfuz Eden Peptitler
CPS	Kapsüler Polisakkarit
CRAMP	Antimicrobial Peptide Associated with Cathelicidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPS	Ekzopolisakkarit
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FBS	Fetal Bovine Serum
FPRL-1	Formyl Peptide Receptor Like 1
GST	Glutasyon S Transferaz
hBD	Human Beta Defensin
HCAP18	Human Cationic Antimicrobial Protein 18
HD	Human Defensin
HeLa	Henrita Lacks Cell
HNP	Human Alfa Defensin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LB	Luria-Bertani
Leu	Lösin
Lys	Lizin

MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optik Dansite
PC	Fosfokolin
PG	Fosfotidilgliserol
P33	Hücre Yüzey Reseptörü
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop
U.V	Ultraviole



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1	Antimikrobiyal peptit (AMP) adsorpsiyonunu takiben bakteri sitoplazmik zarında meydana gelen olaylar	17
Şekil 2. 2	Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde antimikrobiyal peptid direnç mekanizması	41
Şekil 3. 1	TN AMP'lerin PEP-Fold programı ile belirlenmiş olası üç boyutlu yapısı.....	53
Şekil 4. 1	AMP'lerin hemolitik aktivite ve sitotoksisite sonuçları.....	62
Şekil 4. 2	TN1 AMP'nin <i>S. aureus</i> üzerindeki etkisinin TEM ile incelenmesi	63
Şekil 4. 3	Farklı derişimlerde TN1'nin <i>S. aureus</i> üzerindeki etkisi sonucu SYBR Green boyasının hücre içine penetrasyonu	63
Şekil 4. 4	TN1 (solda) ve TN3 (sağda) AMP'lerin bakteri zarı ile etkileşimleri.....	64
Şekil 4. 5	TN3 moleküllerinin <i>S. aureus</i> 'un hücre duvar sentezinden sorumlu glikozil-transferaza bağlanması	65

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Temel antibiyotik sınıfları ve bakteri hücresindeki hedefleri..... 8
Çizelge 2. 2	AMP'lerin tanımlanan farklı etki şekilleri 14
Çizelge 2. 3	İnsan antimikrobiyal peptit ve proteinleri 30
Çizelge 3. 1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aygıt ve Sarf Malzemeleri 48
Çizelge 3. 2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Besiyerleri..... 50
Çizelge 3. 3	Tasarlanmış ve sentetik olarak sentezlettirilmiş olan TN 1 – 7 AMP'lerin özellikleri 54
Çizelge 4. 1	TN AMP'lerin minimal inhibitör konsantrasyon sonuçları 61

DOĞAL PEPTİT ANTİBİYOTİKLERDEN ESİNLENEREK YENİ ETKİN ANTİBAKTERİYELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nihan ÜNÜBOL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY

Böceklerden insanlara kadar geniş bir organizma grubu tarafından üretilen antimikrobiyal peptitler, klasik antimikrobiyallere dirençli organizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı önemli alternatif tedavi ajanları olan doğal antibiyotiklerdir. Bu bilgiler doğrultusunda doğal antimikrobiyal peptitlerin korunmuş motiflerinden esinlenilerek, antibakteriyel aktivite gösteren kısa, üretilmesi kolay peptitler tasarlamayı hedefledik. Doğal antimikrobiyal peptitlerin korunmuş bölgelerini belirleyerek üç boyutlu yapılarını inceledik. Bu incelemeler bize, kısa peptit bölgelerinin, alfa sarmal yapıları oluşturan tekrarlanan hidrofobik ve pozitif yüklü amino asitlerden oluştuğunu ve sarmalın bir tarafında pozitif yüklü amino asitler bulunduğunu gösterdi. Bu yapılara benzer peptitler tasarlayarak bunları sentezletip, farklı bakteri türleri üzerindeki antibakteriyel aktivitelerini belirledik. Peptitlerin etki mekanizmalarını anlamak için ise moleküler dinamik modelleme yöntemi kullanarak, peptitlerin bakteriyel zarlarla olan ilişkilerini inceledik.

Pozitif yüklü bir amino asit olan argininin peptitlere dahil edildiğinde, lizine kıyasla daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiğini ve her iki uçta pozitif yüklü amino asitlere sahip olan peptitlerin, *Staphylococcus aureus*'a (MİK 16.0 µg / ml) kıyasla *E. coli* (MİK 2.0 µg / ml) üzerinde daha iyi aktivite gösterdiğini saptadık. Sadece bir uçta pozitif yüklü amino asit olduğunda, organizmaların her ikisinde de eşit düzeyde etki

gözlemledik (MIC 4.0 µg / ml). Pozitif yüklü argininlerin molekülün bir tarafında zikzak şeklinde konumlandırılması doğrusal bir eksenle konumlandırılmasına kıyasla molekülün daha yüksek aktivite göstermesini sağladı. Molekülün bir ucunda hidrofobik amino asit sayısının 3'ten 6'ya artırılması, moleküllerin birbirlerine bağlanmasına ve peptitin antibakteriyel aktivitesinin tamamen ortadan kalkmasına neden oldu. Moleküler dinamik simülasyonlar, hidrofobik ve pozitif yüklü amino asitlerin asimetrik konumlandırılmasının gerektiğini, hidrofobik kısmın zarlardaki yağ ikili katmanına gömdüğünü ve pozitif yüklü kısımların yağ iki katmanının her iki tarafındaki fosfolipidlerin negatif yüklü fosfat gruplarına sabitlediğini gösterdi. Böylece, tek bir molekülün hidrofilik kanal oluşturarak hücre içine su geçişlerini sağlayabildiği anlaşıldı. Bu peptitlerle muamele edilen stafilokokların elektron mikroskopik incelemesi sonucunda, aktif hücre duvar sentezinin gerçekleştiği kısımdan bakterilerin hemen hemen iki eşit parçaya ayrıldığı gözlemlendi. Bu çalışmaya ek olarak yapılan moleküler birleşme yöntemi ile peptitlerin, peptidoglikan sentezleyici zar proteini olan glikoziltransferazın aktif bölgesine kuvvetli bir şekilde bağlandığından hücre duvarı sentezini de engelleyebildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada geliştirdiğimiz antimikrobiyal peptitlerin hepsinin proteinaz K'ya duyarlı olduğunu saptadık. Proteazlara dirençli sentetik benzer türevlerinin geliştirilmesi, bu peptitlerin tedavi amaçlı kullanılmaları durumunda dayanıklılıklarını arttıracaktır. Bu peptitlerin hayvan çalışmaları ile güvenilirliği kanıtlandıktan sonra diğer antibiyotiklere dirençli organizmalara karşı umut verici ilaç adayları olabilirler.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal peptitler, Peptit antibiyotikler, Katelisidin, Antimikrobiyal aktivite, Moleküler modelleme

ABSTRACT

THE DEVELOPMENT OF NEW EFFECTIVE ANTIBIOTICS BY INSPIRING FROM NATURAL PEPTIDE ANTIBIOTICS

Nihan ÜNÜBOL

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY

Antimicrobial peptides produced by a wide spectrum of organisms from insects to humans, are natural antibiotics, which may be important alternative therapy agents for infections caused by organisms resistant to classical antimicrobials. Inspired from conserved motifs of natural antimicrobial peptides we aimed to design short, easy to produce peptides, which show antibacterial activity. We have determined the conserved regions of natural antimicrobial peptides and analyzed their three-dimensional structure. This revealed that these short peptide regions consisted of repeating hydrophobic and positively charged amino acids that form alpha-helix structures and position positively charged amino acids on one side of the helix. We have designed and obtained peptides similar to these structures and determined their antibacterial activity on different species of bacteria and studied their relation to bacterial membranes by molecular dynamics modeling, which helped us to understand their mechanism of action. Including arginine in peptides as a positively charged amino acid produced better antibacterial activity compared to lysine. Having positively charged amino acids at both ends created better activity to *E. coli* (MIC 2.0 µg/ml) compared to *Staphylococcus aureus* (MIC 16.0 µg/ml). Having positively charged amino-acid only at one end created equal activity to both of these organisms (MIC 4.0 µg/ml). The positioning of arginines on one side of the molecule in a zig-zag form

increased the activity prominently compared to positioning on an almost linear axis. Increasing the number of hydrophobic amino acids from 3 to 6 at one end resulted to self-binding and eliminated completely the antibacterial activity of the peptide. Molecular dynamic simulations suggested that asymmetric positioning of hydrophobic and positively charged amino acids buries the hydrophobic part into the lipid bilayer of the membranes and positively charged parts fix it to the negatively charged phosphate groups of phospholipids on both sides of the lipid bilayer. Thus, a single molecule is able to create hydrophilic channel, which results the leak of water and hydrophilic molecules. Electron microscopic examination of staphylococci treated with these peptides revealed that the bacteria split into almost two equal halves from the middle where active cell wall synthesis occur. Additionally, docking studies revealed that there was strong binding of the peptides to major peptidoglycan synthesizing enzyme protein, transglycosylase, indicating that they may also be inhibiting the cell wall synthesis. All peptides were susceptible to proteinase K. Development of their synthetic similar derivatives resistant to proteases, will increase their clinical usefulness. Once their safety is proven, these peptides may be promising drugs against organisms resistant to other antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptides, Peptide antibiotics, Cathelicidin, Antimicrobial activity, Molecular modelling

1.1 Literatür Özeti

Günümüzde artan antibiyotik kullanımı ve mikroorganizmaların bu ilaçlara geliştirdikleri direnç birçok araştırmacıyı daha etkili antimikrobiyal maddelerin bulunması için çeşitli çalışmalara yönlendirmiştir. Son dönemlerde yapılan araştırmalar hemen hemen tüm canlılarda bulunan ve antimikrobiyal etkiye sahip peptitlerin odak noktası haline gelmesini sağlamıştır. Farklı canlılardan elde edilen antimikrobiyal peptitler (AMP) birçok mikroorganizma üzerinde denenmiş ve sonuçlar oldukça umut verici bulunmuştur. AMP'ler böceklerden insanlara kadar geniş bir canlı kitlesinde hücre aracılı bağışıklık sisteminin bir parçası olan korunmuş doğal yapıda geniş spektrumlu antimikrobiyal özellikte maddelerdir[1]. Çoğu antimikrobiyal peptid (AMP) hayvanlarda ve insanlarda nötrofillerde ve makrofaj granüllerinde depolanır [2].

Antimikrobiyal peptitlerin en önemli ortak özelliklerinden biri, patolojik mikroorganizmaların zarlarına penetrasyon yapmak için gerekli olan amfofilik özelliğe sahip olmalarıdır. Bu özelliğe ek olarak bakteri hücre zarında bulunan negatif yüklü gruplar AMP'lerin pozitif yüklü amfipatik grupları ile elektrostatik etkileşime de girmektedir. AMP'lerin yapısında bulunan hidrofilik bölge, peptidin patojen mikroorganizmaya ait hücre zarı içerisinde dik bir şekilde hizalanmasına yardımcı olmaktadır [3], [4]. Gram negatif bakterilerin dış zarına giren AMP'ler sırasıyla peptidoglikan tabakasını ve iç zarı geçerek bakteri hücresinin sitoplazmasına girebilirler [5].

konsantrasyonlarda miselizasyon oluşturarak zarın yapısını bozabilir ya da alternatif olarak, zarda gözenekler oluşturmak için dikey bir konum alabilir [26], [27].

İnsanlarda ve farelerde sadece HCAP18 ve Katelisidinle İlişkili Antimikrobiyal Protein (CRAMP) olarak adlandırılan peptitler üretilirken, diğ r türlerde bunlardan farklı olarak birden fazla katelisidin peptiti üretebilmektedir [28], [29].

Bu  alışmada, AMP'lerin filogenetik olarak korunan amino asit dizileri ele alınarak, katelisidin LL-37 benzeri sarmal peptitler tasarlamaya çalıştık. Özellikle doğada bulunan AMP'lere kıyasla daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterebilecek yapıları geliştirmeye çalışarak, yaptığımız çalışmalar doğrultusunda bakteriyel direnç gelişimini engelleyecek ya da geciktirecek ve tedavinin etkisini hızlandıracak umut verici moleküller tasarladık.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, insanlarda bulunan katelisidin LL-37 antimikrobiyal peptidine benzer yapıda, antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek, toksisitesi daha düşük, hücre zarını hedefleyen peptit yapıda moleküllerin geliştirilmesidir.

Bu amaca ulaşmak için, aşağıdaki alt amaçları hedefleyen çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

- ❖ İnsanlarda bulunan AMP'lerin amino asit dizileri incelenmiş ve ortak bölgeler bulunmuştur.
- ❖ En iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinen katelisidin LL-37'nin tahmini üç boyutlu yapısı protein üç boyutlu yapısını  ng ren program ile belirlenmiştir.
- ❖ Katelisidin LL-37'nin alfa sarmal yapısına ve amino asit dizilimine benzer peptitler tasarlanmış ve protein üç boyutlu yapısını  ng ren program ile olası üç boyutlu yapıları incelenmiştir.
- ❖ Yapısal bakımdan benzerlik gösteren yedi adet molek l seçilmiş, moleküler modellemeleri yapılmış ve hizmet alımı ile sentetik olarak sentezlettirilmiştir.
- ❖ Tasarlanan ve TN (kısaltması bu çalışmaya katkı sağlayan Tanıl ve araştırmacı Nihan'ın baş harflerinden üretilmiştir) olarak adlandırılan AMP'lerin antimikrobiyal aktivite deneyleri ve sitotoksisite deneyleri yapılmıştır.

❖ TN AMP'lerin bakteri hücresi üzerine olan etkisi farklı mikroskopik yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

1.3 Hipotez

❖ Daha önce yapılan çalışmalarda AMP'lerin günümüzde kullanılan birçok antibiyotikten daha düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerine etkili olması,

❖ Birçok canlıda AMP'lerin bulunması ve amino asit dizilerinde birbirleriyle benzer korunmuş bölgelere sahip olması,

❖ AMP'lere benzer peptit yapıda tasarlanan sentetik türevlerin daha iyi antimikrobiyal etki gösterme potansiyelinin olması,

❖ Moleküler modelleme yöntemleri kullanarak tasarlanan AMP'lerin antimikrobiyal etkisinin olup olmayacağının anlaşılabilir olması,

❖ Diğer antibiyotiklerde kullanım sonrasında oluşan bakteriyel direnç AMP'lerde engel olma ya da geciktirme olasılığının olması,

varsayımlarından yola çıkarak doğal peptit antibiyotiklere benzer, antimikrobiyal aktivitesi yüksek, insan hücresine toksisitesi düşük AMP'lerin geliştirilebileceği hipotezi kurulmuştur. Bu hipotezin gerçekleştirilmesi dirençli mikroorganizmalarla ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

Antimikrobiyal direnç (AMD), bakteriler, parazitler, virüsler ve mantarların neden olduğu ve günümüzde sürekli artan enfeksiyonların tedavisini tehdit eden önemli bir sorundur. Antimikrobiyal direnç, tüm devlet ve topluluklar arasında küresel halk sağlığı için giderek önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Dirençli enfeksiyonlara sahip hastalar için sağlık bakımının maliyeti, hastalık süresinin ve tedavisinin uzun olması, ek testler ve daha pahalı ilaçların kullanılması nedeniyle tedavi için yüksek maliyet gerektirmektedir. Günümüzde hemen hemen her ülkede antibiyotik direnci bulunmaktadır. İlaçlara dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara sahip hastalar, aynı bakterilerin dirençli olmayan suşları ile enfekte hastalara göre daha kötü klinik sonuç ve ölüm riski altındadırlar ve daha fazla sağlık bakım kaynağı tüketirler.

Günümüzde birçok insanda oldukça sık görülen enfeksiyonlardan biri, idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Bu enfeksiyona genellikle gram negatif bir bakteri olan *E. coli* bakterisi sebep olmaktadır. Tedavisi için en yaygın kullanılan ilaçlardan olan fluorokinolon antibiyotiklere, *E. coli* suşlarında direnç çok yaygındır ve dünyanın pek çok yerinde hastaların yarısından çoğunda tedavi için kullanılan bu ilacın etkisiz olduğu bilinmektedir. Bir diğer sıkıntı toplumda ciddi enfeksiyonların ortak bir nedeni olan *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için birinci basamak ilaçlara karşı direnci oldukça yaygındır. MRSA (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*) ile enfekte kişiler, metisiline dirençli olmayan türle enfekte kişilere göre %64 oranında ciddi hayati tehlike taşımaktadırlar.

Mikroorganizmalar (bakteri, mantar, virüs ve parazitler gibi) uzun süre antimikrobiyal ilaçlara maruz kaldıklarında antimikrobiyallere (antibiyotikler, antifungallar, antiviral ilaçlar, antimalaryal ilaçlar ve antihelmintikler) antimikrobiyallere karşı direnç geliştirirler. Sonuç olarak, ilaçlar etkisiz hale gelir ve vücutta enfeksiyonlar devam eder ve başkalarına bulaşma riski artar. Antimikrobiyallere dirençli mikroorganizmalar insanlar, hayvanlar, gıda ve çevre (su, toprak ve hava) içinde de yaygın olarak bulunurlar, insanlarla hayvanlar arasında ve kişiden kişiye geçebilirler. Bununla birlikte zayıf enfeksiyon kontrolü, yetersiz sağlık koşulları ve uygunsuz gıda işleme, antimikrobiyal direncin yayılmasını arttıran etkenlerdir.

Antimikrobiyal direnç doğal olarak genetik değişikliklerle birlikte zamanla oluşur. Bununla birlikte, antimikrobiyallerin yanlış kullanımı ve aşırı kullanımı da bu değişimi hızlandırmaktadır. Birçok durumda, antibiyotiklerin insanlara ve hayvanlara aşırı kullandırılması, antibiyotiklerin kötü kullanılması ve genellikle profesyonel gözetimi altında verilmemesi antibiyotiklere karşı direnç oluşmasını etkileyen önemli unsurlar arasında yer almaktadır. Kötüye kullanım örnekleri arasında, soğuk algınlığı ve grip gibi viral enfeksiyonlara sahip insanlar tarafından antibiyotiklerin alınması bulunmaktadır. Bu gibi kullanımlar sonucunda yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmakta ve yaygınlaşmaktadır. Bu durum antibiyotiklerin bulaşıcı hastalıkları tedavi etme yeteneğini tehdit ederek uzun süreli hastalıkların, sakatlık ve ölümle sonuçlanmasına neden olmaktadır.

Enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için etkili antimikrobiyallere karşı direnç sonucunda, organ transplantasyonu, kanser kemoterapisi, diyabetli hasta bakımı ve büyük cerrahi müdahaleler (örneğin, sezaryen veya kalça ekleminin değiştirilmesi) gibi tıbbi uygulamalar kişiler için çok yüksek bir risk oluşturmaktadır. Antimikrobiyal direnç, hastanelerde daha uzun konaklamalar ve yoğun bakım gereksinimi ile sağlık bakım masraflarını arttırmaktadır. Tüm bunlar değerlendirildiğinde antimikrobiyal direnç, dünya kalkınma hedeflerinin kazanımlarını ve sürdürülebilirliğini riske atmaktadır.

Antimikrobiyal direnç, toplumun tamamını etkileyen ve birbiriyle bağlantılı pek çok faktör tarafından yönlendirilen karmaşık bir sorundur. Antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasını ve yayılmasını en aza indirmek için koordineli eylemler gereklidir. Tüm

Ülkelerin AMD ile ilgili ulusal planlar yapması, özellikle bu planlar arasında yeni antimikrobiyal ilaçlar ve aşıların geliştirilmesi için araştırmacılara ve firmalara projeler için daha fazla teşvik ve yatırım yapılması gerekmektedir [2].

2.1 Antibiyotiklerin Etki ve Direnç Mekanizması

Antibiyotikleri de içeren antimikrobiyaller, enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlardır [3]. Antibiyotik terimi teknik olarak özel mikroorganizmaların fermantasyonunun doğal ürünleri için kullanılır. Fermantasyon sırasında organizmalar antibiyotik üretir, bu bir ilaç olarak kullanılmak üzere saflaştırılabilir. Antimikrobiyaller sadece antibiyotik değil aynı zamanda sentetik olarak oluşan bileşikleri de içerir [4]. Antibiyotikler, tıbbi bakım hizmetlerinde yaygın ve tedavi edilemeyen hastalıklarda morbidite ve mortaliteyi azaltmada önemli bir role sahiptir. Antibiyotikler sayesinde sepsis ile sonuçlanabilecek ameliyat ve diğer tıbbi müdahaleler daha güvenli olarak yapılabilmektedir [3], [5]. Bununla birlikte, klinik bakımdan önemli bazı bakteri türlerinde gelişen ve yaygınlaşan direnç mekanizmaları antibiyotiklerin etkinliğini sınırlamakta ve ciddi bir halk sağlığı sorunu yaratmaktadır[3].

2.1.1 Antibiyotikler ve Seçici Toksisite

Antibiyotikler, prokaryotik hücreler olarak da bilinen bakteri hücrelerine karşı etkilidir. Bakteri hücreleri yapısal olarak daha basittir ve insan ökaryotik hücrelerinden çok daha küçüktür [6], [7]. Antibiyotiklerin kullanılması prokaryotik ve ökaryotik hücreler arasındaki hücre yapısındaki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır [5]; bu, seçici toksisite olarak bilinir [8]. Seçicilik, ilacın, konak hücrelerini ciddi bir şekilde etkilemeden bakterilerdeki temel biyokimyasal olayları engelleme prensibine dayanmaktadır [9].

Bakteri hücrelerinin büyük çoğunluğu hücre zarı ve bunu çevreleyen ve koruyan bir hücre duvarına sahiptir [7]. Hücre duvarını oluşturan peptidoglikan, birçok bakteri hücresinin duvarlarının temel bileşenlerinden biridir, hücreye yapı ve dayanıklılık sağlar. Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilerden daha fazla peptidoglikan içeren hücre duvarlarına sahiptir [8]. Gram-negatif bakterilerin ise gram pozitif bakterilerden farklı olarak yağ tabakadan oluşan dış zarlara vardır, bu zar birçok antibiyotiğin bakteri hücresinin içine girişini zorlaştırır [5], [9].

Bakterisidal ya da bakteriyostatik etki; Bakteriyel kültürler ya oksijen varlığında veya yokluğunda ortaya çıkabilir (bakterisidal, antibiyotiklerin bakterileri doğrudan öldürmeye yönelik etkisi; bakteriyostatik, bakterilerin üremesini yavaşlatmaya yönelik etkisi) [5]. Bu farklılıklar tepki açısından genellikle anlamlı değildir [8]. Bununla birlikte, bakterisidal veya bakteriyostatik ajanların seçilmesinde önemli olan, tedavi sırasında farklı bir enfeksiyonun oluşma riskinde göz önünde bulundurulmasıdır [10].

Antibakteriyal spektrum; Antibiyotikler referans aralıklarına göre genellikle 'geniş spektrumlu' ve 'dar spektrumlu' antibiyotikler şeklinde sınıflandırılırlar. Spektrum ne kadar geniş olursa, antibiyotiğin etki gösterdiği bakteri türü sayısı daha fazla olur. Genel olarak, geniş spektrumlu antibiyotikler, hem Gram pozitif hem de Gram negatif organizmalara etkilidirler [8].

Bakteride çok çeşitli etkilere sahip temel antibiyotik sınıfları vardır. Antibakteriyel ilaçlar ve bu ilaçlar tarafından kullanılan dört temel etki mekanizması ve bakterideki hedef bölgeler Çizelge 2. 1’ de özetlenmiştir [11]. Bunların tamamı seçici toksisite kavramına dayanmaktadır ve inhibisyon içerirler.

Çizelge 2. 1 Temel antibiyotik sınıfları ve bakteri hücresindeki hedefleri [11].

Örnek Antibiyotikler	Hedef
Hücre Duvarı -Beta-laktamlar (penisilin, karbapenem) -Glikopeptitler (vankomisin)	Transpeptidazlar Peptidoglikan ve Yağ II'deki D-ala-D-ala terminal dipeptidi
Protein Sentezi -Makrolidler (eritromisin) -Tetrasiklinler (tetrasiklin) -Aminoglikozidler (gentamisin, amikasin)	Ribozomal peptidil transferaz 30S alt ünite 30S alt ünite

Çizelge 2. 1 Temel antibiyotik sınıfları ve bakteri hücreesindeki hedefleri [11]
(devamı)

-Oksazolidinonlar (linezolid)	Başlangıç kompleksi oluşumu
Nükleik asit Replikasyonu/Tamiri	
-Kinolonlar, florokinolonlar	DNA giraz
-Rifampin	RNA polimeraz
Diğer	
-Peptit antibiyotikler (polimiksin)	Hücre zarı
-Lipoglikopeptit (daptomisin)	Hücre zarı
-Sulfonamidler	Folik asit sentezi
-Trimetoprim	Folik asit sentezi

2.1.1.1 Bakteri Hücre Duvar Sentezi İnhibisyonu

Prokaryotik hücrelerin aksine, insan hücreleri hücre duvarı içermezler. Tedavi insan hücrelerini hedeflemediğinden, bu sebeple bakteri hücre duvarı antibiyotik tedavisi için ideal bir hedef oluşturur [8].

Penisilinler ve sefalosporinler (beta-laktam antibiyotik) peptidoglikan sentezini inhibe eden antibiyotik örnekleridir. Bu antibiyotikler bakteri hücrelerine girer ve penisilin bağlayıcı proteinler olarak bilinen enzimlere bağlanır. Sonuçta şişen ve patlayan zayıf veya deforme bir hücre duvarı oluşur [12]. Bu şekilde hücreleri yok eden ilaçlar, bakterisidal bir etkiye sahiptir [13].

2.1.1.2 Bakteri DNA Sentez İnhibisyonu

DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi, yeni bakteri hücrelerinin üretimi için gereklidir ve bazı antibiyotikler, DNA sentezini inhibe ederek çalışırlar. Bu antibiyotikler genelde bakterisidal etki gösterirler. Kinolonlar (örneğin siprofloksasin) bu etki mekanizmasına sahip ilaçlardır. Tüm canlı hücrelerde olduğu gibi insan hücrelerinde de DNA sentezlemeye gereksinim duymaktadır. Bu nedenle DNA sentezini inhibe eden ilaçların seçici toksisite

göstermesi gerekmektedir [8]. Kinolonlar bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan DNA giraz ve topoizomerez IV'ün etkisini inhibe ederek etki ederler. Bu enzimlere afinitesi insan topoizomerezlarına kıyasla çok daha yüksektir [12].

2.1.1.3 Bakteri Protein Sentez İnhibisyonu

Bilindiği gibi hem insan hem de bakteri hücrelerinde protein sentezi ribozomda gerçekleşir [5]. Bakteriyel ribozomlar insanlarda bulunan ribozomlara göre daha küçüktür her ne kadar işlevleri aynı olsa da yapılarında farklılıklar vardır. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler bakteriyel ribozomlara insan ribozomlarından çok daha büyük bir afinite gösterirler. Bu da protein sentezini inhibe eden antibiyotikler için seçicilik yaratır [9]. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler, aminoglikozitleri, tetrasiklinleri ve makrolidleri içerir [8].

Aminoglikozitler (gentamisin gibi) bakterisidal olup, mesajcı RNA üzerinde kodun yanlış okunmasına neden olur. Bu da, proteinlerin işlevinin bozulmasına yol açar. Tetrasiklinler (tetrasiklin gibi), amino asitleri taşıyan, taşıyıcı RNA olarak bilinen molekülün ribozoma bağlanmasını bloke ederek protein sentezini engeller. Makrolidler (eritromisin gibi) ribozomal alt birimlerin birine bağlanır ve ribozomların işlev görmesini engelleyerek etki ederler [14].

2.1.1.4 Folat sentez inhibisyonu

Folat, DNA sentezi için çok önemlidir [8]. Besinlerden folat elde eden memelilerin aksine, bakteriler folatı kendileri üretir. Folat sentezini inhibe eden önemli antibiyotikler sülfonamidleri (sülfadiazin gibi) içerir [5], [8]. Sülfonamidler bakteriyostatik etki göstermektedirler [14].

2.1.2 Antibiyotik Direnci

Bakteriler, antibiyotiklere direnç kazanma ve geliştirme özelliklerine sahiptir. Bazıları antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir, duyarlı olanlar ise mutasyon yoluyla direnç geliştirebilir ya da farklı suşlardan direnç kodlayan genetik madde alarak direnç geliştirirler [14]. Bakteriler, yeni bir antibiyotikle ilk kez karşılaştığında genelde büyük bir çoğunluğu antibiyotiğe duyarlıdır ve milyarlarca hücreden sadece birkaçı canlı

kalabilir. Canlı kalanların direnci rasgele mutasyonlardan kaynaklanır. Bu genetik değişiklik bakteriler arasında hem yayılabilir hem de gelecek nesillere aktarılabilir. Bakteriler çok hızlı çoğaldıklarından bakteri topluluğunun antibiyotiğe dirençli hale gelmesi de kısa sürer [7]. İlaça karşı direnç plazmitler veya DNA'nın küçük parçaları tarafından da taşınabilir. Bakterilerin birkaç farklı sınıftaki antibiyotiğe dayanıklı olması potansiyel çoklu ilaç direncinin gelişmesi ve yayılması için endişe kaynağı oluşturmaktadır. Gram pozitif bir bakteri olan MRSA ve gram negatif bir bakteri olan ve vankomisine dirençli *E. coli* bakterileri buna birer örnektir [14].

2.1.2.1 Antibiyotik direnç mekanizması

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilecekleri başlıca mekanizmalar şunlardır:

- Antibiyotik bakteri tarafından bir enzimin üretilmesi ile yok edilebilir veya inaktive edilebilir. Bu direnç mekanizması özellikle penisilinleri ve sefalosporiler için geçerlidir [7].
- Antibiyotiklerin tanıyıp bağlanabildiği hedef moleküller mutasyonla değişikliğe uğratılabilir, böylece antibiyotik hedef bölgeyi tanıyamadığı için aktivite gösteremez. Örneğin, beta-laktam antibiyotikleri için reseptör bölge olan penisilin bağlayıcı proteinlerin değişmesi veya yokluğu ilaç direncine neden olabilmektedir [5], [10].
- Bakteriyel hücre duvarı modifiye edilerek antibiyotiğin hedef bölgeye bağlanması engellenebilir, bu da ilacın antimikrobiyal etkisini önler. Örneğin, bazı enterokoklar bu şekilde vankomisine direnç geliştirmiştir [5].
- Hücrenin duvarındaki proteinlerin antibiyotiği dışarı pompalaması sonucunda antibiyotik, yeterli hücre içi konsantrasyona ulaşamaz ve antimikrobiyal etkinlik gösteremez. Kinolonlara karşı direncin bir kısmının dışarı pompalama ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir [5].

2.2 Antimikrobiyal Peptidler

Bakterilerden insanlara kadar doğada bulunan tüm canlılarda, mikroorganizmaların kendi ortamlarında çoğalmasını engellemek veya zararlı aktivitelerini inhibe etmek için, doğal bağışıklık sisteminde rol oynayan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip peptitler bulunmaktadır [15]. İlginç olan antimikrobiyal peptitlerin yapısal açıdan basit, fakat işlevsel açıdan oldukça karmaşık moleküller olmalarıdır [16].

Antimikrobiyal peptitlerin çoğunluğu net bir katyonik yüke sahiptir. Katyonik peptitler genellikle yapılarına bağlı olarak dört gruba ayrılır; 1. grup, peptit zincirinin β -tabakalı yapılar içermesi ile karakterize edilir, 2. grup, uygun ortamda amfipatik alfa-sarmal oluşturabilen uzantılı yapılar içerir, 3. grup uzamış peptit zincirleri içerir ve 4. grup ise halkasal yapının tek bir disülfid bağı [17] oluşturmasıyla meydana gelir.

Antimikrobiyal peptitlerdeki bu yapısal çeşitlilik için dört olası neden öne sürülmüştür: (a) peptitlerin, bulundukları türlerin karşılaşılabileceği tüm patojenleri kapsayan bir antimikrobiyal spektruma sahip olmamaları; (b) farklı yapıdaki peptitlerin, patojen mikroorganizmaları önlemek veya öldürmek için birbirleri ile sinerji oluşturma olasılığı; (c) antimikrobiyal olmayan fonksiyonların bir peptitten diğer peptite değişiklik gösteriyor olması (memelilerde gösterilen kemotaktik ve proinflamatuvar aktiviteler gibi birbirlerinin tamamlayıcısı olabilirler); (d) Metazoolarda bulunan farklı dokular, belirli bir türe sahip olan toplam birikimin bir alt kümesini ifade etme eğilimindedir; bunun da dokunun patojen istilasına duyarlılığı veya peptitlerin antimikrobiyal olmayan işlevleri için dokular arasındaki farklı gereksinimlere bağlı olmasından kaynaklanabilirliği [18].

Geçmişten günümüze kadar incelenen tüm organizmalarda antimikrobiyal peptitler, genomdaki proteine dönüşen bölge tarafından kodlanan daha uzun öncül peptit dizilerinden oluşmuştur. Öncül diziler, aktif peptit yapısını oluşturmak üzere N-terminal bölgeden proteolitik olarak ayrılmaktadırlar. Biyolojik sistemlerin çoğunda, öncül peptit N-terminal bölge öncesinde bir sinyal dizisine sahiptir. Sinyal dizisi, hem hücre zarını hedeflemeyi sağlar hem de antimikrobiyal peptiti oluşturmak için postranslasyonel modifikasyonlardan sorumludur. Memelilerde, antimikrobiyal peptitler lokalize kromozomal bölgelerde homolog gen aileleri olarak ortaya çıkan

genler tarafından ifade edilirler [19]. AMP'lerin evrenselliği, oldukça fazla organizmalarda tanımlanması ve günümüze kadar korunmuş olması ile kanıtlanmaktadır. Antimikrobiyal Peptit Veritabanı'na (APD) göre 2,300'den fazla peptit izole edilmiş ve karakterize edilmiştir [20]. Nisan 2014 itibarıyla, bakterilerden (yani bakteriyosinler) 6'sı, mantardan 12'si, bitkilerden 306'sı ve hayvanlardan gelen 1.801 tane konak savunma peptitinden 233 tanesi AMP'tir. AMP'ler, genler tarafından kodlanır, işgalci patojenlere karşı hücreyi savunmak için üretilirler. AMP'lerin çoğu katyonik özelliktedir, bu durum, negatif yüklü bakteri yüzeyini hedeflemek için oldukça idealdir [21].

Ayrıca antimikrobiyal peptitler, canlılarda bazı özel bölgelerde daha yüksek derişimde bulunurlar. Örneğin bazı amfibilerin epitel tabakalarında, antimikrobiyal peptitlerin bölgesel sentezi ve salınması için özel yapılar vardır. Amfibi derisindeki bu yapılar granüler bezler olarak adlandırılır ve hem dışsal hem de sistemik uyarılara yanıt verirler. Özellikle derinin yaralanması gibi durumlarda, o bölgeye yakın yerdeki salgı bezleri, içerdikleri bağışıklık sistemi hücrelerinden antimikrobiyal peptitler salgılanır. Granüler bezlere benzer yapılar amfibilerin sindirim kanallarında da görülmektedir. Epitel hücreleri, peptitlerini hücre dışı luminal boşluğa gönderirken, fagositik hücreler patojenlere karşı savaşır ve antimikrobiyal maddeleri içeren granülleri fago-lizozoma ulaştırırlar [22].

2.2.1 Antimikrobiyal Peptitlerin Etkisi

Peptitlerin patojenlere zarar verme mekanizmaları hala kesin olarak bilinmemektedir. Antimikrobiyal peptitler genellikle katyoniktir ve amfipatik α -sarmal yapıları sayesinde hücre zarının çift yağ tabakasına etki ederler. Bununla birlikte, antimikrobiyal etki için peptitin amfipatik özellikte ve α -sarmal yapıda olması şart değildir. Çok sayıda güçlü antimikrobiyal etkiye sahip β -tabakalı peptitler de bulunmaktadır. Yapısal olarak benzer olan bazı peptitlerin yapay ve biyolojik zarlar üzerine etkisi çalışılmış ve bakterileri öldürmek için minimal inhibitör konsantrasyonu ile zar depolarizasyonu arasında bir ilinti bulunmadığı belirtilmiştir [23].

Genel olarak, AMP'ler için iki fiziksel özellik bulunur: Katyonik bir yük ve hidrofobik bir kısım. Bu durum negatif yüklü mikrobiyal zarlar için seçiciliği arttırırken, yağ açıl

zincirleri ile etkileşimleri de kolaylaştırır [24]. Katyonik antimikrobiyal peptitlerin yanı sıra, dermisidin gibi anyonik yapıda AMP'lerde vardır [25]. AMP'ler genelde bakteriyel sitoplazmik zarın bütünlüğünü birçok yönden bozarak antimikrobiyal etki gösterirler (Şekil 2. 1); bunlar, DNA ve protein sentezi, protein katlanması, enzimatik aktivite ve hücre duvarı sentezi gibi hücresel işlevleri hedefleyen diğer antimikrobiyal mekanizmalar ile karakterize edilmiştir [24] [26]. AMP'ler tarafından kullanılan etki mekanizmalarının kapsamlı bir listesi Çizelge 2. 2'de sunulmaktadır. Bu mekanizmalar dışında AMP'lerin katyonik özelliği, dış zar yağları, nükleik asitler ve fosforile proteinler gibi diğer biyomoleküllerde ki negatif yüklü parçalar ile olan etkileşimleri de tetiklediği düşünülmektedir [27].

Çizelge 2. 2 AMP'lerin tanımlanan farklı etki şekilleri

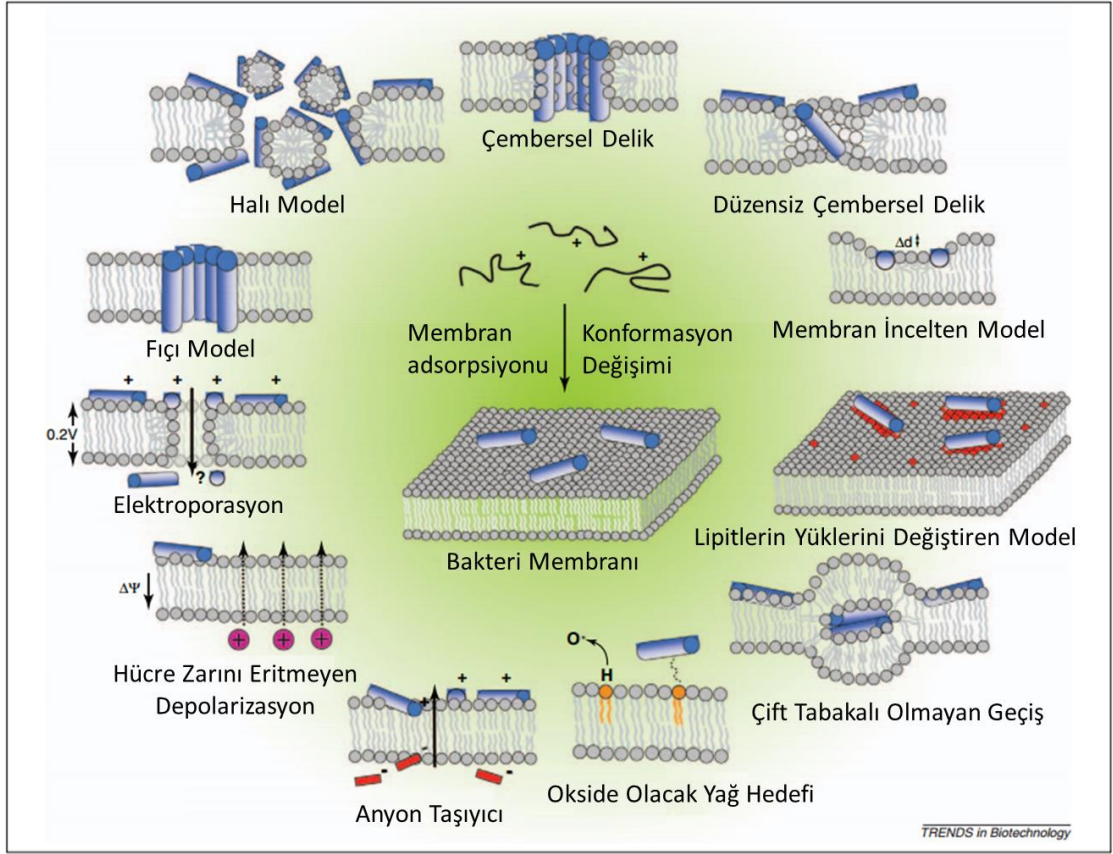
ANA HEDEF	ÖZELLEŞMİŞ HEDEF ve ETKİ	ÖRNEK PEPTİTLER
Dış Proteinler	Otolizin aktivasyonu	Pep5, Nisin
	Fosfolipaz A2 aktivasyonu	Magainin 2, İndolisidin
Dış Yüzey Yağları	LPS geçirgenliğinde artış (Gram negatif)	Sesropin P1
	Yağ II (peptidoglikan öncülü)	Defensin, Nisin ve Diğer Lantibiyotikler
Dış Zar Proteinleri (Gram-Negatif)	Dış zar proteini I (OprI)	SMAP-29, CAP-18
	LPS ekli protein D inhibisyonu	Protegrin I Peptidomimetik Analog
	Dış zar protein F (OmpF)	HP(2-20) analog

Çizelge 2. 2 AMP'lerin tanımlanan farklı etki şekilleri (devamı)

İç Zar	Fıçı model deliği	Alametisin
	Deterjan miselizasyonu	Dermaseptin, sesropin
	Çembersel delik	Magainin 2, melittin protegrin I
	Düzensiz çembersel delik	Magainin Analog, melittin
	Zar incelmesini sağlayan model	PGLa, LL-37
	Yüklü yağ molekülü gruplaşması	Magainin Analogları, Arg'den Zengin Proteinler
	Çift tabakalı olmayan geçiş	Gramisidin S
	Okside olacak yağ hedefi	Temporin L, İndolisidin
	Anyon taşıyıcı	İndolisidin
	Hücre zarını eritmeyen depolarizasyon	Sığır laktoferrisin ve Daptomisin
	Elektroporasyon	NK-lizin
İntegral Zar Proteinleri	Proton translokasyonu ile ilişkili protein	Klavanin A

Çizelge 2. 2 AMP'lerin tanımlanan farklı etki şekilleri (devamı)

Nükleik Asitler	DNA (Genel)	Buforin 2, takiplesin, İndolisidin
	DNA (Kovalent Etkileşimler)	İndolisidin
	Yapısı bozulmuş DNA	WRWYCR
	RNA (Genel)	Buforin 2
İntraselüler Proteinler	DnaK inhibasyonu	Pirrhosorisin, drososin, apidaesin
	20S proteazom, SH-3 Bulunduran Proteinler	PR-39



Şekil 2. 1 Antimikrobiyal peptit (AMP) adsorpsiyonundan sonra bakteri sitoplazmik zarında meydana gelen olaylar.

2.2.2 Antimikrobiyal Peptitlerin Modifikasyonu

Modifikasyon, peptit yapısını oluşturan amino asitler üzerinde ortaya çıkan kimyasal değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadır.

Ökaryotik hücre peptitlerinin primer amino asit dizisinde büyük ölçüde disülfid bağlarından oluşan basit modifikasyonların olduğu bilinmektedir. Memeli defensinlerinin α ve β -gruplarına sınıflandırmasını sistein bağlarındaki modifikasyonlar belirler [28].

Eklembacaklılarda modifikasyon disülfid bağlarından oluşan antimikrobiyal peptitleri dört sınıfa ayırır: C terminal yanında (a) bir disülfid köprüsü bulunan (b) iki disülfid köprüsü bulunan (akrepten elde edilen bir peptit olan androctonin); (c) üç disülfid köprüsü bulunan (böcek defensinleri); (d) dört disülfid köprüsü bulunan antimikrobiyal peptitler (*Drosophila* peptiti olan drosomisin) [29].

Amfibilerde, bir disülfid köprüsüne sahip olan tek çeşit antimikrobiyal peptit bulunur. Bazı doğrusal yapıdaki amfibik peptitler, postranslasyonel modifikasyon ürünü olan D-amino asitlere sahiptirler [22].

Prokaryotlarda ise antimikrobiyal peptitlerin bazı sınıflarında çok daha geniş kapsamlı modifikasyonlar olduğu belirtilmektedir. Bakterilerde bulunan antimikrobiyal peptitlerden sınıf I bakteriyosinler, sadece intramoleküler tiyoeter bağları değil, aynı zamanda proteinlerde bulunmayan bir dizi modifiye amino asitte içermektedirler [30]. Sınıf II bakteriyosinler ise modifiye amino asitler yerine disülfid köprüleri (örneğin pediosin grubu) içermektedirler [31].

Antimikrobiyal peptitlerin çoğunda öncül peptit yapısı, zar sistemini hedefleyen N-terminal lider dizisi ile sentezlenmektedir [16].

2.2.3 Hücrelerin Antimikrobiyal Peptitlerin Etkisinden Kendisini Koruması

Antimikrobiyal peptit üreten ökaryotik hücrelerin hücre zarları, bakteri hücre zarından farklı yağ bileşimine sahip olduğundan hücre zarını hedef alan antimikrobiyal peptitlerden bu farklılık sayesinde korunmuş olur. Bakteri hücre zarlarının dış tarafında anyonik gruplar bulunurken ökaryotik hücre zarında ise anyonik gruplar sitoplazma tarafında bulunur. AMP'lerin, katyonik yapıları sayesinde, duyarlı mikrobiyal hücre zarının anyonik yüzüne pozitif yüklü amino asitlerin tutunması yoluyla etkinlik gösterdikleri bilinmektedir.

Peptitlerin ökaryotik hücre zarını hedef alamamasındaki bir diğer neden ise peptitin işlenmemiş öncül formunun, proteolitik olarak kaldırılana kadar, peptitin katyonik gruplarının kapatılmış olmasıdır. Peptitlerin, inaktif öncül formlarda nötrofil granüllerinde depolanmasının da korunma için ek bir mekanizma olduğu düşünülmektedir [15] [18] [19].

Antimikrobiyal peptit üreten bakteriler kendi peptitlerine dirençli sitoplazmik zarlara sahip olduklarından, ökaryotlardaki gibi korunma mekanizmalarına gereksinimleri yoktur [30] [31]. Bakterilerdeki bu mekanizma, tamamen farklı işlev gören bir ya da iki bileşene sahiptir. Bunlardan birincisi, peptitin normal zar yapısını ve işlevini bozma yeteneğine müdahale ederek işlev gördüğü düşünülen fakat mekanizması tam olarak

kesin olmasa da bir yağ modifikasyonu ile hücre zarına bağlanarak peptitin etkisini inhibe eden bir bağışıklık proteindir. İkinci bağışıklık bileşeni ise dışa doğru yönlendirilmiş bir ABC taşıyıcı sistemidir ve ortamdan bağlanma sonrasında sitoplazmik zardan peptiti hızlı bir şekilde dışarıya çıkarır ve böylece peptitin zar içinde birikmesini önlemiş olur [16].

2.2.4 Antimikrobiyal Peptitlerin Tıp ve Halk Sağlığı İçin Önemi

Peptit antibiyotikler ile mikrobiyal kökenli hastalıklara karşı tedavi geliştirmek için, tek tek antimikrobiyal peptitlerin bağışıklık sisteminde ki işlevleri hakkında bilgi elde etmek oldukça önemlidir. Bunu yapmak için, hem akut hem de kronik inflamatuvar süreçlerde bu moleküllerin işlevleri hakkında daha fazla bilgi edinmek gerekmektedir. Zor da olsa tedavi olasılıklarından biri, bağışıklık sisteminde bulunan peptitleri veya peptit gruplarının salınımını uyaracak ilaçları geliştirmek olabilir [19]. Genel bir problem olan antibiyotik direnciyle baş etmeye yönelik yaklaşımlar sonucunda elde edilen bilgiler, yeni antimikrobiyal peptitlerin antibiyotik olarak kullanıma sokulmasının önemli olduğunu göstermektedir [32]. Bununla birlikte araştırmacılar, bazı peptitlere karşı bakteri direncinin kronik enfeksiyonlu hastalarda (örneğin, kistik fibroz) ortaya çıkabileceği konusunda da uyarıda bulunmaktadır. Antimikrobiyal peptitler, omurgalı ve omurgasız türlerdeki bağışık yanıtın doğal kolunun büyük bir bölümünü oluştururlar. İnsanlarda, bu peptitler, antimikrobiyal proteinler, kompleman yolları ve hidrojen peroksit gibi küçük bakterisidal moleküller ile birlikte patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır [16].

Araştırmalar sonucunda lokalize enfeksiyonların tedavisinde deri ve mukoza yüzeyinde AMP'lerin kullanılması olası bir başlangıç olarak görülmektedir. Genomik çalışmaların, özellikle enfeksiyona karşı kronik duyarlılığın görüldüğü antimikrobiyal peptitlerin işlevsel düzeylerini belirleme yeteneğini artırabileceği düşünülmektedir. İlgili genlerin incelenmesi ile peptit üretme yeteneğinin kaybedildiği değişiklikler belirlenebilir ve bu genler dışarıdan sağlanabilir. Özellikle vektör kaynaklı hastalıklar, gelişmekte olan ülkelerin geçmişten günümüze önemli bir sağlık sorunu olmuştur. Özellikle ekonomik açıdan gelişmiş toplumlarda insan ve hayvan sağlığı için önemli bir tehdit olarak

tanımlanan vektör kaynaklı hastalıkların tedavisi için de AMP'ler umut vermektedir [22] [16].

2.3 Canlılarda Bulunan Peptit Antibiyotiklerin Gruplandırılması

Doğada bulundukları canlılar ele alındığında peptit antibiyotikler, böcek peptit antibiyotikleri, amfibi peptit antibiyotikleri, bitki peptit antibiyotikleri, memeli peptit antibiyotikleri ve bakteri peptit antibiyotikleri olmak üzere beş grup altında toplanmaktadır.

2.3.1 Bakterilerde Bulunan Peptit Antibiyotikler

Bakteriler tarafından üretilen AMP'ler pozitif yüke sahip amfipatik moleküllerdir [33]. Bu özellik diğer AMP'ler gibi bakteri AMP'lerinin negatif yüklü fosfolipidlere bağlanıp zarda delikler oluşturarak sitoplazmaya geçmelerini sağlar ve bu da hücre ölümüne yol açar. Çok hücreli organizmalarda üretilen AMP'ler geniş bir spektruma sahiptir, fakat bakterilerde üretilen AMP'ler üretim yapan bakteri grubuna değil bu grup dışındaki bakterilere etkilidir. Bu seçici toksisite, bakteri AMP'lerinin bulaşıcı hastalıkların tedavisinde, özellikle de antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde bir seçenek olabileceği konusunda umut vermektedir [34] [35]. Bakteriler tarafından üretilen AMP'ler "bakteriyosin" olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosinlerin 177 farklı diziye sahip türü bulunmaktadır. Bunlar Gram pozitif bakteriler, laktik asit bakterileri, Gram negatif bakteriler ve halofil arkeler tarafından üretilmektedirler. Özellikle laktik asit bakterileri tarafından üretilen AMP'lerin gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmada katkı sağlayan fermente gıdaların ana kaynağını oluşturduğu bilinmektedir [36].

Bakteriyosinler iki ana gruba ayrılır; Sınıf I, post-translasyonel değişiklikleri sunan küçük moleküllerden (5 kDa'dan az) oluşur; Sınıf II, modifiye edilmemiş amino asitli peptitlerden oluşur [33]. Moleküllerin yapısal farklılıkları AMP sayısını, aktif etki gösteren antimikrobiyal maddeyi ve hatta duyarlı bakterilere karşı spektrumu belirlerler. Bakteri AMP'leri genler tarafından kodlanır ve posttranslasyonel modifikasyonlar tamamlandıktan sonra AMP olarak salınırlar. Çoğu protein

hidrofobiktir, bu nedenle bakteriyosin sentezinin zara bağılı olduğunu ileri sürülmektedir [37].

Bakteriyosinler son derece güçlü bakterisidal etkenlerdir. Bakteriyosin direnci antibiyotik direncinden bağımsızdır ve şimdiye kadar çapraz direnç kaydedilmemiştir. Yapılan birçok araştırmada da bakteriyosinlerin sadece gözenek oluşturarak değil aynı zamanda hücrede bulunan reseptörler ile etkileşebildiği de gözlemlenmiştir. Bakteri AMP'lerinin katyonik özelliklerine dayanarak gözenek oluşumu, peptit ile negatif yüklü bakteri yüzeyi arasındaki elektrostatik etkileşimlerle başlar [36]. Zarda gözenek oluşumu, C-terminaldeki hidrofobik alanının sitoplazmik zar içine sokulmasıyla elde edilir [38]. Zar geçirgenliğinin değişmesi, toplam veya kısmi bir dağılıma yol açar, bu da enerji tükenmesine ve hücre ölümüne neden olur. Bazı bakteriyosinler ise zarda gözenek oluşturmak yerine hücre duvar biyosentezini inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterirler [39].

Bakteriyosin direnci, özgül olmayan ve özgül mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmaların oluşumunda antimikrobiyallerin hücre zarıyla etkileşimi ve hücre zarının özellikleri oldukça etkilidir. Bakterilerin, bakteriyosinlere karşı direnç kazanmak için geliştirdikleri stratejilerden biri, hücre zarının negatif yükünü azaltmak için D-alaninlerin bir kısmını teikoik asite çevirmek şeklinde olur. Bu şekilde elektrostatik etkileşimler zayıflar ve pozitif yüklü bakteriyosinlerin hücre zarına olan ilgisi azalır daha az etki eder [36]. Hücre zarındaki bu değişiklikler bakteriyosinin neden olduğu stres ve ilgili genlerin ekspresyonu ile koordine edilir [40]. İn vitro ortamlarda bakteriyosinler, düşük toksisiteye sahiptirler ve hiçbir çapraz direnç göstermez. Bakteriyosinlerin, midede ülsera neden olan *Helicobacter pylori*'ye karşı in vitro olarak etkinliği belirlenmiş ve kolonizasyonunun yok edilmesi şeklinde geliştirilen tedavi yöntemi "Applied Microbiology Inc" tarafından patentli ürün haline getirilmiştir. Günümüzde bakteriyosinleri içeren yenilebilir bir diş macunu (www.neonisin.com) ve deri enfeksiyonlarının tedavisinde yüzeyel krem (Biosynexus Inc, MA, ABD) gibi birkaç sağlık ürünü daha ticari olarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte bakteriyosinler, düşük çözünürlük, yüksek pH'da düşük aktivite, bağırsaklar tarafından hızlı emilim, enzimler ve kan bileşenleri ile etkileşim gibi özelliklere sahip olduklarından tedavi amaçlı

kullanımları veya yeni moleküllerin tasarımı konusunda oldukça büyük öneme sahiptir [33].

Biyoteknolojik olarak, bakteriyosin biyosentezinde yer alan genler plazmitler ile farklı bakteri türlerine aktararak bu türlerde bakteriosin sentezlenmesi olanaklıdır [36].

2.3.2 Böceklerde Bulunan Peptit Antibiyotikler

Böceklerin, bilinen tüm hayvan türlerinin dörtte üçünü temsil ettikleri bilinmektedir. Böcekler, oldukça fazla sayıda patojen bakteri, virüs, mantar, protozoan ve helmint parazitleri ile karşılaştıklarından bunlara karşı etkili savunma mekanizmalarında oldukça geliştirmiştir [29]. Böcekler ve böcekler gibi omurgasız hayvanlarda edinilmiş bağışıklık sistemi olmadığından doğuştan gelen savunma sistemleri ve savunma sisteminde yer alan peptit antibiyotikler koruyucu olarak görev alır [21]. *Drosophila* [41] ve güvenin, patojenlere karşı yaptığı (*Hyalophora cecropia*) savunma tepkimeleri üzerindeki araştırmalarda, güve pulpasının içine bakterilerin enjekte edilmesi sonucunda pulpa içinde bağışıklık proteinlerinin sentezlendiği gözlemlenmiştir. Bu ve bunun gibi çalışmalardan yola çıkarak çeşitli böcek türlerinde bağışıklığı sağlayan çok çeşitli antimikrobiyal peptit izole edilmiştir [42].

Böcek antimikrobiyal peptitleri dört sınıfa ayrılır: (a) amfipatik alfa-sarmal oluşturan peptitler; (b) intramoleküler disülfid köprüleri olan β -tabakalı peptitler; (c) prolinden zengin antimikrobiyal peptitler; (d) glisinden zengin polipeptitler [29].

Çoğu böcek antimikrobiyal peptitin, diğer peptitler gibi birincil hedeflerinin sitoplazmik zar üzerine olduğu bilinmektedir [43]. Genellikle, halı modeli olarak adlandırılan, zar yüzeyini kaplayıp yağ konformasyonunu değiştirerek antimikrobiyal etki göstermektedirler. Bir diğer mekanizma ise kanal proteinlerinin iletkenliklerinde artışlara neden olup, zarda delikler açarak antimikrobiyal etkinlik göstermeleridir [44].

2.3.3 Amfibilerde Bulunan Peptit Antibiyotikler

Son yıllarda amfibilerin birçok türünden özellikle derilerinden AMP'ler elde edilmiştir. Amfibilerde AMP çeşitliliği oldukça fazladır, çok farklı peptit dizilerine sahip AMP'ler bulunmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal peptitleri sınıflandırmak için *Ranagenus*

[45] ve *Littoria families* türleri arasında peptit dizileri taksonomik bir araç olarak kullanılmıştır [46]. Yapısal benzerliklere dayalı olarak iki grup peptit tanımlanmıştır: çizgisel katyonik peptitler ve karboksil ucunda bir disülfid bağı bulunan katyonik peptitler. Çizgisel katyonik amfipatik peptiti, *Xenopus laevis*'den izole edilen magainin temsil etmektedir (6).

Amfibilerde bir kaç çizgisel antimikrobiyal peptitte D-amino asitlerin varlığı oldukça dikkat çeken bir özelliktir [47]. Antimikrobiyal peptitlerde, posttranslasyonel olarak gerçekleştiği düşünülen bu modifikasyonun, peptitin antimikrobiyal etkisinden daha çok proteazlara karşı direnç göstermesini arttırdığı görülmektedir [48]. Amfibi antimikrobiyal peptitin diğer büyük sınıfını, Japon kurbağası *Rana brevipoda*'dan [49] izole edilen Brevinin I temsil etmektedir. Bu sınıftaki antimikrobiyal peptit, farklı uzunluklarda amino terminal dizisi ile karakterize edilir, C-terminal uca ise karboksiterminal sistein yanında aralarında disülfid bağı ile oluşturulmuş siklik bir motif daha izlenir [22]. Amfibi peptitlerinin birçoğu bakteri, mantar ve protozoaya karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterir ve etkili antimikrobiyal konsantrasyonlarda hemolitik aktivite göstermeyen çeşitleride vardır [50].

Tek bir türe ait AMP'ler içinde ve hatta çeşitli türlerden farklı peptitlerin bazı sınıfları arasında, moleküllerin öncül bölgesindeki amino asit diziliminin önemli bir şekilde korunması, bu kısmın molekülün salgılanmada ve üretilen organizmanın kendisinin korunmasındaki önemini göstermektedir [51]. Amfibilerde peptitler granül bez olarakta adlandırılan nöroendokrin yapılar içinde sentezlenir ve depolanırlar. Bu yapılar, yaralanma veya adrenerjik uyarım ile içeriğini deri yüzeyine salgılar. Amfibilerin epitel bariyerindeki bu antimikrobiyal sistem sayesinde yaşadığı ortamdaki patojen mikroorganizmalardan korunduğu düşünülmektedir [52].

Amfibi çizgisel antimikrobiyal peptitleri net katyonik yüklerinden dolayı, zarların negatif yüklü fosfolipid grupları ile elektrostatik olarak etkileşmektedir. Çizgisel peptit dizilerinde, zarla etkileşimlerine göre, α -sarmal ikincil yapı taşırlar. Mekanizmayı anlatan modellerden biri zar içinde, peptitin pozitif yüklü hidrofilik yüzeyi, sulu sınır ile temas halindedir, hidrofobik yüz ise yüzeye paralel olarak zardaki yağ katmanı içine gömülü halde durur [53]. Peptitlerin yağ katmanı içine girmesi zar yüzeyinin

genişlemesine ve zar kanallarının geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır [54]. Bazı durumlarda peptitler deterjan gibi davrandıkları gibi bazen de dört ila yedi peptitin çift katmanlı yağ tabakada toroidal delikler meydana getirerek etki ettiği düşünülmektedir [55]. Zar ile misel benzeri yapılar oluşturarak zarın parçalanmasına ve çok miktarda peptitin hücre içine girerek antimikrobiyal aktivite göstermesine neden olurlar [56]. Kolesterol içeren zarlar, magainin [57] gibi peptitlerin etkisine karşı daha az duyarlıdır, kolesterol molekülünün peptitlerle etkileşime girdiğinden, ikili katmandaki normal davranışlarını engellemektedir [58]. Hesaplamalı bilgisayar tabanlı moleküler simülasyon yöntemleri kullanılarak antimikrobiyal peptit ile yağ etkileşim mekanizmaları simüle edilmektedir [59].

Mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı geliştirdikleri direnç araştırmacıları ve ilaç sektörünü antimikrobiyal etkili yeni maddeleri geliştirmeye yönlendirmiştir. Mikroorganizmaların bazı antimikrobiyal peptitlere karşı direnç kazanmaya başladığı da bilinmektedir [22].

Günümüzde diyabetli yaşlı insanlarda sıklıkla görülen ayak ülserlerinin tedavisi için geliştirilmiş Pexiganan, amfibi kökenli ilk terapatik antimikrobiyal peptittir. Tedavide, geniş spektrumlu antibiyotik ve lokal yara bakımı için kullanılmaktadır [22].

2.3.4 Bitkilerde Bulunan Peptit Antibiyotikler

Bitki AMP'leri, genellikle hızlı öldürme ve geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinlikler gösteren amino asit bileşimi ve yapısında farklılık gösteren bir çok peptitten oluşmaktadır. Bitkilerde bulunan AMP'ler zar geçirgenliğini etkileyerek patojenleri öldüren moleküllerdir. Bazı bitkisel AMP'ler zardaki fosfolipidler ile etkileşime giren penetrasyon peptitlerini (CPP'ler) içerirler. Savunma sisteminin bir parçası olan bu peptitler farklı mikroorganizmalara karşı etkilidirler [60] [61]. AMP'lerin, hücre dışı, plazma zarında ve / veya hücre içi [62] bazı temel veya metabolik işlemleri hedefleyerek prokaryotik hücreleri inaktive ettiği gösterilmiştir. Elektrik yüklerine göre, bitki AMP'leri anyonik (AAMP'ler) ve katyonik peptitler (CAMP'ler) olarak iki gruba ayrılabilir [63]. Bitki antimikrobiyal peptitleri, çok çeşitli türden kök, tohum, çiçek, sap ve yaprakların neoplastik hücrelerinden izole edilmiş ve fitopatojenlere karşı insan, virüs, bakteri, mantar, protozoa, büyük parazitler ve insanlara patojen olan

organizmalara karşı aktiviteler gösterdiği bilinmektedir [64]. AMP'ler, amino asit dizisi benzerliğine göre defensinler, tiyoninler, yağ taşıyıcı proteinleri, siklotidler, snakinler ve hevein benzeri proteinleri içerir. Bitki AMP'lerinin amino asit dizileri arasındaki önemli farklılıklara rağmen, üçüncül yapılarında önemli benzerlikler görülmektedir. AMP'lerin yapısal temel özellikleri arasında sistein ve / veya glisin içeriğinin yüksekliği ve disülfid köprülerinin varlığı yer almaktadır. Özellikle bitki AMP'lerindeki yüklü amino asitlerin patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite açısından önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizması bilindiği gibi üç temel modelden oluşmaktadır; halı modeli, zarda delik açma ve zara gömülme modeli [63]. Bitki AMP'lerinin özgüllüğü açısından patojen etkileşimleri hala çok açık olmasa da bitki AMP'lerinde bulunan ve aspartik kalıntılar içeren tiyonin aktivitesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir [65].

Hücreye sızan peptitler (CPP), düşük mikromolar konsantrasyonlarda in vitro ve in vivo olarak herhangi bir reseptör kullanmadan ve herhangi bir belirgin zar zedelenmesi neden olmadan hücre zarının içine işleyebilir [66] ve bu özellikleri sayesinde ilaç verme uygulamalarında potansiyel yararlı maddeler olabilecekleri bilinmektedir [65]. CPP'ler, üç ana sınıfa ayrılırlar: Katyonik, amfipatik ve hidrofobik [67]. Bu peptitler, transkripsiyon faktörlerinden, bakteriyel veya viral yüzey proteinlerinden, toksinler, amfipatik sarmal oluşturan peptidlerden ve zara bağlı reseptörlerin veya yapışma proteinlerinin ligandlarından kısmi diziler olarak türetilmektedir. CPP'ler, yüksek molekül ağırlıklı ilaçların hücrelere verilmesi ve aşı geliştirme çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadırlar. Bitkisel AMP'ler, korunmuş dizilere sahip küçük genler tarafından kodlanır; böylece, gen amplifikasyonu ve transgenezis, seçilen peptitlerin üretimini ve özgül aktivitesini arttırmak için uygulanabilir yollardan biridir. Bu nedenle biyoteknoloji ve ilaç sektörü için bitkisel AMP'ler tedavide yaygın kullanım açısından potansiyel olarak görülmektedirler. Birçok çalışmada, bitki defensinlerinin transgenik ekspresyonunun vejetatif dokuların patojen saldırılarına karşı korunmasına yol açtığıda gösterilmiştir. Bitkisel AMP'ler geniş spektrumlu aktivite ve etkinliklerinden dolayı enfeksiyonların tedavisi için iyi bir alternatif sunsalar da henüz klinik olarak onaylanmış bir ilaç statüsüne erişememiştir [65].

2.3.5 Memelilerde Bulunan Peptit Antibiyotikler

Memeli canlıların edinilmiş ve doğuştan gelen bağışıklık sistemleri ve çeşitli mikroorganizmalara karşı olağanüstü savunma sistemleri sayesinde enfekte olmaları oldukça zordur. Kazanılmış bağışıklık sisteminde, antijene özel yönlendirilen sıvısal ve hücrel yanıtla aracılık etmek için, çoğunlukla lenfositik hücreler kullanır. Bu yanıtlar, aynı mikroorganizma tarafından oluşturulabilecek ikinci enfeksiyona karşı etkin bir savunma sağlayan immünolojik hafızaya neden olmaktadır. Doğal bağışıklık, hem yerel hem de dolaşımdaki efektör hücrelerin aracılık ettiği karmaşık bir dizi savunma sistemini kapsayan birinci dereceden temel savunma sistemidir. Doğal bağışıklık sistemi, mikroorganizmaların tanınması için algaçları, patojenlerin etkisiz kalması ve yok edilmesi için efektör molekülleri ve kazanılan bağışıklık yanıtı ile iletişimi koordine eden sinyal moleküllerini içerir. Doğal bağışıklığın efektör molekülleri, reaktif oksidanları, besin maddelerini sınırlayan proteinleri, hücre duvarlarını ve zarları parçalayan enzimleri ve mikrobiyal zarlarda gözenek oluşturabilen peptitleri içerir. Antimikrobiyal peptitler olarak adlandırılan son grup evrimsel olarak doğal bağışıklığın çok eski bir unsuru olarak kabul edilmektedir [19].

Memeli antimikrobiyal peptitleri, diğer canlılarda bulunan antimikrobiyal peptitler ile oldukça benzer özelliklere sahiptir [68]. N-terminalde sinyal dizisi, buna komşu öncül bir dizi ve C-terminalde öncül peptit olarak sentezlenirler ve diğer proteinler gibi genler tarafından kodlanırlar. Bakteriler, mantarlar ve bazı parazitler de dahil olmak üzere geniş bir dizi mikroorganizmaya karşı etkiye sahip olgunlaşmış aktif peptit, prekürsörden proteolitik bölünme yoluyla serbest bırakılır ve savunma sistemine dahil olur. Yapısal olarak, peptitler genellikle amfipatik ve katyoniktir özelliktedir, ancak son zamanlarda antimikrobiyal anyonik peptitlerin de varlığı gösterilmiştir. Peptitlerin çoğu yaşamsal aktiviteye sahiptir ve hedef öldürmenin işlevlerinin bozulması ve zar yapısının parçalanmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir [69] [70] [71].

Memeli antimikrobiyal peptitleri, genellikle yapısal özelliklerine, ekspresyon bölgesine veya kodlandığı gen ailesine göre gruplandırılmaktadır. Karakterizasyonları mesajcı RNA tarafından kodlanan memeli antimikrobiyal peptitleri, N-terminalden endoplazmik retikulum sinyal (hedefleme) dizisi içeren öncü moleküller olarak sentezlenmektedir.

Bu sinyal peptidine ek olarak, hücre içi işleme, yükle nötrleştirme ve / veya katyonik C-terminal peptidin katlanması için bir önparça (prosegment) bölgesi daha vardır. Bazı peptitler ekstraselüler olarak oluşan posttranslasyonel bölünme ile birlikte propeptitler olarak depolanırken diğerleri hücreler arası bölünür ve lizozomal granüllerde saklanır. Bazı durumlarda, posttranslasyonel işlem basamakları, intramoleküler disülfid bağının oluşumunu, C-terminal amidasyonunu ve N-terminalde piroglutamat oluşumunu içerir [19].

Çoğu memeli AMP'leri katyonik ve amfifiliktir. Doğada bulunan AMP'ler, ilk olarak Boman [72] tarafından yapısal olarak sınıflandırılmıştır. Birçok memeli AMP'i, disülfid bağlarına sahiptir. Örneğin en iyi bilinen memeli peptitlerinden defensinlerin yapısında üç disülfid bağı bulunmaktadır. Memeli defensin peptitlerinin alt grupları α -, β - ve θ - olarak adlandırılır, yapılarında altı sistein bulunur, sisteinler, arasındaki bağların farklı eşleşmesi ile alt gruplara ayrılırlar [73]. Katelisin LL-37 en çok bilinen alfa-sarmal yapıdaki peptitlerdendir, insan nötrofilleri ve epitel hücrelerinde depo edilirler [74]. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonrasında anyonik yapıya sahip AMP'ler de bu gruba eklenmiştir [75]. Bu sınıflandırma şemasına göre, memeli peptitlerinin büyük çoğunluğu defensinler ve katelisinler olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

Memeli defensinleri temel olarak molekül içinde üç disülfid bağının varlığı ile karakterize edilir [76]. Defensinler, (a) sisteinlerin disülfid köprülerindeki farklı eşleşmelerine göre, (b) önparçanın uzunluğundaki değişime göre, (c) gen yapısı ve kromozomlardaki genlerin konumuna bağlı olarak α -defensinler [77] ve β -defensinler [78] olarak iki genel sınıfa ayrılabilir [79]. Disülfid bağları farklı olmasına rağmen, her iki peptit grubunun üç boyutlu yapısı çok benzerdir ve her iki defensin de benzer antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Defensinlerin yapısal konformasyonu üç β -iplikten oluşur ve esasen α -sarmal içeriğine sahip değildir [80].

Memeli katelisinleri, kimyasal yapıları bakımından oldukça farklı molekül grubudur. Korunmuş N-terminaldeki öncül peptitlerden türetilmektedirler [81]. Yapısında yaklaşık 100 adet korunmuş amino asit dizisi ve N-terminalde proteaz inhibitörü olan katelin proteininden oluşmaktadırlar. Katelisinler Prolin ve Argininden zengin α -sarmal yapıda peptitlerdir ve C - terminalde 12 ila 100 amino asit arasında değişen ve aktif

antimikrobiyal aktivite gösteren amino asit dizisi bulunmaktadır [82] [83]. Nötrofil elastaz enzimi ile endoproteolitik bölünme sonrası C terminalden hücre dışı boşluğa salınan antimikrobiyal peptitler, antimikrobiyal etki göstermeyen propeptit olarak nötrofil granüllerinde depolanmaktadır [84] [85].

Memeli antimikrobiyal peptitlerinin çoğu, gram negatif ve gram pozitif bakteriler, mantarlar, zarflı virüsler ve protozoonlar da dahil olmak üzere türler arasında bile oldukça geniş antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [86] [87]. Peptit yapısındaki küçük değişiklikler antimikrobiyal aktivitede dikkate değer değişikliklerle sonuçlanabilir, ancak yapı ile fonksiyon arasındaki ilişkilerin daha net anlaşılması için özellikle moleküler modelleme kullanan araştırmalar yapılmalıdır [88]. Antimikrobiyal peptitlerin aktivitesi, bakterisidal geçirgenlik, indükleyici protein gibi diğer antimikrobiyal faktörlerin aktivitesi ile sinerji oluşturabilir [89]. Memeli antimikrobiyal peptitlerinin, mikroorganizmaların hücre zar bütünlüğünün bozulmasını sağlayarak etkinlik gösterdiği düşünülmektedir [90]. AMP'ler, katyonik ve amfipatik özellikte olup, biyolojik zarlarla etkileşimleri destekleyen özelliklerdir. Bu etkileşim, zardaki elektrokimyasal dağılımların değişmesi ya da kaybolmasını sağlayarak antimikrobiyal aktiviteyi desteklemektedir. Aynı gruptaki antimikrobiyal peptitler arasındaki yapısal farklılıklar, peptitlerin, zara olan etki ve aktivitelerini değiştirebilmektedir. Her bir peptitin N ve C terminali, dimer kutbundaki, hidrofobik yüzeyin karşısında kümelenir, yapıdaki arjininler ise, hidrofobik yüzey boyunca ekvatoryal olarak uzanır [91]. Arjininlerin bu dizilimi sayesinde peptitler, yağ katmanlı zar tabakasında multimerik gözeneklerin oluşumu ile antimikrobiyal etkinlik göstermektedirler [92].

AMP'lerin, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliklerine ek olarak, bazı antimikrobiyal peptitler yara onarımı, iltihaplanma ve edinilmiş bağışıklıkta da rol oynarlar. Bununla birlikte, yüksek derişimlerde AMP'ler konak hücreler için sitotoksik olabilir [1]. Bazı defensinler ve katelisinlerin kemoatraktan aktivitesine sahip oldukları da gösterilmiştir [93]. Örneğin, insan nötrofil α -defensin-1 ve -2, lenfositleri çekici aktiviteye sahiptir (88), aynı zamanda insan nötrofil α -defensinlerin sistemik IgG antikor yanıtını da geliştirdiği bilinmektedir [94]. İnsan beta-defensin (hBD) -2, kemokin reseptörü CCR-6 [95] ile etkileşerek dendritik hücreler için kemoatraktan aktivitesini sağlamaktadır. Defensinler için bildirilen diğer aktiviteler arasında plazmin aracılı

fibrinoliz inhibisyonu ve bağlanma plazminojen ve lipoprotein a'nın endotel hücrelerine [96], bazı iyon akılarının epitel hücrelerinde [97], epitelial hücrelerin ve fibroblastların mitojenik aktivitesinin arttırılması [98], mast hücrelerinden histamin salınması [98] ve adrenal bezden adrenokortikotropin hormon aracılı kortizol salınımının inhibisyonu sayılabilmektedir [99].

2.4 İnsan Peptit Antibiyotikleri

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) hem omurgasızlar hem de omurgalılarda bağışıklık sisteminin kilit bileşenleri arasında yer alan moleküllerdir. İnsanlarda, doğal bağışıklık sistemi, fırsatçı mikroorganizmaları doğrudan öldürmektedir. AMP'ler, doğal bağışıklık sisteminden farklı olarak, enfeksiyonların üstesinden gelmek için, bağışıklık sistemini uyararak etkisini arttırmaya yardımcı olur. Dolayısıyla, konak hücre savunmasında peptitlerin ikili rolü olabilir: hızlı mikrobiyal öldürme ve bağışıklık düzenleme. İnsan antibakteriyel peptitleri beş büyük üyeye sahiptir: Defensinler, histatinler, katelisidinler, dermisidinler ve hepsidinler [21].

AMP'ler deri, göz, kulak, ağız, solunum yolu, akciğer, bağırsak ve üriner sistem gibi birçok doku veya yüzeylerde saptanmıştır. İnsan peptit antibiyotiklerinden katelisidin LL-37, yeni doğan bebeklerin derisinde [100], insan beta-defensin 2 (hBD-2) yaşlı bireylerde daha sık bulunmaktadır. İnsan AMP'lerinden defensinler, katelisidinler ve histaminler ağız boşluğunun önemli peptit antibiyotiklerindendir [101]. İnsan AMP'leri antimikrobiyal aktivite dışında, bağışıklık düzenleme, apoptozis ve yara iyileşmesi gibi başka işlevlere de sahiptirler [102]. Antimikrobiyal Peptit Kütüphanesinde 103 tane insan antimikrobiyal peptiti bulunmaktadır [103]. Bu peptitlerin bazıları Çizelge 1'de verilmektedir. Genellikle insan antimikrobiyal peptitlerinin uzunlukları, 10 ila 149 amino asit arasındadır. Net yükleri ise -3 ila +20 arasında değişmektedir. Bu yük değişkenliğine ek olarak, insan AMP'lerinin sekans çeşitliliği, yapısal ve işlevsel özelliklerini belirlemektedir (Çizelge 2. 3) [21].

Çizelge 2. 3 İnsan antimikrobiyal peptit ve proteinleri [21].

(G; Gram bakteri, M; Mantar, V; Virüs, P; Parazit, K;Kanser hücresi)

YIL	İSİM	KAYNAK	ETKİ
1922	Lizozim	Tükürük, Gözyaşı, Bağırsak	G, M
1985	α -Defensin	Nötrofil, Kemik iliği	G, V, M, P, K
	HNP-1		
1985	α -Defensin	Nötrofil, Kemik iliği	G, V, M, K
	HNP-2		
1985	α -Defensin	Nötrofil, Kemik iliği	G, V, M, K
	HNP-3		
1988	Histatin 1	Tükürük	M
1988	Histatin 3	Tükürük	G, M
1989	α -Defensin HNP-4	Nötrofil	G, V, M
1990	RNase 2	Eozinofil	V, P
1990	RNase 3 (Eozinofil katyonik protein, ECP)	Nötrofil	G, V, P
1992	α -Defensin	Bağırsak, Dişi üreme sistemi	G, V, M
	HD-5		
1993	α -Defensin	Bağırsak	V, M
	HD-6		
1995	β -Defensin	Böbrek, Deri, Tükrük bezi	G, M, K
	hBD-1		
1995	Katelisidin	Nötrofil; Deri	G, V, M, P, K
	LL-37		

Çizelge 2. 3 İnsan antimikrobiyal peptit ve proteinleri [21] (devamı)

1997	β -Defensin hBD-2	Deri, Akciğer, Deri, Uterus, Tükrük bezi	G, V, M
1998	Granülisin	Sitolitik T and NK hücreleri	G, M, P, K
1999	Ubiquicidin	Makrofaj	G
2000	Thrombocidin-1 (TC-1)	İnsan kan pıhtısı	G, M
2000	Hepcidin 25 (LEAP-1)	Plazma, Üriner, Karaciğer	G, M
2000	Neuropeptide α -MSH	Beyin	G+, V, M
2001	β -Defensin hBD-3	Deri, Tükrük bezi	G, V, M
2001	β -Defensin hBD-4	Testis, Akciğer, Böbrek, Nötrofil	G
2001	Dermcidin	Deri	G, M
2002	RNase 7	Üriner sistem; Solunum yolu; Deri	G, M
2003	RNase 5 (angiogenin)	Karaciğer, Deri, Bağırsak	G+, M
2003	Chemokine	Deri	G, M, P
	CCL20		
2003	Chemokine	Kan	G, P
	CXCL9		
2005	Psoriasin (S100A7)	Deri, Tükrük bezi, Göğüs	G-
2006	RegIII α	Bağırsak	G+
2008	Substance P	Sinir sistemi	G, M
2008	Drosomycin-like defensin (DLD)	Ağız epitel hücresi, Deri	M
2009	Elafin	T hücresi	G, M, V
2010	β -amyloid peptide 1-42	Beyin	G, M

Çizelge 2. 3 İnsan antimikrobiyal peptit ve proteinleri [21] (devamı)

2011	Chemerin	Deri	G, M
2012	Amylin	Pankreatik β hücresi	G
2012	KDAMP	Göz	G-
2013	DEFB114	Epididimis	G, M

İnsan AMP'lerinin çoğu bakterilerin çoğalmasını engelleyebilir özelliktedir. Çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir etkinlik sergilerler. Dolayısıyla, bu peptitler istenilen antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip yeni antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesi için temel oluşturabilmektedir [21].

Defensinler, katelisidinler ve histatinler gibi antimikrobiyal peptitler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, mayalara, mantarlara ve zarflı virüslere karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Katyonik özellikteki defensinler ve katelisidinler, patojenin dış yüzeyine elektrostatik etkileşimler ile bağlanması sonrasında peptitin sitoplazmik zar içine girmesi ile hücre içeriğinin hücre dışı ortama geçmesini sağlar. Hücre içeriğinin kaybı mikroorganizmanın parçalanmasına da yol açabilir.

Histatin 5'in özellikle mayalardan hücre dışına ATP salınımına neden olduğu bilinmektedir. Histatin 5'in mayalara etki gösterebilmesi için hücrede aktif mitokondrinin bulunması gerekir. Histatin 5 mayalarda oksidatif fosforilasyonu gerçekleştiren mitokondri ve buradaki solunum birimlerini hedef almaktadır. Mitokondrial DNA'daki mutasyonlar nedeniyle solunum yetersizliği olan ve histatin 5 ile indüklenen maya hücrelerinde ölümler meydana gelir [104].

Antibiyotiklerin yaygın klinik kullanımı, bu ilaçlara dirençli bakteri ve mantar türlerinin atmasına yol açmıştır. Bu nedenle, yeni bir antibiyotik sınıfının geliştirilmesi oldukça önemli hale gelmiştir. Antimikrobiyal peptitlerin veya bunların sentetik türevlerinin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için yapılan birçok araştırma mevcuttur. Araştırmalarda bazı peptitlerin tedavi edici potansiyele sahip olması birçok hastalığın tedavisi için umut vericidir.

İnsan antimikrobiyal peptitlerinin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antiviral etkinlikleri de bilinmektedir. Bu peptitlerden 16'sı antiviral aktiviteye sahiptir. Bunlar arasında, iyi tanımlanmış altı adet insan α -defensini (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, HD-5 ve HD-6), üç β -defensin (hBD-1, hBD-2, ve hBD-3), katelisidin LL-37 ve histatin 5 en çok bilinen insan antimikrobiyal peptitleri içinde yer almaktadır [105]. Antiviral etki mekanizmaları çoğunlukla konak hücre içine girmiş olan virüslerin genetik materyalinin replikasyonunu engellemek şeklinde gerçekleşmektedir [106].

AMP'lerden antikanser peptit geliştirmeye giderek artan bir ilgi söz konusudur. Özellikle magainin, sesropin ve defensinlerin antikanser etkiye de sahip oldukları yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [21]. Antikanser özellikteki AMP'lerin listesi APD veritabanında (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) bulunmaktadır. Hayvanlar, bitkiler, bakteriler, mantarlar ve sentetik peptitlerde dahil olmak üzere birçok kaynaktan 166 adet antikanser peptit elde edilmiştir [103]. İnsan katelisidin LL-37'nin meme, yumurtalık ve akciğer kanser hücrelerinde eksprese edildiği, ancak gastrik kanser proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir [21] [107]. Antimikrobiyal peptitler ile ilgili mevcut bilgi, avantaja dönüştürülür ise insan katelisidin LL-37'nin veya defensinlerin aşırı üretimi, kanser tanısı için yararlı biyolojik belirteç olarak görev yapabilir. Bazı AMP'lerin kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek dolaylı olarak bu hücreleri öldürmesinin de mümkün olduğu düşünülmektedir [21].

Birçok AMP'nin bakteri hücre zarlarını hedef aldığı bilinmektedir. Fosfatidilgliseroller (PG) ve kardiyolipin (CL) [108] gibi anyonik yağlar bakteri hücre zarında bol bulunurken, insan hücre zarında zwitterionik fosfokolinler (PC) ve kolesterol bulunmaktadır. Katyonik yapıdaki antimikrobiyal peptitlerin hücreler arasındaki seçiciliği bu farklılıklar sayesinde olmaktadır. İnsan antimikrobiyal peptitlerinin düşük sitotoksositeye sahip olamalarında memebren farklılıklarına ek olarak hücrelerde toksik etkiyi azaltmak için farklı mekanizmalar rol oynamaktadır [21]. İnsan endotel hücre yüzeyinde bulunan ve algaç yüzey proteini olan p33'ün katelisidin LL-37'nin toksik etkilerini maskelediği düşünülmektedir [109]. Yapay AMP içeren lipozomlar ile insan hücrelerine karşı sitotoksitenin azaltılabileceği de araştırmacılar tarafından düşünülmektedir [21].

İnsan AMP'lerinin antimikrobiyal ve anti kanser aktivitelerine ek olarak, kemotaksis, apoptoz ve yara iyileşmesi gibi başka işlevlere de sahip oldukları bilinmektedir.

Kemokinler ve AMPler arasında derişim ve moleküler hedef etki açısından önemli farklara neden olmaktadır [110]. AMP'ler genellikle işgalci bakteri zarlarını hedeflerken, kemotaktik etkiler, hücre algaçlarını barındırmak için peptitlerin birleşmesini gerektirir. Günümüzde insan katelisinin LL-37'ye reseptör benzeri bir (FPRL-1) yapı bağlayarak monositlere, makrofajlara, nötrofillere ve T hücrelerine kemotaksi yeteneği kazandırma çalışmaları devam etmektedir [21].

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü sürecidir. Farklı etmenler hücre apoptozunu tetikleyebilir ve AMP'ler bu etmenlerden biridir. İlginçtir ki apoptozu aynı peptit hem indükleyebilir hem de baskılayabilir. İnsan LL-37'nin fare modelleri kullanılarak farklı bölgelerdeki hücrelerde, apoptozu indüklediği gibi interstisyel sistit (IC) gelişimini engellediği de gösterilmiştir [111].

İnsan antimikrobiyal peptitlerinin yara iyileşmesinde de aktif role sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin, tükürük histatin 2, fibroblast hücre göçünü arttırırken, insan LL-37, hücre göçünü indüklemekte ve çoğalmayı hızlandırmaktadır [112]. Bu peptitlerin hızlı yara kapanmasında aktif rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Antimikrobiyal aktivite, insan AMP'lerinin ortak bir özelliğidir. İnsan AMP'leri peptit konsantrasyonu, proteazlar ve metabolik duruma bağlı olarak başka işlevler de gerçekleştirebilirler. Hastalık durumunda, AMP'lerin hastalığı ilerletme gibi ters bir etki gösterebilme olasılığı da araştırmacılar tarafından değerlendirilmektedir [21].

İnsan antimikrobiyal peptitlerinin üç boyutlu yapıları nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve X ışını kristalografisi gibi yöntemlerle belirlenmektedir. Bu yöntemler sonucunda genellikle benzer yapılar elde edilmektedir [113]. Genellikle birçok kısa ve doğrusal yapıdaki antimikrobiyal peptitler çözeltide serbest katlanamazken yapısında disülfid bağı bulunan AMP'ler yapısal olarak stabilize edilemediklerinden sulu çözeltide katlanmış yapıda bulunurlar. AMP'lerin ve algaçların zar ile nasıl etkileşime geçtiğini anlamak için zarı taklit eden modeller kullanılmaktadır. Bu modeller genellikle organik çözücüler, deterjan ve yağ yüzeyleri içermektedirler [102] [114].

1922'de Alexander Fleming tarafından tükürükte keşfedilen insan lizozimi ilk antimikrobiyal protein olarak kabul edilmektedir. Araştırmalarda AMP'lerin tanımlaması için iki ana yöntem kullanılmıştır; (a) yeni peptitleri izole etmek ve karakterize etmek için kromatografik yöntemler kullanılmıştır; (b) genomik düzeyde antimikrobiyal peptitleri tanımlamak için biyoinformatik yaklaşımlar geliştirilmiştir. İnsan antibakteriyel peptitleri beş büyük üyeye sahiptir; defensinler, histatinler, katelisidinler, dermisidinler ve hepsidinler [21].

2.4.1 Defensinler

İlk olarak 1985'de Lehrer grubu tarafından insan kanından α -defensinler izole edilmiştir. Kaynağa, özelliğe ve boyuta dayanarak, bu peptitlere insan nötrofil peptidleri (HNP-1, HNP-2 ve HNP-3) adı verilmiştir. Üç defensin de, neredeyse aynı amino asit dizisine sahiptir. Hem HNP-1 hem de HNP-3, HNP-2'ye kıyasla, N-ucunda HNP-1 için alanin, HNP-3 için aspartat olmak üzere sadece bir ek amino asit molekülü içerirler. 1989'da dördüncü bir insan nötrofil defensini olan HNP-4 keşfedilmiş ve kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. Bu defensinler kemik iliği, periferik kan lökositleri, dalak, timus ve insan epitel hücrelerinde oldukça fazla miktarda bulunmaktadır [21] [115]. İnsan Paneth hücrelerinde de HD-5 ve HD-6 olarak adlandırılan dokuya özgül defensinler saptanmıştır [21]. Bu altı adet insan α -defensini, aynı biçimde disülfid bağına sahiptir [116]. 1990'lı yıllarda insan β -defensinleri keşfedilmiştir, α -defensinlerden farklı olarak, β -defensinlerde üç disülfid bağı bulunmaktadır ve biraz daha uzun amino asit dizisine sahiptir. İlk insan β defensin (hBD-1), 1995'te Bensch ve arkadaşları tarafından insan plazmasından elde edilmiştir ve daha sonra böbrekte de saptanmıştır. Ardından hBD-2, deri lezyonundan kromatografik yöntemler ile tanımlanmıştır [21]. HBD-1 gibi, HBD-2'nin aktivitesi de tuza duyarlıdır [117]. hBD-3 ve hBD-4 ise 2001 yılında keşfedilmiştir. HBD-1 ve hBD-2'nin aksine, hBD-3, fizyolojik tuz konsantrasyonlarına dirençlidir [21]. İlk olarak memeli lökositlerinde (29-31) keşfedilen α -defensinler daha sonra bağırsak (32,33) ve üreme mukozasındanda (34) izole edilmiştir. β –defensinler ise çeşitli memeli ve kuş türlerinde tespit edilmiştir [118] [119] [120] ve α -defensinlere kıyasla daha çeşitli hücre tipleri tarafından üretildiği bilinmektedir [121].

2.4.2 Histatinler

Histatinler, histidinlerden zengin antimikrobiyal peptit ailesidir. Bu histidin bakımından zengin peptitler ilk olarak 1970'lerin başında mikroorganizmaların glikolitik aktivitesini arttıran peptitler olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar, bu peptitlerin güçlü bakterisidal ve fungusidal özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. İlk olarak histatinler 1988'de, HPLC ile insan tükürüğünden izole edilmiş, 34 kDa'lık küçük, katyonik özellikte peptitlerdir. Bu peptitler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturur ve ağız boşluğundaki enfeksiyonları sınırlandırarak ağız sağlığının korunmasında önemli bir rol oynarlar. Histatin ailesinde histatin 1, 3 ve 5 en önemlileri olmakla birlikte birkaç üyeden oluşmaktadır [104]. Günümüzde bulunan insan histatinlerinden sadece histatin 1 ve 3 genler tarafından kodlanmıştır, diğer histatinler bu iki peptitin amino asit dizilerinin belirli bölgelerinden bölünmüş ürünlerini oluşturmaktadır [21].

Tüm histatinler arasında histatin 5 en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir, özellikle güçlü antifungal etkisi yapılan birçok çalışmada belirlenmiştir.

Histatin 5'in 12 amino asitlik bir parçası olan P-113, tüm amino asit dizisine kıyasla daha güçlü antikandidal etkiye sahiptir. Bu peptitin, plak oluşumu ve diş eti iltihabına karşı güçlü etkinliği sayesinde jel formülasyonlarında faz I / II klinik çalışmalar ile güvenilirliği değerlendirilmiş, her iki çalışma sonucunda bu formülasyonun insanlar tarafından güvenli bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda, insan diş eti iltihabı modelinde dişeti kanaması, gingivitis ve plak gelişimini azalttığı da bildirilmiştir [104].

2.4.3 Katelisidinler

Katelisidinler, ilk olarak 1989'da izole edilmiştir [21]. Peptit dizisinin N-terminalinde proteazlara karşı direnç sağlayan katelin bölgesi bulunur. Katelisidinler Prolin ve Argininden zengin sarmal yapıda peptitlerdir ve C- terminalde antimikrobiyal aktivite gösteren oldukça farklı amino asit dizilerine sahiptirler [83]. İnsan katelisidin peptiti izole edilip detaylı olarak incelendiğinde, 37 amino asitten oluştuğu, sistein içermediğinden doğrusal bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Amino asit dizisinin bir çift lösin ile başlaması nedeniyle LL-37 olarak adlandırılmıştır [21]. Katelisidinler diğer

antimikrobiyal peptitler gibi insan üreme sisteminde de savunma rolüne sahiptirler [122].

İnsanlarda saptanan tek bir katelisinidin geni (CAMP) vardır ve dolayısıyla bugüne kadar LL-37 olarak adlandırılan sadece bir katelisinidin karakterize edilmiştir [123]. Bu peptit, insan CAP18 proteininin (hCAP18) C terminal ucundan proteoliz yoluyla üretilir [104], lökositler, nötrofiller, miyeloid kemik iliği hücreleri ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücrelerde ve dokularda eksprese edilir [123]. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Ayrıca nötrofiller, monositler, mast hücreleri ve T hücreleri için kemotaktiktir. Mast hücrelerinin degranülasyonunu indükler, makrofajlarda transkripsiyonel tepkileri değiştirir, iyileşme sırasında yaranın bulunduğu bölgede damarlanmayı sağlar ve derinin yeniden epitelyalizasyonunu uyarır. Ayrıca antitümör aktiviteye de sahip olduğu bilinmektedir [104].

Makrofajlardaki LL-37 üretimi, güneş ışığı altında bırakılan D vitamini tarafından deri boyunca uyarılmaktadır. Bu durum muhtemelen LL-37'nin hücre içi birçok bakteriyi öldürme yeteneğini arttırmaktadır [123].

2.4.4 Dermisidinler

İnsan Katelisinidin LL-37 [124] yanında, bir savunma peptiti olan anyonik yapıdaki dermisidin, ilk olarak insan terinde bulunmuştur [125]. İnflamatuvar ve hasar görmüş koşullar altında indüklenen insan defensinleri ve katelisinidinlerden farklı olarak dermisidin, insan teriyle salgılanır [126]. Sağlıklı insanlarla enfekte insanlar arasında dermisidin düzeyinin değişmediği de bilinmektedir [127].

2.4.5 Hepsidinler

İlk olarak 2000 yılında insan kanından elde edilmiştir [128]. Bu peptit, özellikle sisteinlerden (% 32) zengin olup, dört disülfid bağı içermektedir. Ayrıca hepsidinlerin demir kullanımında da önemli bir rol oynadığı [129] ve genetik bir hastalık olan ağır juvenil hemokromatoz ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir [130].

2.5 İnsan Peptit Antibiyotiklerinin Etki Mekanizması

Genellikle katyonik AMP'lerin anyonik bakteri zarlarını hedef aldığı bilinmektedir. İnsan AMP'leri ya hücre yüzeyi (zarlar dahil) ya da hücreler içinde çeşitli molekülleri hedef alarak bunlarla etkileşebilir ve antimikrobiyal aktivite gösterebilirler [21].

AMP'lerin moleküler hedefleri, bakteri zarları ile sınırlı değildir. Birçok araştırmacı tarafından insan antimikrobiyal peptitlerinin hücre duvar sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etki antimikrobiyal peptitlerin yaygın görülen mekanizmasından biridir [21]. Bunun dışında sık görülme de hücre zarında özel yağları ya da karbonhidratları tanıyan proteinlere sahip antimikrobiyal peptitler de vardır [131].

İnsan katelisin LL-37'nin bakteri zarlarını bozduğu bilinmektedir. Zar parçalanması üç aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada katyonik peptit, bakterilerin anyonik yüzeyini tanır ve kaplar. Amfipatik sarmal yapıli katyonik peptit, anyonik bakteri zarlarını hedefler. İkinci aşamada, LL-37 dış zara bağlanarak dış zarı geçer. Son aşamada ise iç zara ulaşarak buraya bağlanır [21]. Yüksek derişimlerde, peptit, miselleşerek zarları bozabilir ya da dikey bir konum alarak gözenek oluşturabilir [132]. Bakteri hücre zarının yapısında nötr pH'ya göre asidik pH'da daha belirgin bozulma meydana gelmektedir [133].

DNA bağlayıcı histon 2A'dan üretilen bazı peptitlerin DNA'yı bağlayarak nükleik asit sentezini inhibe ettiği ve bu şekilde antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinmektedir [108]. Yine, elastaz ve katepsin L'yi inhibe eden proteinlerin de nükleik asitleri bağlayarak antibakteriyel aktivite gösterdiği bilinmektedir [21]. AMP'lerin antibakteriyel etki mekanizması çok farklı mekanizmalar ile gerçekleşebilir. Örneğin, insan LL-37'si ilk olarak bakteri hücre zarına zarar veriyor ve ardından DNA'ya bağlanarak bakterilerin üremesine engel oluyor olabilir [108]. Bazı peptitlerin bakteride ATP'nin akışını indükleyerek küçük moleküllere karşı hücre geçirgenliğini arttırdığı ve iyon dengesizliğine yol açarak antibakteriyel aktivite gösterdiği birçok model ile gösterilmiştir. Yine bakteriyel enfeksiyonla mücadele için, bazı AMP'lerin bağışıklık hücrelerine etki edip bağışıklık sisteminin enfeksiyonla mücadelesini arttırmak için uyardığı bildirilmiştir [21]. Fakat hala daha bağışıklık sistemi molekülleri ile

antimikrobiyal peptitlerin bakteri öldürmede birlikte nasıl çalıştıkları tam olarak açıklanamamıştır [134].

2.6 Bakterilerin Antimikrobiyal Peptidlere Gösterdiği Direnç Mekanizmaları

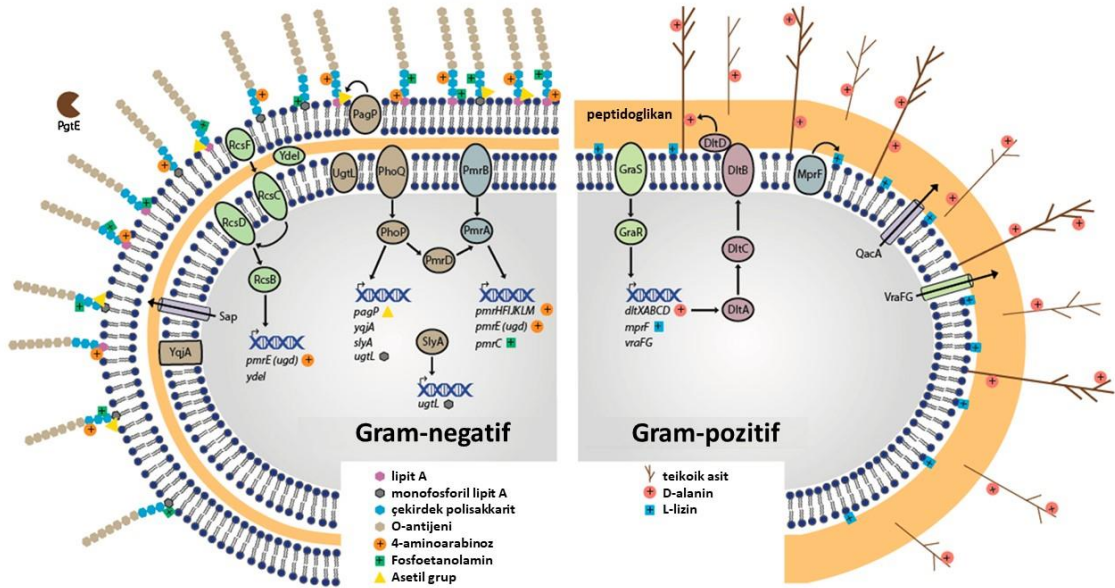
Antimikrobiyal bileşiklere karşı direnç gelişimi, enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştıran en önemli sorunlardan biri olduğu için, AMP'lere direnç mekanizmasının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması yaşamsal önem taşımaktadır. AMP direnç mekanizmaları arasında proteolitik bozunma veya salgılanan proteinlerin sekestrasyonu (ayrı bir kısımda tutulması), ekzopolimer ve biofilm matris moleküllerinin empedansı, hücre yüzeyi ile zar değişiminin engellenmesi ve pompalar tarafından AMP'lerin hücre zarından uzaklaştırılması bulunmaktadır.

Proteazlar, AMP'lerin bakterilerle etkileşime girerken karşılaştıkları ilk savunma mekanizmalarıdır. AMP'lerin hücre dışı enzimler tarafından proteolitik olarak parçalanması, mikroorganizmaların AMP'lere direnç sağlamanın basit, ancak etkili bir yoldur [135]. Konak hücre proteini olan proteazlar makroglobülin ile AMP'lere etki gösterirler ya da AMP'leri etkisizleştiren dermatan sülfat salgırlar [136]. En etkili proteaz gruplarından biride Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan aspartat proteaz olan omptin ailesidir ve birçok AMP üyesini parçaladığı gösterilmiştir [137]. Proteazların omptin ailesiyle birlikte metalloproteazlar da AMP'lerin etkisizleştirilmesini sağlarlar ve gram negatif bakterilerin AMP'lere karşı korunmasında önemli bir rol oynarlar. AMP'lerin proteazlar tarafından inaktivasyonunun, hedef peptitin yapısına oldukça bağlı olduğu vurgulanmaktadır [138]. Proteoliz ile birlikte, hücre dışı proteinin aracılık ettiği AMP'lere dirençte sekestrasyon önemli bir role sahiptir. Stafilokinaz, en belirgin hücre dışı AMP sekestrasyon moleküllerinden biridir. *Staphylococcus aureus* ve alfa-defensinleri (HNP-1 ve 2) birbirine bağlar [139]. Dahası, LL-37'ye bağlanma, stafilokinaza bağımlı plazminojen aktivasyonunu artırır ki bu da patogeneizde stafilokinazın önemli bir rol oynadığını gösterir [138].

Bakteri biyofilmi, ekstrasellüler proteinler, ekstrasellüler DNA ve ekzopolisakkaritlerden (EPS) oluşan bir matrise gömülmüş, yüzeye bağlı bakteri hücrelerinden oluşan bir bileşimdir [140]. Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere ve AMP'lere daha yüksek direnç göstermektedirler [138]. Bu güçlü direncin, AMP'lerin biyofilme sızmasındaki

azalmasına bağı olduğu düşünölmektedir [141]. EPS ve kapsöler polisakkaritler (CPS), AMP'leri yakalayarak veya iterek aktivite göstermelerini engellemektedir [142]. Bazı bakterilerde bulunan kapsöller de AMP'lerin sekestrasyonunda önemli bir role sahiptir. Özellikle hiyalüronik asit kapsülü ve M proteini, AMP'lerin antibakteriyel aktivitelerini ortadan kaldırmaktadır [143]. Biyofilmlerde AMP direncinde gulükronik asit ve mannüronik asit gibi anyonik şekerler içeren açillenmiş polisakkaritlerin genetik olarak aşırı ekspresyonu rol oynamaktadır [138]. Bazı gram negatif bakteriler AMP'lerin etkisinden, yüzey bağlanmasını önleyen bir glutamik asit homopolimeri olan poli-gama-glutamik asit (PGA) içeren ve bakterileri fagositozdan koruyan bir hücre dışı kapsülün varlığı sayesinde korunurlar [144]. Fakat bu kapsüle sahip bakterilerin biyofilm oluşturması da diğer bakterilere göre daha zordur [145]. Tüm bunlara karşın, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonun tedavisinde AMP'lerin geleneksel antibiyotiklere alternatif olabileceğini belirtmek gerekir. AMP'lerin etki tarzı genellikle bakterisidaldir, oysa birçok geleneksel antibiyotik genellikle bakteriyostatik olarak etkinlik gösterir ve hızlı çoğalan bakterileri hedef alır. Bu nedenle biyofilmlere karşı etkinlikleri yok denecek kadar azdır [145] [146]. Bununla birlikte, biyofilm iç gerilimi, AMP'lere karşı bir direnç oluşturduğundan doğal veya sentetik AMP'ler ile biyofilm kontrolü veya biyofilm varlığı olan enfeksiyonlarının tedavisinde AMP'lerin kullanımı zorlaşmaktadır [147]. Yapılan yeni bir araştırmada, çeşitli gram pozitif bakteriler tarafından yaygın olarak kullanılan D-alanilasyonun hücre duvar yoğunluğunu arttırdığı ve bu durumun da elektrostatik itme ve yüzey geçirgenliğinin azaltılmasına neden olduğunu ve AMP'lerin etkinliğini azalttığını göstermiştir [148].

İnsan AMP'leri hücre duvarı biyosentezini bloke etmek için bakteriyel peptidoglikan öncülü olan yağ II'yi hedef alır. Bakteri AMP'leri de genelde zarda gözenek oluşturmak için yağ II'yi kullanırlar. Gram negatif bakterilerde AMP'ye direnç geliştiren bir diğer yolu, yağ A'ya fazladan açil zincirler ekleyerek dış zarın sertliğini arttırmaktır (Şekil 2. 2) [138].



Şekil 2. 2 Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde antimikrobiyal peptid direnç mekanizmasının özeti. Bakterilerde geçici yüksek seviyeli AMP direncine yol açan başlıca yollar zar modifikasyonları, artan akış ve proteolitik degradasyondur [149].

2.7 Antimikrobiyal Peptitlerin Potansiyel Stratejileri

Yapılan birçok araştırmada, insan AMP'lerinin, insan konak savunması ve doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir parçası olduğu saptanmıştır [102] [21]. 1922'de bulunan antimikrobiyal protein lizozim hariç, kısa katyonik peptitlerin çoğu 1980'den sonra keşfedilmiştir. Günümüzde 100'den fazla insan AMP'si tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu tanımlama ya da karakterizasyon peptitlerin insan dokularından izole edilmesi ya da biyoinformatik olarak insan genomunun incelenmesi ile öngörülmüştür. Peptitler çeşitli amino asit dizilerine ve fiziksel özelliklere sahiptirler ve bu durum onlara değişik aktiviteler kazandırmaktadır. Örneğin histatinler ve defensinlerin mantarlara karşı etkisi oldukça yüksektir. LL-37 ve defensinler birçok patojene karşı geniş spektrumlu peptitlerdir. İnsan AMP'leri, yüzey moleküllerinden (örneğin hücre duvarları), iç zarlardan hücre içi moleküllere kadar değişen farklı hedeflerle etkileşime geçerek bakterileri öldürebilir. Bazı AMP'ler iki veya daha fazla molekül ile etkileşime girebilir. Örneğin, ilk olarak antimikrobiyal peptit peptidoglikanlara bağlanarak bakteriyi tanırlar ikinci aşamada bakteri hücre zarında gözenek oluşturarak bakteriyi öldürür [150]. Tüm bu özellikler dikkate alındığında, insan AMP'leri amino asit dizisi, üç boyutlu yapı, aktivite ve etki mekanizması bakımından farklılıklar gösterirler. Bu

farklılıklar sayesinde birçok insan AMP'si insan hastalıklarının saptanması ve teşhisinde biyolojik belirteç olarak kullanılabilir [151].

AMP'lerin milyonlarca yıldır korunmuş dizilere sahip olması mikrobiyal direncin bunlara karşı gelişmesinin çok zor ya da olanaksız olduğunu göstermektedir. Bu nedenle insan AMP'leri kullanılarak yeni antimikrobiyaller geliştirilebilir [21]. Özellikle, farklı yapısal iskelete sahip peptitler, aynı bakteriyi farklı mekanizmalarla öldürebilir. Ayrıca, aynı peptit dizisi, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere veya virüsler gibi patojenlere seçicilik gösteren çeşitli peptitlere göre uyarlanabilir [108]. Bu seçicilik, mikrobiyal florayı yok etmeden bakterilerin elimine edilmesi için oldukça önemli görülmektedir. AMPlerin antimikrobiyal ilaç olarak geliştirilmesi, hedef patojenlere karşı etkili olması, in vivo şartlarda, insan hücrelerine düşük toksisite göstermesi, proteazlara karşı dayanıklı olması ve aynı zamanda uygun maliyetli üretiminin sağlanıp sağlanmamasına bağlıdır [152]. Son olarak immün modülasyon peptitleri mikroplara doğrudan etki etmediklerinden antimikrobiyal direncin gelişmesine yol açmazlar ve bu nedenle de AMP'in enfeksiyon tedavisinde kullanımı uygun bir seçenek olabilir [21].

Tüm bu bilgiler ve stratejiler değerlendirildiğinde, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalarla oluşan tedavi edilmesi zor enfeksiyonlara ve kanserlere karşı yeni antimikrobiyal ve antikanser peptitlerin geliştirilmesi önümüzdeki yıllarda öne çıkacak bir konu olacaktır [152].

2.8 Antimikrobiyal Peptitlerin Rekombinant Sentezi

Günümüzde ilaç olarak ticari amaçla üretilen antimikrobiyal peptitlerin yüksek maliyeti firma ve araştırmacıları rekombinant üretim ile maliyet düşürme çalışmalarına yönlendirmiştir. Kimyasal yöntemlerle peptit sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi ve peptitlerin ticari gelişimine sağladığı katkı nedeniyle rekombinant yöntemlerle üretim kimyasal yöntemlerle sentezin gerisinde kalmıştır. Fakat rekombinant yöntemlerin, maliyet düşürme potansiyeli ve kimyasal yöntemlerle sentez aşamasında büyük miktarlarda malzeme gereksinimi peptitlerin rekombinant üretimini hala çekici hale getirmektedir [22].

Peptitlerin rekombinant üretimi için yapılan birçok çalışmada özellikle füzyon proteinleri kullanılmaktadır. Bu sayede hücrel ürün olarak salınan polikationik peptidin, bakteri hücrelerine olan toksisiteside düşük olmaktadır. Hücrel üretim ile elde edilen rekombinant ürünün % 30'undan fazlası basit bir santrifüjleme ve suyla yıkama yoluyla elde edilebilmektedir [153]. Yine hücrel ürün olarak salınan aktif peptitler yüksek kationik özelliklerinden ve düşük moleköl ağırlıklarından dolayı düşük basınçlı kromatografik yöntemlerle de kolayca saflaştırılabilmektedir. Tüm bu yöntemler ve maliyet değerlendirildiğinde peptit antimikrobiyallerin ticari olarak üretiminin rekombinant yöntemler ile sağlanması kazançlı bir işlem haline gelebilir [154].

Antimikrobiyel aktivite gösteren ve ilaç olma potansiyeli yüksek peptitler rekombinant yöntemler kullanılarak bakteriyel sistemlerinde üretilmektedirler. AMP'lerin bakteriyel sistemlerde üretilmelerinde karşılaşılan en büyük sorun, bu peptitlerin bakterilere karşı toksik özellik göstermesidir [155]. Bununla birlikte AMP'ler oldukça küçük moleküller olduğu için saflaştırma işlemi sırasında da ürünün tamamının elde edilmesi olanaklı olmamaktadır. Bu zorlukların aşılabilmesi füzyon proteinlerinin rekombinant olarak peptit dizilerine bağlanması ile mümkün olmaktadır. Böylelikle peptitlerin üretim esnasında konak hücreye olan toksik etkileri ortadan kalkmakta, saflaştırma işlemleri kolaylaşmakta ve elde edilen ürün miktarında da artış olmaktadır. Peptit ekspresyonu için kullanılan birçok farklı türde füzyon proteini bulunmaktadır [156]. Bu füzyon proteinleri hem büyüklükleri açısından hem de protein ekspresyonu açısından farklılık göstermektedir. Rekombinant yöntemlerde kullanılan büyük füzyon proteinleri küçük olanlara göre daha fazla miktarda protein üretmesine karşın proteolitik yıkıma karşı daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Kimi füzyon proteinleri çözünür fraksiyonda ürün verirken bazıları ise çözünmeyen inklüzyon cisimlerinde protein üretilmesine neden olurlar. Genellikle çözünür fraksiyonda protein üretimini sağlayan ve aynı zamanda peptitleri proteaz aktivitelerinden koruyan, saflaştırma aşaması için geliştirilmiş sisteme sahip olan füzyon proteinlerini kullanmak rekombinant sentez için daha avantajlıdır [157]. Örnek olarak, histidin tekrarları, peptidi kodlayan gen dizisinin N- ya da C-terminaline eklendiğinde, peptit, nikel ya da kobalt afinite kolonlarıyla daha verimli saflaştırılabilmektedir. Bunun yanında, glutatyon S-transferaz (GST) gibi füzyon proteinleri doğrudan glutatyon afinite kromatografisiyle saflaştırılabilmektedir [158].

Saflaştırılan füzyon protein/peptit kompleksi füzyon proteininden ya enzimatik ya da kimyasal olarak iki farklı sistem kullanılarak ayrıştırılabilir. İki sistemde de protein/peptit kompleksini kodlayan gen üzerine, füzyon proteini ve peptit arasına enzimin ya da kimyasalın tanıma bölgesi yerleştirilmektedir [159]. Saflaştırma sonrası en son aşama olan enzimatik ya da kimyasal ayrıştırma sonrasında, peptit dizisi üzerinde fazladan bir ya da iki amino asit kalmaktadır [160].

2.9 Antimikrobiyal Peptitlerin Geleceği

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarının memeli hücre savunmasındaki katkılarını ortaya çıkarmıştır. Memelilerde doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları arasında çeşitli antimikrobiyal peptitlerin rol aldığı bilinmektedir [161]. Transgenik farelerle yapılan çalışmalar da yine antimikrobiyal peptitlerin savunmadaki rollerini kanıtlamıştır. Genetik yetersizlikler, gelişimsel bozukluk, kronik iltihaplanma, çevresel toksinler veya eş zamanlı sistemik hastalıkların antimikrobiyal peptitlerin sentezinde nasıl değişiklikler yaratacağı ve hücre savunmasına olan etkisini araştırmak, yeni tedaviler geliştirmek için oldukça önemli fikirler sağlayacaktır. Huttner ve Bevins, antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonu sırasında yaşanabilecek sorunların çeşitli hastalıklara yatkınlık oluşması olasılığını vurgulamışlardır [162]. Örneğin, antimikrobiyal peptit düzeyinde veya aktivitesindeki eksiklik, yenidoğan sepsisi, orta kulak iltihabı, periodontal hastalıklara, idrar yolu enfeksiyonları vb. gibi rahatsızlıkların oluşmasındaki etkisi oldukça büyük olabilir [163]. Hücre savunma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, hücre savunmasının etkinliğini arttıran terapötik stratejilere ışık tutabilir. Antimikrobiyal peptitler, enfeksiyonların tedavisinde topikal veya sistemik ajanlar olarak kullanılabilirler [164]. Peptitler konvansiyonel genler tarafından kodlandığı için, gen tedavisi ile somatik hücrelerde seçilen bölgelere bu peptitlerin genlerinin transferi ile indüklemeler yapılabilir. Yapılan fare deneylerinde, LL-37 / CAP-18'in hücrede aşırı sentezlenmesi, farelerde solunum yolunun antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı kanıtlanmıştır [165].

Antimikrobiyal peptitler ile yapılan çalışmalar sonucunda oldukça yüksek antimikrobiyal etkinlik gösterecek bir peptitin katyonik ve amfifilik özellikte ve çoğunlukta hidrofobik amino asitlerden oluşması gerektiği belirtilmiştir [166]. N veya C

terminalde D-amino asitlerin bulunması proteolitik etkiler karşısında moleküllerin dayanıklılığını arttırmaktadır [167]. Tüm dizisi D-amino asitlerden oluşan sentetik peptitlerin, enzimatik proteolize karşı beklenenden daha iyi direnç sergilediği bilinmektedir [168]. Kısa amfifilik peptitlere D-lizin ve D-lösin amino asitlerin sistematik olarak eklenmesi, peptite çeşitli seçicilik, antimikrobiyal aktivitede artış ve proteazlara karşı direnç gibi kazanımlar sağlamıştır [169]. D-amino asit içeren peptitlerin ticari anlamda sentetik olarak geliştirilmesindeki en büyük engelin toksisite ya da antimikrobiyal etkinlikten daha çok maliyet olduğu belirtilmektedir.

Peptitlerin proteaz aktivitesine direnç gösterebilmeleri için son zamanlarda β -amino asitlerden oluşan antimikrobiyal peptitler üzerinde çalışmalar yapılmıştır [170]. α -amino asitler gibi, bunların da ikincil yapıları α -sarmaldır. Doğal peptitlerin aksine, bu peptitler proteolitik enzimlerin etkisine dirençlidir [171]. Bu Proteazlara karşı sahip oldukları bu direnç, peptitin farmakolojik ömrünü sınırlayan durumlardan etkilenmesini önleyeceği gibi tedavi amaçlı oral yolla verilebilecek ticari bir ürüne dönüşme olanağı da sunmaktadır. Fakat β -amino asitlerden oluşan antimikrobiyal peptitlerin diğer formdaki peptitler gibi mikrobiyal hücreler ile insan kırmızı kan hücreleri üzerinde seçicilik göstermediği bilinmektedir [170].

2.10 Antimikrobiyal Peptitlerin Etkinliğinin Belirlenmesinde Moleküler Modelleme

Yöntemleri

Moleküler modelleme, teorik veya bilgisayar ortamında hesaplamalı olarak moleküllerin gerçekteki yapılarını ve davranışlarını öngörmek (taklit etmek) için kullanılan yöntemlerin tümüne verilen genel isimdir [172]. Sınırlı sayıda atom içeren moleküllerin minimum enerjiye sahip oldukları 3 boyutlu yapıların belirlenmesi için ab initio (kuantum) modellemesi kullanılırken, çok daha fazla atom ve birden fazla molekülün yer aldığı sistemlerdeki mikroskopik etkileşimlerin modellenmesi için “moleküler dinamik” veya “docking” gibi yöntemler kullanılabilir.

Kuantum modellemesinde atomların içerisinde yer alan elektronların çekirdeğin merkezine olan uzaklığa bağlı bulunma olasılık fonksiyonları kullanılarak moleküllerin yapıları, elektronik yük dağılımları, atomlar arasındaki açılar ve bunun gibi parametreler hesaplanabilir. Moleküler dinamikte ise Born-Oppenheimer yaklaşımı

geçerlidir, yani atom çekirdeklerinin hareketleri elektron hareketlerinden bağımsız olarak düşünülebilir ve bu da klasik fizik kurallarının kullanılabilmesine olanak sağlar.

Moleküler dinamik; moleküllerin su veya zar içi gibi gerçekte bulundukları ortamlarda nasıl davrandıklarını belirli algoritmalarla hesaplayarak hareketini ön gören modelleme çeşididir [173]. Newton'un $F=m.a$ hareket denkleminin çözümü, yani kütlesi olan bir cismin kuvvet uygulandığında ivmelendiği prensibine dayanır. Buradaki kuvvet, moleküller içindeki ve/veya arasındaki atomlar arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır. Her bir atom üzerine etki eden kuvvet genellikle her bir parçacığın pozisyon vektörüne bağlı olan potansiyel enerjiden türetilir. Bu potansiyel enerji, Lennard-Jones potansiyel fonksiyonu gibi ampirik olarak tanımlanan bağ yapmayanların potansiyel enerjisi ile bağ yapanların potansiyel enerjileri toplamından oluşmaktadır. Bağ yapanların potansiyel enerjisi, bağlı atom ikililerinin arasındaki bağ enerjisi, üç atomun yaptığı bağlanma açılarının enerjileri ve bağlı dört atomun torsiyonel enerjilerinden oluşmaktadır. Bunlara bağlı olarak moleküler dinamikte her bir zaman adımı sonrası her bir atomun kartezyen koordinat bilgisi Verlet algoritmasının değişik versiyonları ile hesaplanmaktadır [174], [175].

Docking modelleme yöntemi ise algaç adı verilen büyük bir molekül üzerinde genel olarak bağlaç adı verilen daha küçük moleküllerin en düşük enerji ile bağlandığı bölgeyi ve bu enerjinin miktarını sayısal olarak hesaplamak için kullanılan başka bir moleküler modelleme yöntemidir. Docking modelleme yönteminde genetik veya Lamarckian genetik algoritmaları kullanılır. Monte Carlo, Multiscale modelleme, Network Modelleme gibi daha farklı moleküler modelleme yöntemleride kullanılmaktadır.

Bilgisayarlı modelleme yöntemleri mikroskopik zaman ve uzaklık ölçekleri ile laboratuvardaki makroskopik deneyler arasındaki bir köprü gibidir. Deneylerde elde edilen bazı sonuçların arkasındaki detaylar hesaplamalı modelleme yöntemleri ile açıklanabilir. Bir modelleme sonucunu deneysel sonuçlarla karşılaştırabildiğiniz gibi laboratuvar ortamında çok zor olan veya olanaklı olmayan ortamları simülasyon yöntemleri ile incelemek olanaklıdır.

Antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizmalarını anlayabilmek için biyoinformatik yöntemler yardımıyla peptitlerin aminoasit dizileri kullanılarak 3-boyutlu yapıları tahmin sunucusu ile elde edilir ve bu da moleküler dinamikte girdi olarak kullanılır. Antimikrobiyal peptitler aminoasitlerden oluştuğu için ve aminoasitlere ait parametreler önceden yapılmış olan literatürdeki çalışmalarla oldukça iyi tanımlanmış olduğu için bu bilgileri içeren kuvvet alanı parametre kütüphaneleri kullanılabilir. Bu kütüphaneler sayesinde moleküler dinamik öncesi tekrardan kuantum modellemesi yapmaya gereksinim duyulmamıştır. Bu parametrelerin kütüphanelerde var olmadığı durumlarda kuantum modelleme yöntemine başvurmak gerekmektedir.

Özellikle antimikrobiyal peptitler genelde hücre zarı üzerine etki ederek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri için genelde moleküler modellemeleri zar, zar üzerindeki sulu ortam içinde ve arayüzlerinde gerçekleştirilmektedir. Zar modellemesi yine literatürde iyi tanımlanmış yağ molekülünün çift katmanlı yapısının oluşturulması ile olanaklıdır. Bunun için gerekli parametreler kuvvet alanı kütüphanelerinde geliştirilmiştir [176]. Modellemenin doğru yapılabilmesi için buradaki önemli noktalardan biri zarın biyolojik olarak gerçeğe en yakın şekilde ait olduğu organizmaya özgül zar kompozisyonunun oluşturulmasıdır ve bu VMD gibi görselleştirme için kullanılan paket programlarla yapılabildiği gibi literatürde bu konu hakkında özel çalışmalar da bulunmaktadır [177]. Antimikrobiyal peptitlerin, antimikrobiyal etkisinin, metabolik öneme sahip bazı proteinlerin işlevini bozarakta olabileceği düşünüldüğünden önemli görülen bazı proteinlere AMP'lerin nasıl bağlandıkları, moleküler modelleme yöntemi olan docking yöntemi ile incelenmektedir. Bağlanma enerjisi hesaplamaları sonucunda iyi bağlanma gösteren molekülünün inhibisyon mekanizmalarının ne şekilde olduğu görselleştirilerek incelenebilmektedir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Materyal

Çizelge 3. 1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aygıt ve Sarf Malzemeleri

EKİPMAN VE SARF MELZEME	MARKA
Saf su aygıtı	Advantage Milli-Q
Karbondiyoksitli inkübatör	Thermo Scientific - 371
İnvert ışık mikroskobu	Zies Primo Vert
Işık mikroskobu	Leica DM500
Floresan mikroskop	Zeis
Elektron mikroskop	Jeol, JEM-1011
Biyogüvenlik kabinleri	Thermo Scientific Safe2020
Hassas terazi	Shimadzu Uni bloc
pH metre	Hanna pH211
Otoklav	Nüve – OT 90L
Su banyosu	Nüve – ST30
Derin dondurucular	Kirsch
İnkübatör	Thermo Scientific Hera Therm

Çizelge 3. 1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aygıt ve Sarf Malzemeleri (devamı)

Santrifüjler	Thermo Scientific Labofuge 400 / SL 16R
Vortex	VWR – VV3
ELISA çoklu plaka okuyucu	Thermo Scientific
10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik pipet uçları	Axigen
10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik mikropipetler	Thermo Scientific
1, 2, 15, 50 ml'lik santrifüj tüpleri	Isolab
ELISA 96 kuyulu plakalar	CytoOne - F Orange Scientific - U
Hücre kültürü flaskları	CytoOne
Pipet tabancası	Thermo Scientific
1, 5, 10 ml'lik serolojik pipetler	SPL Life Science
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
50-1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler	Isolab
2,5 ml'lik enjektör	Set Medikal
0,22 µm ve 0,45 µm'lik şırınga filtreleri	Sartorius Stedim Biotech Minisart
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific
Tüp stantları	Isolab
Spinfüj	Biosan FVL 2400N
Ultramikrotom	Leica EM UC7
Grit	Sigma

Çizelge 3. 2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

MADDE ADI	MARKA
Müller Hinton Agar besiyeri	Salubris
Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri	Merck
SYBR Green floresan boya	TİBO, Tibo gold
Tris Base	Sigma
Sodyum klorür, NaCl	Merck
Hidroklorik asit, HCl	Merck
Sodyum hidroksit, NaOH	Merck
Triton X 100	Sigma
DMSO	Sigma
Sitotoksisite deney kiti	CytoScan™ SRB Cell Cytotoxicity Assay kit
DMEM	BioShop
FBS	BioShop
Tripan mavisi	Sigma
Tris EDTA	Sigma
PBS	Merck
Gluteraldehit	Merck
Ozmiyum tetroksit	Merck
Etanol	Sigma
Propilen	Sigma
Epon	Sigma

3.1.1 Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.1.1 Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Toz haldeki Luria-Bertani besiyerinden 25 g tartılır, hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Otaklavla steril hale getirildi, +4°C’de saklandı.

3.1.1.2 Tris – Salin Hazırlanması

10mM Tris, 150mM NaCl hazırlandı, cam bir şişede karıştırıldı pH7.2 olacak şekilde ayarlandı, 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilip steril edildi, +4°C’de saklandı.

3.1.1.3 DMEM Medyumun Hazırlanması

500 ml DMEM içerisine 2,5 ml penisilin – streptomisin (10 mg/ml) eklenerek stok besiyeri hazırlandı. Hücre kültürü ve sitotoksisite testinde kullanılmak için stok besiyerinden 45 ml alınıp üzerine 5 ml FBS eklenerek %10 FBS içeren besiyeri hazırlandı ve +4°C’de steril bir şekilde saklandı.

3.2 Yöntem

2011 yılının Aralık ayında başlayan deneysel çalışmalar 2017 yılının Temmuz ayında tamamlanmıştır. Altı yıl süren bu tez çalışmasında uygulanan yöntemler aşağıda belirtilen başlıklar ile sıralanmıştır.

3.2.1 TN Antimikrobiyal Peptitlerin Moleküler Modelleme ile İncelenmesi

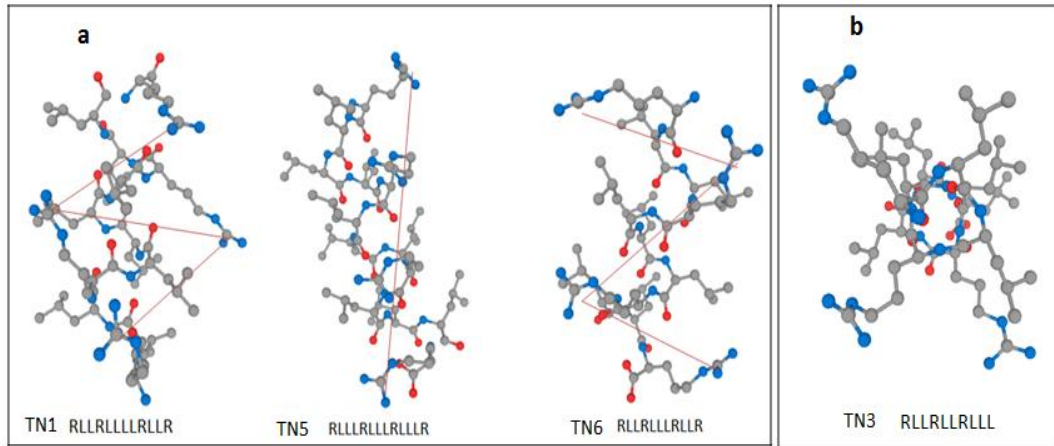
Bu çalışmada geliştirilen katelisinin benzeri peptidlerin genel yapısı, doğada birçok farklı canlıda bulunan katelisinin ile benzer, korunmuş amino asit dizilerine sahip ve insan katelisinin LL-37’nin yapısından esinlenerek tasarlanmıştır. AMP’lerin amino asit dizilerine NCBI incelenerek ulaşılmıştır. Hesaplamalı modellemede, Intel Xeon çok çekirdekli iş istasyonunda paralel çalışan “NAMD 2.11” yazılım [178] programı kullanılarak moleküler dinamik (MD) simülasyonlar, “CHARMM27 all-atom force” alanı [179] ile yapılmıştır. Peptitlerin üç boyutlu yapıları, PEP-FOLD3 sunucusu [180] kullanılarak, moleküllerin olası yapısıyla ilgili %99 oranında doğru sonuç vererek belirlenmiştir (Şekil 3. 1). Bu peptidlerden deneysel olarak en iyi antimikrobiyal aktivite

gösterenler, “VMD zar plug-in versiyon 1.1” [181] kullanılarak zar üzerine yerleştirildi. Deneylerle tutarlı olması için, bakteri zarıyla uyumlu ve bakteri zarının büyük bölümünü oluşturan 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (POPE) yağ molekülleri ile zar modeli oluşturuldu. Kübik simülasyon kutusu içindeki zar yapısına su molekülleri ve sistemin nötralizasyonu için klorür iyonları eklendi [182]. Bu işlemlerin herbiri VMD de bulunan Tcl komutları ile yapıldı [181]. İlk simülasyonda yağ kuyrukları dışındaki her şey düzeltilmiş ve su moleküllerinin hareketi başlatılmıştır. Ardından protein molekülleri sisteme eklenmiş ve denge çalışması yapılmıştır. Enerji minimizasyonu ve protein ile dengeleme sonrası, harmonik kısıtlamalar ile tüm sistem 2 ns için dengelendi. Dengeleme sonrası 2 ns (nanosaniye) daha simülasyon yapılmıştır.

Tüm yörüngeler analiz için her 2 ps'de (pikosaniye) saklandı. Simülasyonlar boyunca, uzun menzilli elektrostatik etkileşimler Parçacık Mesh Ewald yöntemi (PME) [183] ile işlem gördü ve periyodik sınır koşulları altında van der Waals etkileşimleri için 12 Å kesme mesafesinde kesilme ve 10 Å'da dönüşüm uygulandı. Tüm bu NPT topluluk simülasyonları, 310K sıcaklık ve 1 atm'lik normal basınç altında fizyolojik koşulların siliko karşılığında yapıldı ve her ikisi de Langevin dinamikleri tarafından kontrol edildi. Analiz boyunca, görüntüler için Discovery Studio Görselleştirici versiyonu 16.1 [178] kullanıldı.

Tasarlanmış peptitlerin su ve / veya zar ortamındaki bireysel veya kendi kendine kümelenmiş dinamik davranışının yanı sıra, dinamik etkileşim davranışları, özellikle mikroorganizmalar için yaşamsal işlevleri olan belirli bir zar proteini ile de ilgilendik. Bu amaçla seçilen protein, Protein Data Bank'tan alınan bilinen üç boyutlu kristal yapıya (PDB kodu 3VMT) sahip *S. aureus* zara bağlı glikoziltransferaz molekülü idi. Bu davranışı araştırmak için zarın üst yüzeyine yapışan bu zar proteini ile kompleksleşmiş bu iyi performans gösteren peptidlerden birinin moleküler dinamikler (MD) simülasyonunu yaptık. Moleküler dinamik simülasyonundan önce, girdi yapılarının hazırlanması sırasında moleküler yerleştirme, proteinin serbestçe mevcut olan yüzeyi üzerindeki peptitlerin en iyi bağlanma konumlarını, yani zar ile temas halinde bulunmadığını bulmak için gerçekleştirildi. Bu yerleştirme simülasyonları, hesaplama yoluyla bu tür kompleksler arasındaki etkileşimi öngörmek için yaygın kabul görmüş bir rijit-vücut proteini-protein yerleştirme sunucusu olan GRAMM-X [184] internet tabanlı bir hizmet

kullanılarak gerçekleştirildi. Peptid TN3'ün peptidoglikan glikoziltransferaz yapısının zara nüfuz etmeyen kısmına yerleştirme simülasyonu gerçekleştirildi ve bu yerleştirilmelerden örtüşmeyen en iyi bağlanma enerjisine sahip 4 pozisyon seçildi. Proteinin yüzeyindeki bu 4 farklı şekilde konumlandırılmış TN3 peptidi ile birlikte, moleküler dinamik simülasyonu için girdi yapısını oluşturmak için proteinin yüzeyini algılayabilecek yeterince yakın ama rastgele konumlandırılmış TN3 peptitleri peptidoglikan glikoziltransferaz ile bir araya getirildi. POPE zar modeline bağlı olan bu 9 peptit-protein kompleksi, önceki MD simülasyonları için aynı yöntem izlenerek açık su molekülleri içerisinde toplam 4 ns için simüle edildi. Bu çalışmaya Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Mühendisliği öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuğba Arzu Özal İldeniz katkı sağlamıştır.



Şekil 3. 1 TN AMP'lerin PEP-Fold programı ile belirlenmiş olası üç boyutlu yapısı a: Arg'lerin artı yüklü yan gruplarının doğrusal bir eksen üzerinde sarmal omurga boyunca yerleşimi; b: hidrofobik uçta Arg'nin olmayan üç kollu tirbuşon benzeri yapı

3.2.2 Antimikrobiyal Peptitlerin Sentezi

Tasarlanan peptitler, hizmet alımı karşılığında Fmoc peptid sentezleme yöntemine göre Metabion firması (Almanya) tarafından sentezlenmiş ve liyofilize olarak hizmet alımı karşılığında tarafımıza gönderilmiştir [185]. Tasarlanmış ve sentetik olarak sentezlettirilmiş olan TN 1 – 7 AMP'lerin özellikleri Çizelge 3. 3'de bulunmaktadır.

Çizelge 3. 3 Tasarlanmış ve sentetik olarak sentezlettirilmiş olan TN 1 – 7 AMP’lerin özellikleri

Peptid	Dizi	Moleküler ağırlık (g/mol)	pH7 net yükleri	İzoelektrik nokta	% Hidrofobisite
TN1	RLLRLLLLRLLR	1548,02	4	pH 12,58	%67
TN2	KLLKLLKLLL	1194,64	3	pH 10,98	%70
TN3	RLLRLLRLLL	1278,68	3	pH 12,4	%70
TN4	RLLRLLRLLLLL	1618,15	3	pH 12,4	%77
TN5	RLLRLLLRLLLR	1661,18	4	pH 12,58	%70
TN6	RLLRLLLRLLR	1434,86	4	pH 12,58	%64
TN7	RLLRLLRLL	1165,52	3	pH 12,4	%67

3.2.3 Kullanılan Bakteri Kökenleri

Toplum sağlığını en çok tehdit eden ve hastane enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğunu oluşturan, özellikle son zamanlarda antibiyotiklere karşı geliştirdikleri dirençten dolayı ön plana çıkan Gram pozitif kok olan *S. aureus*'u ATCC 29213, fermentatif gram negatif basiller için *E. coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031 (*K. pneumonia*) ve fermentatif olmayan gram negatif basiller için *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*) 'yı peptitlerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için minimal inhibitör konsantrasyon testinde kullanmayı tercih ettik. Bakteri kökenleri Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi araştırma laboratuvarlarından temin edilmiştir.

3.2.4 Antimikrobiyal Aktivite

Minimal inhibitör konsantrasyonu, mikroorganizmanın üremesini engellendiği en düşük ilaç konsantrasyonunu saptamak için yapılan standart bir testtir. Peptit antibiyotik minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) deneylerinde standart olarak kullanılan Gram negatif ve Gram pozitif bakteri suşları kullanılmıştır (Çizelge 4. 1).

Kullanılacak bakteri suşları hazır olarak alınan Müller Hinton agara ekilip bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün üremesi olan bakterilerden 1x10⁵CFU/ml olacak şekilde LB sıvı besiyerinde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakada LB besiyeri içinde peptit antibiyotiklerin 512 µg/ml’den başlayarak 0.5 µg/ml’ye kadar seri seyreltimleri yapılmıştır ve üzerlerine hazırlanan bakteri süspansiyonlarından eklenmiştir. 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün sonuçlar değerlendirilmiştir [186]. Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi araştırma laboratuvarları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5 Hemolitik Aktivite ve Sitotoksisite

Kanla etkileşim deneyleri, tasarlanan moleküllerin kan, doku veya organlar üzerine olabilecek olası toksik etkilerini incelemek amacıyla yapılmaktadır. Bu deneyler kapsamındaki hemolitik etki testi, hemolitik maddenin kanla temasının eritrosit kaybı / hasarı yapması sonucu serbest plazma hemoglobin seviyesinde meydana getirdiği artışın ölçümüdür. Bu amaçla, test ve kontrol maddelerinin ya da ekstraktlarının insan kırmızı kan hücreleri ile teması sonucunda saldıkları hemoglobin düzeylerinin spektrofotometrik olarak ölçümü yapılır ve buna göre aşağıdaki formül ile maddelerin % hemolitik aktiviteleri hesaplanır.

$$\% \text{ liziz} = \frac{\text{OD}_{414} - \text{OD}_{414}(\text{blank})}{\text{OD}_{414}(\text{total liziz} - \text{blank})} \times 100$$

Bu çalışmada hemolitik aktivite deneyini yapmaktaki amaç AMP’lerin hemolitik aktivitesini karşılaştırabilmek ve hangi derişimlerde HC₅₀ ve üzeri etki yaptığını anlamak içindir. % hemoliz değerlerini belirlemek için %100 hemoliz yapan Triton-X 100 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Taze insan kanından 30 µL alıp, 10 mL TRIS Salin (Steril, 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.2) ile süspanse ettik. 3 kez ard arda, süspansiyonu 5 dakika 1500 rpm’ de santrifüj ettik, süpernatantı attık ve peleti TRIS Salin ile tekrar resüspanse ettik. TRIS Salin içerisinde seri seyreltme ile antimikrobiyal aktivite testinde kullandığımız peptit dozlarının miktarlarını bu test içinde hazırladık ve 0,22 µm por çaplı filtreden geçirerek steril ettik. İnsan kırmızı kan hücreleri ile hazırlanan süspansiyondan 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL dağıttık, üzerine her bir peptit dozundan ayrı kuyucuklara 100 µL ekledik (ilaçların her bir dozu için 3 tekrarlı

çalışma yaptık ve kontrol olarak % 100 hemolitik aktivite gösteren Triton X 100 maddesini DMSO içinde %20 oranında seyrelterek kullandık). Hemolitik aktivite için hazırlanan 96 kuyucuklu plakayı 37°C de 30 dakika inkübasyona bıraktık. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakayı 10 dakika 1500 rpm de santrifüj ettik. Spektrofotometrik değerlendirme için her kuyucuğun üst sıvısını yeni 96 kuyucuklu plakaya aktardık. 414 nm’de plaka okuyucu spektrofotometre cihazı ile her bir kuyucuğu okutarak hemolitik aktivitelerini analiz ettik [186].

Yapısal olarak farklılık gösteren birçok madde ya da fiziksel etkenler, hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksositeye neden olabilirler. İlaç olarak kullanımı hedeflenen bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hayvan deneylerinden önce hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gerekmektedir. İlaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin sitotoksik özelliğe sahip olup olmadıklarını değerlendirmek için in vitro olarak hücre kültürlerinde gerçekleşen yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle kısa sürede maddelerin incelenmesi olanaklı olmakta ve bir sonraki basamak olan hayvan deneyleri için temel veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Farklı mekanizmalara ve duyarlılıklara sahip çok sayıda sitotoksosite testi bulunmaktadır [187].

Biz bu çalışmada peptitlerin ökaryotik hücrelerde oluşturabileceği hasarın değerlendirilmesi için Sülförödamın B ile kantitatif hücre proteinleri boyamaya dayalı CytoScan™ SRB Cell Cytotoxicity Assay kitini kullandık. İlk olarak HeLa (ATCC CCL-2) hücre hattını uygun kültür koşullarında çözerek deneye hazır hale getirdik. Hücreleri % 10 fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penisillin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco’s modified Eagle’s Medium (DMEM) besiyerinde 37°C’de %5 CO₂’li etüvde inkübe ederek büyümelerini sağladık. Büyüme gerçekleştikten sonra % 80-85 oranında hücre kültür flasklarının alt yüzeyine yapışmış olan HeLa (ATCC CCL-2) hücrelerinin bulunduğu besiyerini hücreler kaldırılmadan pipetle çekip attık. Besiyerinin ortamdan iyice uzaklaşması için 1x fosfat tamponu ile hücreleri kaldırmadan bir kez yıkadık ve pipet ile çekip çözeltiyi uzaklaştırdık. Daha sonra üzerine %0.25 Trypsin-EDTA ekledik 10 dakika 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde beklettik. İnkübasyon sonrası hücreleri %0.25 Trypsin-EDTA içinde süspanse ettik. Hemositometride hücre sayımı yapabilmek için bir miktar hücreyi Tripan mavisi ile

boyadık. Hücre sayımından sonra her bir kuyuda 200 µl besiyeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara hücreleri ektik. 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde beklettik.

Ertesi gün hücrelerin üzerine eklenecek peptitlerin dozlarını seri seyreltme yöntemi ile 200 µl besiyeri içerisinde 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml derişimde olacak şekilde hazırladık. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyulardan besiyerleri nazikçe çekildikten sonra her bir kuyuyu PBS ile bir kere yıkadık. Uygun peptit antibiyotik dozları ile hazırlanmış besiyerlerini kuyucuklara ekledik ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 18-24 saat arasında inkübasyona bıraktık. Maddelerin sitotoksik etkisini anlamak için kullandığımız SRB boyasının hücreler ile etkileşimini değerlendirmek için ise sadece HeLa (ATCC CCL-2) hücreleri bulunan kuyuları kontrol olarak kullandık. Inkübasyon sonrası kuyucukları SRB sitotoksisite kitinin protokolünü izleyerek boyadık ve uygun dalga boylarında 96 kuyucuklu plaka okuyucu ile okutularak sonuçların analizlerini yaptık. Örnekleri her konsantrasyon için 3 tekrarlı olarak çalıştık. Aynı şartlarda ilaçsız inkübe ettiğimiz hücreleri kontrol olarak kullandık [188] [189]. Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi araştırma laboratuvarları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6 Transmisyon Elektron Mikroskobu

Bakterilerde antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler) neden olduğu ince yapısal değişiklikleri incelemek için transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) kullanılmaktadır. TN1 peptidimizin bakteri hücresindeki hedefini anlamak için TEM kullanılmıştır. *S. aureus* hücreleri, 15 dakika boyunca 64µg/ml derişimde TN1 ile 37 °C'de inkübe edildi. Bakteri örneklerinin %2,5'luk 0.1 M fosfat tamponlu (pH 7.2) gluteraldehit fiksatifisi içerisinde +4°C'de 4 saat fiksasyon ve daha sonra, %1'lik ozmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yaptık. Fiksasyon aşamalarından sonra bakteri örneklerini fosfat tamponuyla yıkayıp agar içerisine gömdük. Örnekleri derişimi yükselen alkol serilerinden (%50, %70, %90, %96, %100) geçirerek dehidrate ettikten sonra propilen oksitten geçirerek epon 812'ye gömdük ve 60°C'de 1 gece boyunca polimerizasyon için inkübe ettik. Ultramikrotomda (Leica EM UC7) gridler üzerine aldığımız yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitleri uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastladık. İnce kesitleri,

transmisyon elektron mikroskobu (Jeol, JEM-1011) ile görüntüledikten sonra detaylı inceleme için dijital kamera ile görüntülerin fotoğraflarını aldık [190]. Bu çalışmaya Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji bölümü doktora öğrencisi Merve Açikel Elmas katkı sağlamıştır.

3.2.7 Floresan Mikroskopu

Tasarladığımız peptitlerin antimikrobiyal etkisini, bakteri zarına gösterdiğini düşündüğümüz için SYBR Green boyası kullanarak peptitin etkisini daha iyi anlayabilmek için bir deney tasarladık. Bilindiği gibi SYBR Green boyası DNA boyamak ve görüntülemek için kullanılan floresan bir boyadır ve canlı hücrelerde hücre zarlarından çok yavaş geçebilmektedir [191].

Bu bilgiye dayanarak, peptitin içine işlediği zardan, zarar görmemiş hücre zarına göre SYBR Green boyasının hücre içine daha hızlı bir şekilde geçeceğini düşündük. Hücre içine geçen SYBR Green boyası sitoplazmada bulunan DNA'ya bağlanarak ışımaya vereceğinden bu görüntüyü uygun dalga boyunda floresan mikroskopu kullanarak görüntüleyebileceğimizi ve hatta minimal inhibitör konsantrasyonunu saptamak için geliştirilebilecek bir yöntem olarak da değerlendirilebileceğini öngördük.

Deneyde kullandığımız SYBR Green boyasını stok çözeltisinden (Invitrogen, ABD), 1/500 oranında seyrelttik. Peptitlerimizi 1/512 $\mu\text{g/ml}$ 'den başlayarak 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar LB besiyeri içinde seyrelttik. Mikroskopta daha iyi görüntü alabilmek için bakterilerimizi LB besiyeri içinde 1×10^{16} CFU/ml olacak şekilde süspanse ettik. Tasarlanan peptitler ile bakterileri bire bir oranında karıştırarak 15 dakika 37°C'de inkübe ettik. İnkübasyon sonrası lam lamel arasında seyrelttiğimiz SYBR Green ile her bir bakteriyi ayrı ayrı 1'e 4 oranında karıştırıp floresan mikroskopta (Zeiss, Almanya) görüntüledik ve daha detaylı yorumlamak için görüntülerin fotoğraflarını çektik. Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi araştırma laboratuvarları kullanılarak yapılmıştır.

4.1 Antimikrobiyal Peptidlerin Tasarımı ve Olası Yapısı

Peptitler, katelisidin LL-37'nin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu bilinen C-terminal bölgesindeki homolog dizilerin yapısal özellikleri göz önüne alınarak tasarlanan TN peptitlerin yapısında, omurganın bir tarafında bakteri hücre zarının fosfolipidlerini hedefleyen hidrofobik amino asitler, omurganın diğer tarafında pozitif yüklü amino asitleri içeren alfa sarmal bulunmaktadır.

Bu yapıda, bir pozitif yüklü amino asit ve iki ila dört arasında değişen hidrofobik özellikte amino asit bulunmaktadır. Peptitlerin yapısında, katelisidin LL-37'den daha etkili olabilmesi için zara daha sıkı tutunması sağlayacak , en uzun ve en büyük pozitif yüklü yan zincire sahip arginin (Arg) ile en uzun hidrofobik yan zincire sahip olan lösin (Leu) amino asitleri bulunmaktadır. Pozitif yüklü amino asitlerin, fosfolipid zarının negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime gireceğini, hidrofobik bölümün ise zar içine gömüleceğini öngördük. Bütün bunları dikkate alarak, Leu ve Arg zengin farklı peptitler tasarladık. Tasarımımız olan peptitlerde en büyük pozitif yüklü yan zincire sahip arginin kullandığımızdan antimikrobiyal etkinliği açısından arginiden daha küçük pozitif yüklü yan zincire sahip olan lizin ile arasında nasıl bir fark olacağını anlayabilmek için TN3 ile benzer olan fakat arginin yerine lizin kullandığımız TN2'de tasarımımız olan peptitler arasındadır.

Peptitleri tasarlanırken moleküllerin üç boyutlu olası yapılarını görmek ve çıkan sonuçlara bu yapıların etkisini anlamak için PEP-FOLD programını [180] kullandık. Tasarladığımız peptitler TN1-7 Çizelge 4. 1’de yer almaktadır.

4.2 TN Antimikrobiyal Peptidlerinin Antimikrobiyal Etkinlik Sonuçları

TN AMP’lerin, *S. aureus*’u ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumonia* ATCC 10031 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde yapılan minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) Çizelge 4. 1’de gösterilmektedir. TN peptitlerin bir kısmı, EUCAST tarafından raporlanan verilere göre, bakteriyel enfeksiyonun tedavisi için kullanılan pek çok antibiyotikten daha düşük derişimlerde aktivite göstermiştir. Örneğin, penisilin türevi olan ampisilinin *E. coli* ATCC 25922 için MİK değeri 8 µg/ml iken, TN1 olarak adlandırdığımız peptitimizin aynı suşa antimikrobiyal aktivite gösterdiği MİK değeri 2 µg/ml’dir. Her uçta arginin içeren TN1, *E. coli*’ye karşı en etkili AMP’dir ve diğer tüm test edilen organizmalara karşı daha düşük derişimde antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir (Çizelge 4. 1). TN1’in amino asit dizisinin ortasında bulunan lösin sayısından bir eksik lösin içeren TN6, *S. aureus*’a karşı 4 kat ve *K. pneumonia*’ya 2 kat daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

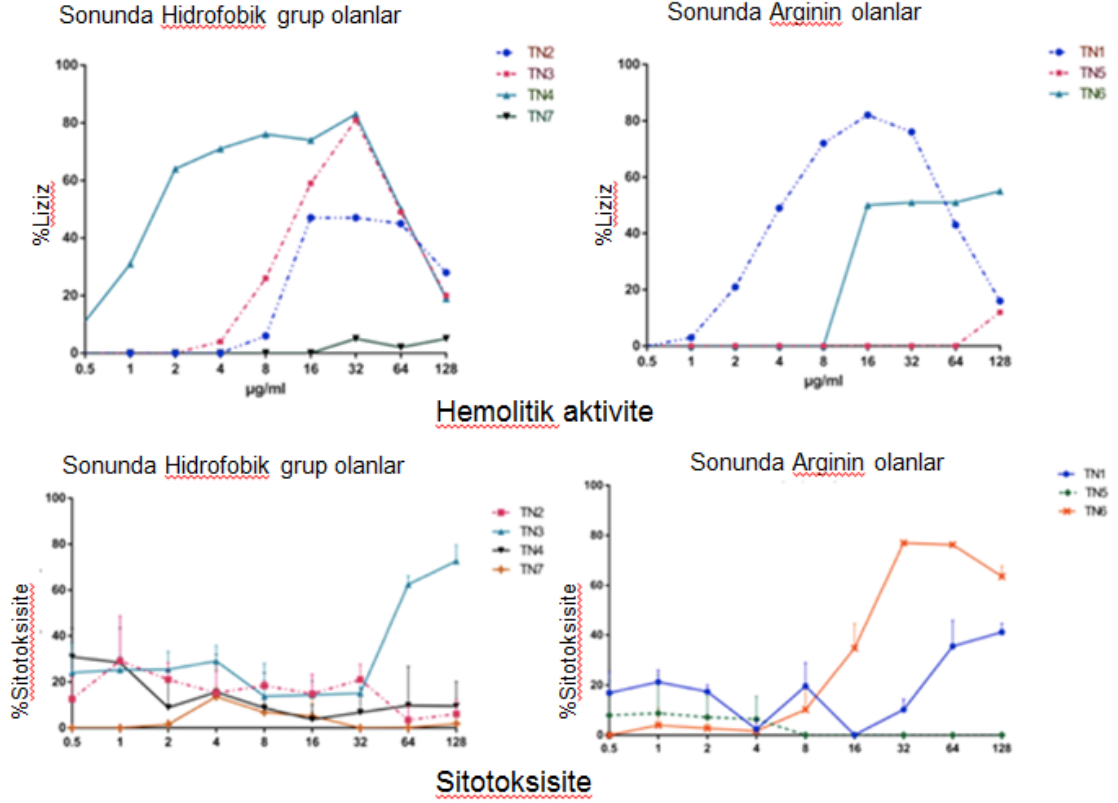
Sadece bir ucunda arginin içeren TN3’ün bakteriler arasında en düşük derişimde *E. coli*’ye etki göstermiştir, fakat *S. aureus*’a TN6 dışındaki diğer peptitlerden daha düşük derişimde antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Karboksi terminalinde diğer peptitlerden 3 fazla lösin bulunan TN4’ün test edilen bakterilerden hiçbirine saptanabilir bir aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. TN6’ya kıyasla her ucunda bir tane daha Leu bulunan TN5 de önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. TN2’de pozitif yüklü amino asit olarak lizinin kullanılması, arginin içeren TN3’ten daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermesine neden olmuştur.

Çizelge 4. 1 TN AMP'lerin minimal inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) sonuçları

Antimicrobial Peptides	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
TN1: RLLRLLLLRLLR	16	2	16	16
TN2: KLLKLLKLLL	64	16	512	> 512
TN3: RLLRLLRLLL	8	4	16	16
TN4: RLLRLLRLLLLL	> 512	> 512	512	256
TN5: RLLRLLRLLLR	>512	> 512	> 512	> 512
TN6: RLLRLLRLLR	4	4	8	32
TN7: RLLRLLRLL	256	64	256	64

4.3 TN Antimikrobiyal Peptidlerinin Hemolitik ve Sitotoksik Etkisi

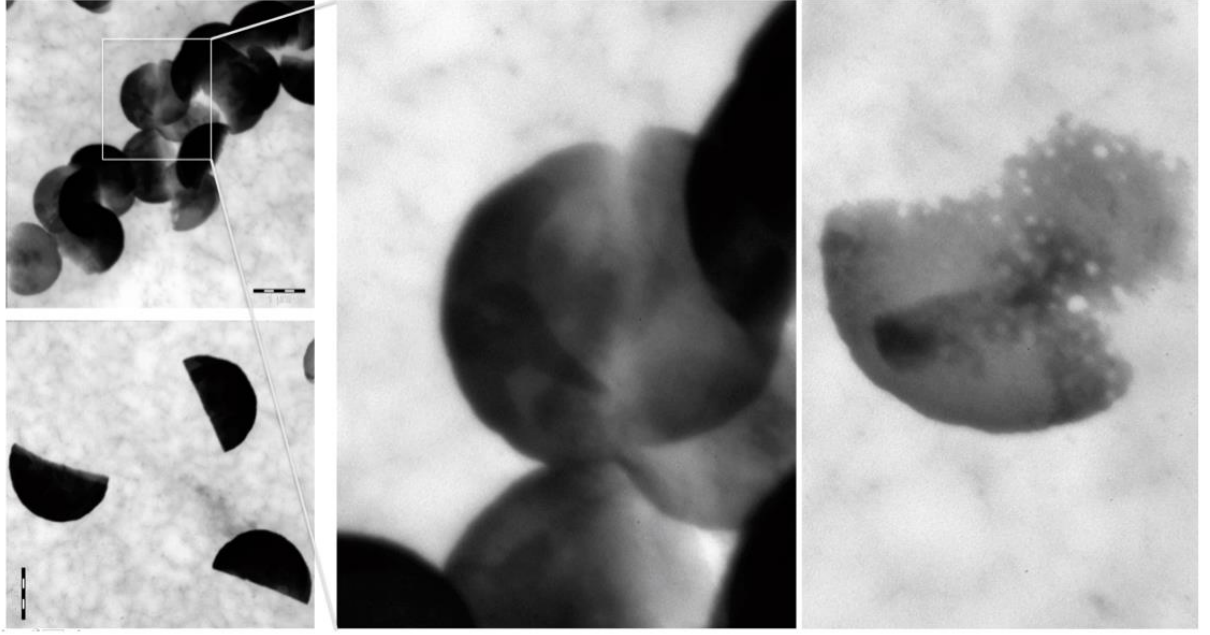
TN AMP'lerin insan kırmızı kan hücreleri üzerindeki etkileri ve HeLa hücrelerine karşı sitotoksiteleri Şekil 4. 1'de gösterilmektedir. Peptitlerin hemoliz oranı Triton-X 100'ün hemoliz oranını karşılaştırıp değerlendirdiğimizde, *E. coli* üzerinde en iyi antibakteriyel etkiye sahip olan TN1'in (MİK 2 $\mu\text{g/ml}$), insan kırmızı kan hücrelerinin %50'sinde (HC_{50}) 16 $\mu\text{g/ml}$ 'de hemoliz oluşturduğunu gözlemledik. Antimikrobiyal etkinlik denemelerinde tüm bakteri türleri için oldukça düşük derişimde etkinlik gösteren TN3 ve TN6'nın, 64 $\mu\text{g/ml}$ HC_{50} 'ye sahip olduğu belirlenmiştir. LL-37'ye kıyasla, TN1'in MİK değeri yaklaşık 10 kat daha düşük iken, HC_{50} 'nin 10 kat daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde TN3 ve TN6 için MİK değeri yaklaşık olarak 5 kat daha düşük iken, HC_{50} yaklaşık 40 kat daha yüksektir ve bu da TN AMP'lerin güvenilirlik indeksinin daha iyi olduğunu göstermektedir [192]. TN1, TN2, TN3 ve TN4'ün hemolitik aktivitesinde 64 $\mu\text{g/ml}$ 'den sonra düşüş görülmüştür. Genel olarak hemolitik aktivite ve sitotoksite sonuçları karşılaştırıldığında, sitotoksite sonuçlarının hemolitik aktivite sonuçlarından daha düşük olduğu görülmektedir. Sonuçlarımızda da görüldüğü gibi TN1 için IC_{50} , 128 $\mu\text{g/ml}$ iken HC_{50} , 4 $\mu\text{g/ml}$ 'dir (Şekil 4. 1).



Şekil 4. 1 AMP'lerin hemolitik aktivite ve sitotoksiste sonuçları. Hemolitik aktivite deneyi insan kan hücreleri kullanılarak 414 nm'de absorbanşı ölçülerek gerçekleştirilmiştir. AMP'lerin sitotoksitesi, sulforo-deamin B ile HeLa hücreleri kullanılarak 560-580 nm arasında absorbanş ölçülerek değerlendirilmiştir (SRB testi G-Biosciences).

4.4 TN Antimikrobiyal Peptidlerinin Bakteriler Üzerine Etkisinin TEM Sonucu

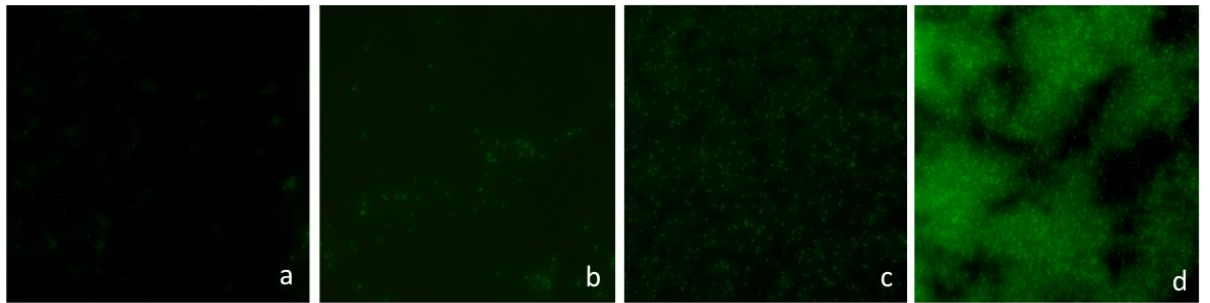
TEM ile yapılan incelemeler sonucunda *S. aureus*'un ortadan iki eşit parçaya bölündüğü görülmüştür. Bölünmenin olduğu yer, yeni duvar sentezinin en aktif olarak yürütüldüğü bölgeye karşılık gelmektedir (Şekil 4. 2).



Şekil 4. 2 TN1 AMP'nin *S. aureus* üzerindeki etkisinin TEM ile incelenmesi. TEM ile elde edilen görüntülerde *S. aureus*, TN1 ile muamele edildiğinde hücrelerin ikiye bölündüğü ve ayrıca zara zarar verdiği görülmüştür.

4.5 TN Antimikrobiyal Peptidlerinin Bakteri Hücre Zarına Etkisi (Floresan Mikroskop ile Değerlendirme)

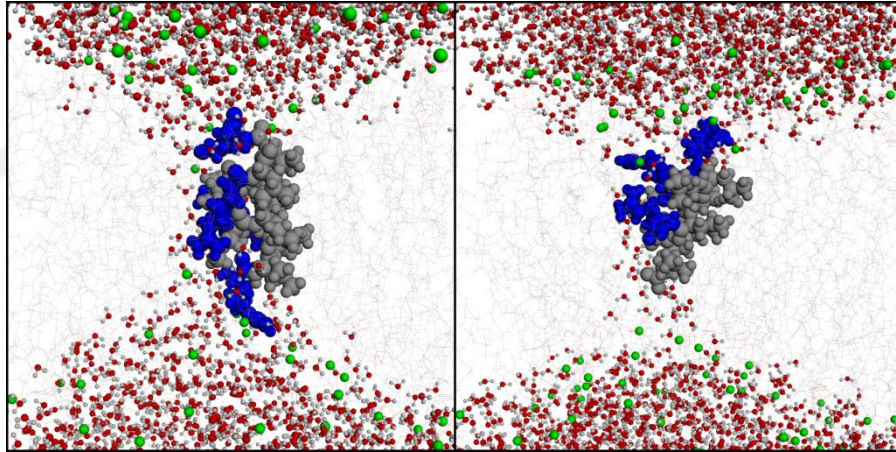
Floresan mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda, sadece SYBR green ile muamele edilen bakteriler ile hazırlanan preparatın herhangi bir ışımada görünmediği görüldü. Bununla birlikte, TN1 ile muamele edilen bakterilerde hücre zarının geçirgenliği değiştiğinden SYBR green boyasının hücre içine girerek DNA'ya bağlandığı ve derişim arttıkça U.V altındaki ışımada artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4. 3).



Şekil 4. 3 Farklı konsantrasyonlarda TN1'nin *S. aureus* hücreleri üzerindeki etkisi sonucu SYBR Green boyasının hücre içine penetrasyonu. (a) *S. aureus* ve SYBR green boyası; (b) 0,5 µg/ml TN1, *S. aureus* ve SYBR green boyası (c) 2.0 µg/ml TN1 *S. aureus* ve SYBR green boyası; peptit konsantrasyonu arttıkça hücrelerin görünürlüğü artmaktadır (d) 4.0 µg/ml TN1 *S. aureus* ve SYBR green boyası; bulanıklık şeklinde ışımaya görülmüştür.

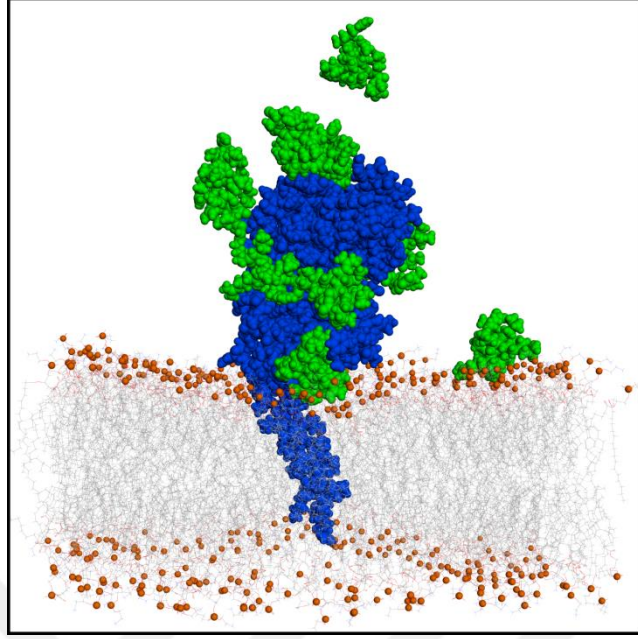
4.6 TN Antimikrobiyal Peptidlerin Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları

Antimikrobiyal etkinlik sonuçlarına göre en aktif olan TN1 ve TN3 AMP'lerinin, zar yağlarıyla olan ilişkisini ve ayrıca TN3'ün, zara bağlı glikoziltransferaz proteini ile olan etkileşimlerini moleküler dinamik simülasyon yöntemleri kullanarak araştırdık. TN1 ve TN3'ün pozitif yüklü argininleri, bakteri zarının iç ve dışındaki yağların negatif yüklü fosfat gruplarını çekerek zar yağlarına entegre olurdıkları ve sonrasında zarın büzüştüğü ve orijinal kalınlığının azaldığı görülmüştür. Zardaki bu incelme ve peptitin zar içine girmesi sonucu oluşan hidrofilik bir kanal ile hücre dışından hücre içine su geçişlerinin meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4. 4). Bu sonuca göre AMP'lerin antimikrobiyal etkisinin nasıl meydana geldiğinde bu simülasyonlar sayesinde anlaşılmıştır. Zardaki bu değişiklik SYBR green ile yapılan deneyin sonuçlarını da desteklemektedir.



Şekil 4. 4 TN1 (solda) ve TN3 (sağda) AMP'lerin bakteri zarı ile etkileşimleri. Zar yağları açık gri renkte gösterilmiştir; su molekülleri kırmızı ve beyaz; fosfatlar yeşil; peptitin hidrofobik kısmı koyu gri, argininler ise mavi renkte gösterilmiştir.

TN3'ün, *S. aureus* bakterisinin hücre duvarının ana maddesi olan peptidoglikanın sentezlenmesinden sorumlu olan glikoziltransferazın aktif bölgesinde dahil birçok bölgesine bağlandığı moleküler dinamik yöntemler kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 4. 5). Bu sonuca göre TN3'ün hücre duvar sentezini de inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Bu durum TEM görüntülerinide desteklemektedir.



Şekil 4. 5 TN3 moleküllerinin *S. aureus*'un hücre duvar sentezinden sorumlu glikoziltransferaza bağlanması. Mavi renkte olan glikoziltransferaz; TN3 molekülleri yeşil; fosfatlar ise kırmızıdır.

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Son yıllarda, küresel bir problem haline gelen antimikrobiyallere karşı direnç, birçok ciddi enfeksiyonun antimikrobiyaller tarafından tedavisini olanaksız hale getirmiştir. Günümüzde antimikrobiyal maddeler, çoğu kez enfeksiyonun neden kaynaklandığı tam araştırılmadan her hastalığın tedavisi için bilinçsizce kullanılmaktadır ve bu durum mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere çok çabuk direnç kazanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ilaç firmaları da yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine olan ilgilerini yitirmişlerdir. Mikroorganizmaların direnç gösteremediği veya en azından antimikrobiyal maddeye direnç kazanmasının çok uzun sürdüğü antimikrobiyaller geliştirmek günümüzde oldukça önemli bir gereksinimdir. Doğada hemen hemen tüm canlılarda bulunan antimikrobiyal peptitler tamda bu önemli gereksinimi karşılayabilecek nitelikte maddelerdir. Antimikrobiyal peptitler doğada milyonlarca yıldır bulunmalarına rağmen mikroorganizmalar hala bunlara karşı tam anlamıyla bir direnç geliştiremediği için birçok mikroorganizma türüne karşı oldukça iyi antimikrobiyal etkinlik göstermektedirler. Günümüzde yapılan birçok araştırmada mikroorganizmaların antimikrobiyal peptitlere karşı direnç geliştirmekte zorlanmasının nedenini peptit antibiyotiklerin genellikle hücre zarlarını hedef almalarından kaynaklandığını belirtmektedirler. Enzimleri hedef alan antimikrobiyal maddelere karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmesi genellikle ilaç bağlanma yerini değiştiren tek bir mutasyon sonucunda meydana gelmektedir. Bu mutasyon mikroorganizmanın antimikrobiyal maddeye karşı direnç kazanması için yeterli olduğundan, bu yapıdaki antimikrobiyallere karşı direnç oldukça hızlı gelişmektedir. Bunun aksine, mikroorganizmaların hücre zarlarını hedefleyen antimikrobiyal maddelere karşı direnç

geliştirmek için zarların yapısında bulunan yağları değiştirmek gerekmektedir. Bu da mikroorganizma tarafından zar yağlarının sentez yolağının önemli bir bölümünün değiştirilmesini gerektirmektedir. Böyle bir değişiklik için mikroorganizma tarafından başarlisa bile, genellikle organizma için zararlıdır. Büyük bir olasılıkla bu tür zar değişiklikleri gösteren bakteriler sonucunda oluşan mutantlar yapılarında meydana gelen bu önemli değişikliklerden kurtulamıyor ya da patojen özelliklerini kaybediyor olabilirler. Tüm bu bilgiler sonucunda, yeni AMP'lerin geliştirilmesi antimikrobiyal dirençle mücadele için oldukça önemli bir olanak sunmaktadır.

Bu çalışmada alfa sarmal yapıya sahip olmaları ve antimikrobiyal etkinliklerinin oldukça geniş olması nedeni ile katelisinler model olarak seçilmiş ve yapısal olarak benzerlik gösteren AMP'ler tasarlanıp geliştirilmiştir. Katelisinlerin genel yapısında alfa sarmal omurganın bir tarafında hidrofobik amino asitleri ve aralarında birkaç amino asitte bir tekrarlayan pozitif yüklü amino asitleri bulunur. Bu yapıdan yola çıkarak tek grup hidrofobik ve pozitif yüklü amino asit içeren daha basit ama benzer yapıda alfa sarmal AMP'ler tasarlamaya çalıştık.

Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sesropin A ile magainin peptit antibiyotiklerinin birleşiminden elde ettikleri antimikrobiyal etkinlik gösteren dizinin amino asit dizisine benzer yapıda, fakat kendi içlerinde farklı amino asit dizilerine sahip beş farklı peptit tasarlamışlardır. Bu beş peptit arasında pozitif yüklü amino asit olan lizin ve hidrofobik amino ait olan lösinden zengin P5 peptitinin, örnek aldıkları doğal peptide ve diğer tasarladıkları peptitlere göre en iyi aktivite gösterdiği belirtilmiştir [193]. Bu çalışmanın sonuçları, tasarladığımız arginin ve lösinden zengin AMP'lerimizin sonuçlarını desteklemektedir. Park ve arkadaşları pozitif amino asit olarak lizin kullanarak AMP'ler tasarlamışlardır. Biz ise lizin yerine, daha büyük bir moleköl yapısına sahip ve pozitif yükü daha fazla olduğu için hücre zarına daha sıkı tutunup daha iyi delebileceğini düşündüğümüzden, tasarımlarımızda pozitif yüklü amino asit olan arginini tercih ettik. AMP'lerimizin tasarımında Lys veya Arg kullanmanın antimikrobiyal etkiyi nasıl değiştireceğini anlamak için, TN2'de bulunan Lys'lerin TN3'deki Arg'ler ile değiştirilmesi dışında başka bir farklılık içermeyen TN2 ve TN3 (Çizelge 4. 1) AMP'lerini tasarladık. Tasarladığımız TN3 AMP'sinde lizin yerine arginin kullanılmasının farklı bakteri türlerinde antibakteriyel aktiviteyi 4 ile 32 kat arttırırken hemolitik aktiviteyi bir

kat arttırdığı, sitotoksitede ise TN3'ün 32µg/ml sonrasında IC₅₀ 'nin üzerine çıktığı görülmüştür. AMP'lerin hemolitik aktivitesinin genellikle 64µg/ml'den daha yüksek derişimlerde azaldığı görülmüştür. Bunun nedeninin, AMP'lerin kritik misel derişimini aştığı için, AMP'lerin, hücreler yerine kendileri ile etkileşime geçerek, hücre zarına bağlanmalarının engellenmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tasarladığımız AMP'lerin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesinin insan kırmızı kan hücresi üzerine olan hemolitik etkilerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

Bakteriler üzerinde belirgin aktivite gösteren TN1 ve TN3'ün IC₅₀'si (hücrelerin % 50'sinin büyümesini inhibe eden konsantrasyon) sırasıyla 126 ve 64µg/ml'dir, buna karşılık HC₅₀'si sırasıyla 4 ve 8µg/ml'dir. Hemolitik aktivite ve sitotoksitede sonuçlarına bakıldığında farklı hücre tiplerinin TN AMP'lerine karşı farklı hücre tiplerine karşı farklı duyarlılıklara sahip oldukları görülmektedir. Bu AMP'ler gelecekte tedavi amaçlı kullanım için umut verici olsalar da, vücudun farklı bölgelerindeki hücelere olabilecek toksik etkileri mutlaka dikkate alınmalıdır.

Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları , katelisin LL-37'nin antimikrobiyal aktivite gösteren amino asit dizisinden 12 amino asitlik küçük bir bölümün antibakteriyel etkisini karşılaştırmış ve daha iyi antibakteriyel etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşmıştır. Bununla birlikte bu diziden farklı peptitler tasarlamış ve tasarladığı peptitlerin dizisinde Arg'in Lys ile yer değiştirmesinin antibakteriyel aktiviteyi azalttığını, peptit dizisinde hidrofobik amino asitlerin fazla olmasının da toksisiteyi arttırdığını belirtmişlerdir [194]. Bu araştırmada da bahsedildiği gibi antimikrobiyal aktivite gösteren peptitin küçük bir bölümü de antimikrobiyal aktivite göstermektedir ve hatta peptitin tamamında daha iyi antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. TN AMP'ler de 9 ile 13 amino asit büyüklüğünde olup günümüzdeki birçok antimikrobiyal maddeden daha iyi antimikrobiyal etkinliğe sahiptirler.

Çalışmamızda, pozitif yüklü bir amino asitten diğerine geçiş açısını değiştiren Leu sayısını değiştirerek, pozitif yüklü amino asitin heliks üzerindeki konumunu ve bu konumun antimikrobiyal aktiviteyi nasıl değiştirdiğini de araştırdık. TN5'te, her iki uçta bir Arg ve Arg'ler arasında 3 Leu bulunmaktadır. AMP'lerin PEP-Fold ile üç boyutlu yapılarının incelenmesi sonucunda Arg'lerin doğrusal bir eksene yerleştiği görülmüştür

(Şekil 3. 1). TN5 dışındaki diğer AMP'lerde olduğu gibi Arg'ler arasındaki Leu sayısı 2'ye düşürüldüğünde, Arg'lerin ekseninde zikzak oluşturarak dizildiği görülmüştür. AMP tasarımı sırasında pozitif yüklü amino asitlerin eksen üzerindeki dizilişinin antimikrobiyal aktiviteyi önemli oranda etkileyen unsurlardan olduğunu söyleyebiliriz. Nitekim TN5'in antimikrobiyal aktivitesi ile TN1 ve TN6'nın antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırıldığında, özellikle *S. aureus* ve *E. coli* için TN5'in antimikrobiyal etkinliği yaklaşık 8 kat daha düşüktür.

TN AMP'lerindeki iki Arg'nin arasındaki Leu sayısı Arg'ninlerin alfa sarmal ekseninde dizilişini ve buna bağlı olarak antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir. Çizelge 4. 1'de görüldüğü gibi TN1'in ortasındaki Arg'nin sayısı 4 iken TN6'nın ortasındaki Arg'nin sayısı ise 3'tür. TN6 TN1'e göre bakteriler üzerinde daha etkili olmasına karşın, TN1'in *E.coli* üzerine olan etkisi TN6'ya göre iki kat daha yüksektir. Bakteri türleri üzerine TN AMP'lerin bu farklı etkisinin nedeni olarak Arg ile etkileşime giren fosfat gruplarının zar içindeki yerlerinin, Arg'ler AMP ekseninde zikzak şeklinde yerleştirildiğinde bunlara daha iyi bağlanacak konumda olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu küçük bir fark olarak görünse de antimikrobiyal olarak kullanılan molekülün tek bir organizmaya daha düşük derişimde etkinlik göstermesi ileride tür düzeyinde seçicilik gösteren ilaçların geliştirilmesine olanak sağlayarak insan florasındaki bakterileri fazla etkilemeden tedavi olanağı yaratabilecektir.

Diğer bir tasarımı ise TN1, TN5 ve TN6'dan farklı olarak, molekülün sadece tek bir tarafında Arg bulunan AMP'lerden oluşmaktadır. Bu molekülleri tasarlarken, AMP'lerin pozitif yüklü gruplarının fosfatlara bağlanırken, Arg olmayan hidrofobik ucunun zara girişini kolaylaştıracak üç kollu tribüşon benzeri yapıya sahip olacağını düşündük. Bu şekilde tasarladığımız ve TN3 olarak adlandırdığımız AMP'miz tirbuşon şeklinde tasarladığımız diğer moleküller arasında en iyi antimikrobiyal etkinlik gösteren AMP olduğunu belirledik (Şekil 3. 1).

Yine tirbuşon AMP'lerden biri olan TN7, TN3 ile karşılaştırıldığında, TN7'nin Arg olmayan hidrofobik ucundan bir Leu'nin eksilmesi, antimikrobiyal etkinliğini denenen tüm bakteri türlerinde etkinliğini önemli ölçüde azalttığını belirledik. TN7 için etkinliğin TN3'e göre en az 4 kat düşmesinin nedeni olarak TN7'nin hidrofobik ucunun kısa kaldığı

için zar içerisine yeterince giremediği, zar yapısını bozmadığı için etkili olamadığını düşünmekteyiz.

Karboksi terminalinde diğer peptitlerden 3 fazla lösin bulunan TN4'ün test edilen bakterilerden hiçbirine saptanabilir bir aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. Hidrofobik kuyruğun uzatılması, peptitlerin kendi arasındaki etkileşimi arttırabileceğinden, zarlarla olan etkileşimini engelleyebileceğini düşünmekteyiz. TN6'ya kıyasla her ucunda bir tane daha Leu bulunan TN5 de önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bu durumun ise her uçtaki fazla lösinin peptitin alfa sarmal yapısındaki pozitif yüklü argininlerin eksen üzerindeki duruşunu değiştirdiğinden TN1 ve TN6'ya göre antimikrobiyal etkinliğinin daha kötü olduğunu düşünmekteyiz. TN2'de pozitif yüklü amino asit olarak lizinin kullanılması, arginin içeren TN3'ten daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermesine neden olmuştur. Bu durumun, argininin lizine göre daha büyük pozitif yüklü yan zinciri olmasından ve dolayısıyla zara daha iyi tutunmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Floresan mikroskop ile membran hasarının belirlenmesinde ise d görüntüsündeki yoğun ve bulanık ışımının olması, hücrelerin bir kısmının parçalanıp dışarıya çıkan DNA moleküllerinin yoğun olarak boyanmasından kaynaklandığını düşündürmektedir (Şekil 4. 3).

TN AMP'lerin hemolitik aktivitesi, farklı canlılarda bulunan doğal katelisin ile karşılaştırıldığında, TN AMP'lerin HC_{50} değerini aşmadıkları ve birçoğunun doğal olarak bulunan katelisininden daha düşük hemolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi) verilerine göre özellikle *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ve hücre zarına etki gösteren Daptomisin antibiyotiğinin minimal inhibitör konsantrasyonu, besiyerine Ca^{+2} iyonu eklenerek belirlenmektedir. Bu bilgiye dayanarak ilacın Ca^{+2} varlığında daha iyi etki gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Tasarladığımız peptitlerin ortamda farklı iyonların bulunması sonucunda antimikrobiyal aktivitesi olumlu ya da olumsuz yönde farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle antimikrobiyal etkiyi arttırabilecek iyonlar ile çalışmalar planlanabilir. Etkinliğini arttıracak iyonlar belirlenebilirse gelecekte AMP'lerin üretimi

sırasında hazırlanan ilaç formuölasyonlarına bu iyonlar eklenerek etkinlikleri arttırılabilir.

Bu çalışmada, günümüzde oldukça yaygın ve ciddi enfeksiyonlara neden olan ve tedavi için kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirebilen klinik açıdan önemli ve antimikrobiyal aktivite deneylerinde standart olarak kullanılan bakteriler tercih edilmiş ve TN AMP'lerin bunlara karşı antimikrobiyal etkinliğiden umut veren sonuçlar alınmıştır. Etkinliği yüksek olan AMP'lerin, hastalardan izole edilen çok ilaca dirençli suşlara antimikrobiyal etkinliğinin araştırılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada hizmet alımı karşılığında sentetik olarak sentezlettirilip alınan TN AMP'lerin maliyetinin yüksek olması ve bu sebep ile az miktarda alınması nedeniyle hastalardan izole edilen çok ilaca deirençli örneğin; MRSA gibi suşlara minimal inhibitör konsantrasyon çalışmaları yapılamamıştır.

Günümüzde, antibiyotiklere çoklu direnç gösteren mikroorganizmalarla savaşmanın önemli yollarından biri, doğal antibiyotiklere benzer, peptit yapıda antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesidir. Bu çalışmada doğal AMP'lerden daha iyi antimikrobiyal aktivite gösteren ve sitotoksik ya da hemolitik etkisinin insan hücreleri üzerine oldukça az olan katelisin benzeri AMP'ler geliştirdik.

Tasarlanan TN AMP'lerin proteazlara karşı dirençli özellik gösteren çeşitlerinin geliştirilmesi, bu çalışmada geliştirdiğimiz AMP'lerden daha etkili AMP'lerin tasarlanması, hayvan ve insan çalışmaları ile güvenilirliklerinin kanıtlanması, özellikle antibiyotiklere dirençli organizmaların neden olduğu birçok enfeksiyonun tedavisi için üretilecek antimikrobisallerin geliştirilmesi için bundan sonra atılması gereken adımlardır.

KAYNAKLAR

- [1] Okrent, D.G., Lichtenstein, A.K. ve Ganz, T., (1990). "Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. ", Am Rev Respir Dis: 179–185.
- [2] Dünya Sağlık Örgütü, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>, 10 Mayıs 2016.
- [3] Frost, K.J., (2007). "The need for a global response to antimicrobial resistance.", Nursing Standard: 35-40.
- [4] Scott, G., (2009). "Antibiotic resistance.", Medicine.: 551-556.
- [5] Frost, K.J., (2007). "An overview of antibiotic therapy. ", Nursing Standard.: 51-57.
- [6] Canlı Hücre, <http://cellsalive.com/cells/3dcell.htm>, 12 Mayıs 2011.
- [7] Tortora, G.J., Funke, E.R. ve Case, C.L., (2010). Microbiology: An Introduction.
- [8] In Lymn, J., Bath-Hextall, F., Knaggs, R., (2010). The New Prescriber: An Integrated Approach to Medical and Non-Medical Prescribing., Antibacterial chemotherapy.: 444-460.
- [9] Simonsen, T., Kay, I., Coleman, I. ve Lysaa, R., (2006). "Illustrated Pharmacology for Nurses."
- [10] Finch, R., (2009). "Antimicrobial therapy: principles of use.", Medicine.: 545-550
- [11] Gülay, Z. ve Karatuna, O., (2017). Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları, Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 209.
- [12] Karch, A.M., (2008). Focus on Nursing Pharmacology.

- [13] Palit, P., (2009). "Prescribing antibiotics: penicillins and cephalosporins.", *Nurse Prescribing*. : 556-562.
- [14] Kaufman, G., (2011). "Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance", *Nursing Standard*: 49-55.
- [15] Ganz, T. ve Lehrer, R.I., (1999). "Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications", *Mol Med Today*, 5: 292-297.
- [16] Taber, H.W., (2002). *Introduction to the Peptide Antibiotics*, ed. *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Applications*.
- [17] Hancock, R.E. ve Lehrer, R., (1998). "Cationic peptides: a new source of antibiotics.", *Trends Biotechnology*, 16: 82-88.
- [18] Hancock, R.E. ve Diamond, G., (2000). "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses.", *Trends Microbiology*, 8: 402-410.
- [19] Charles, L.B. ve Diamond, G., (2002). *Mammalian Antimicrobial Peptides*, ed. *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Applications*. 145-192.
- [20] Wang, G., Li, X. ve Wang, Z., (2009). "The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. ", *Nucleic Acids Res.*: 933-937.
- [21] Wang, G., (2014). "Human Antimicrobial Peptides and Proteins", *Pharmaceuticals (Basel)*: 545-594.
- [22] Zasloff, M.A., (2002). *Amphibian Antimicrobial Peptides*, ed. *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Applications*. 243-288.
- [23] Wu, M., Maier, E., Benz, R. ve Hancock, R.E., (1999). "Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.", *Biochemistry*: 7235–7242.
- [24] Nguyen, L.T., Haney, E.F. ve Vogel, H.J., (2011). "The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action", *Trends in Biotechnology*, 29.
- [25] Harris, F. ve arkadaşları, (2009). "Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms.", *Curr. Protein Pept. Sci.*: 585-606.
- [26] Nicolas, P., (2009). "Multifunctional host defense peptides: intracellular targeting antimicrobial peptides.", *FEBS J.*: 6483-6496.
- [27] Mangoni, M.L. ve Shai, Y., (2009). "Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification.", *Biochim. Biophys. Acta*: 1610-1619.

- [28] Epand, R.M ve Vogel, H.J., (1999). "Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action", *Biochim Biophys Acta*: 11–28.
- [29] Hetru, C., Hoffmann, J.A. ve Hancock, R.E., (2002). Insect Cationic Antimicrobial Peptides, *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Applications*. 117-144.
- [30] Pag, U. ve Sahl, H.G., (2002). Lanthionine-Containing Bacterial Peptides, *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Applications*. 47-80.
- [31] Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H., ve Meyer, J.N., (2002). Unmodified Peptide-Bacteriocins (Class II) Produced by Lactic Acid Bacteria, *Peptide Antibiotics Discovery, Modes of Action and Application*. 81-116.
- [32] Tan, Y.T., Tillett, D.J. ve McKay, I.A., (2000). "Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria.", *Mol Med Today*: 309–314.
- [33] Perez, R.H., Zendo, T. ve Sonomoto, K., (2014). "Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications.", *Microb Cell Fact*, 13
- [34] Cotter, P.D., Ross, R.P. ve Hill, C., (2013). "Bacteriocins a viable alternative to antibiotics?", *Nat Rev Microbiol* 95-105.
- [35] Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. ve Lotfipour, F., (2012). " Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance.", *J Appl Microbiol* 723-736.
- [36] Martínez, B., Rodríguez, A. ve Suárez, E., (2016). "Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins".
- [37] Diaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A.S., Ramírez-Rodrigo, H. ve Maqueda, M., (2003). "Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48.", *Appl Environ Microbiol*: 1229-1236.
- [38] Nissen-Meyer, J., Öppegard, C., Haugen, H.S. ve Kristiansen, P.E., (2009). "Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. ", *Curr Pharm Biotechnol*: 19-37.
- [39] Maldonado-Barragán, A., Martínez, B., Ruiz-Barba, J.L., Fernández-Garayzabal, J.F. ve Rodríguez, J.M., (2013). "Garvicin A, a novel class IId bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. ", *Appl Environ Microbiol*: 4336-4346.
- [40] Martínez, B., Rodríguez, A., Kok, J. ve Kuipers, O.P., (2007). "Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the lactococcal two-component system CesSR. ", *Mol Microbiol* 473-486.

- [41] Boman, H.G. ve Rasmuson, B., (1972). "Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*.", *Nature*: 232-235.
- [42] Steiner, H., Engström, A., Bennich, H. ve Boman, H.G., (1981). "Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.", *Nature*: 246-248.
- [43] Hancock, R.E. ve Brown, M.H., (1995). "Cationic bactericidal peptides.", *Adv Microb Physiol*: 135-175.
- [44] Gazit, E., Biggin, P.C., Sansom, M.S. ve Shai, Y., (1996). " Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. ", *J Mol Biol*: 860-870.
- [45] Halverson, T., Knoop, F.C. ve Conlon, J.M., (2000). "Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*", *Peptides* 469-476.
- [46] Steinborner, S.T., Bowie, J.H., Wallace, J.C. ve Tyler, M.J., (1998). "New antibiotic caerin-1 peptides from the skin secretion of the Australian tree frog *Litoria chloris*. Comparison of the activities of the caerin 1 peptides from the genus *Litoria*.", *J Pept Res*: 121–126.
- [47] Mignogna, G. ve Barra, D., (1998). "Occurrence and function of Damino acid–containing peptides and proteins: antimicrobial peptides.", *EXS*: 29–36.
- [48] Richter, K. ve Kreil, G., (1987). "D-Alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from L-alanine in the precursor.", *Science*: 200–202.
- [49] Morikawa, N. ve Nakajima, T., (1992). "Brevinin-I and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*.", *Biochem Biophys Res Commun*: 184–190.
- [50] Giacometti, A, Barchiesi, F., Del Prete, M.S. ve Scalise, G., (1999). "Antimicrobial activity of polycationic peptides. ", *Peptides*: 1265–1273.
- [51] Amiche, M., Pierre, T.N. ve Nicolas, P., (1999). "The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable Cterminal antimicrobial domain.", *FEBS Lett*: 352–356.
- [52] Simmaco, M. ve Barra, D., (1998). "Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?", *Biopolymers*: 435-450.
- [53] Bechinger, B., (1999). "The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy.", *Biochim Biophys Acta*: 157-183.

- [54] Munster, C., Bechinger, B. ve Salditt, T., (2000). "Grazing incidence x-ray diffraction of highly aligned phospholipid membranes containing the antimicrobial peptide magainin 2.", *Eur Biophys J*: 683–688.
- [55] Yang, L., Lehrer, R.I. ve Huang, H.W., (2000). "Crystallization of antimicrobial pores in membranes: Magainin and protegrin. ", *Biophys J*: 2002–2009.
- [56] Lohner, K. ve Prenner, E.J., (1999). "Differential scanning calorimetry and x-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. ", *Biochim Biophys Acta* 141-156.
- [57] Matsuzaki, K., Fujii, N. ve Miyajima, K., (1995). "Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2.", *Biochemistry*: 3423–3429.
- [58] Tyler, E.M., Walker, D.E., Mishra, V.K. ve Palgunachari, M.N., (1995). "Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis.", *Biochemistry*: 4393-4401.
- [59] La Rocca, P., Tieleman, D.P. ve Sansom, M.S., (1999). "Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers.", *Biochim Biophys Acta* 185-200.
- [60] Eudes, F. ve Chugh, A., (2008). "Cell penetrating peptides. From mammalian to plant cells. ", *Plant Signal Behav*: 549-550.
- [61] Hegedus, N. ve Marx, F., (2013). "Antifungal proteins: more than antimicrobials?", *Fungal Biol Rev*: 132-145.
- [62] Yount, N.Y. ve Yeaman, M.R., (2013). "Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. ", *Ann N Y Acad Sci*: 127-138.
- [63] Pelegrini, P.B., Silva, O.N., Franco, O.L. ve Grossi-De-Sa, M.F., (2011). "Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. ", *Biochem Res Int*.
- [64] Montesinos, E., (2007). "Antimicrobial peptides and plant disease control.", *FEMS Microbiol Lett*: 1-11.
- [65] Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W. ve Goździcka-Józefiak, A., (2014). "Plant antimicrobial peptides", *Folia Microbiol*: 181–196.
- [66] Nasrollahi, S.A., Azizi, E. ve Farboud, E.S., (2012). "Cellpenetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system.", *Chem Biol Drug Des*: 639-646.
- [67] Milletti, F., (2012). "Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape.", *Drug Discov Today*: 850-860.

- [68] Romeo, D., Bolognesi, M. ve Gennaro, R., (1988). "Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. ", J Biol Chem: 9573-9575.
- [69] Lehrer, R.I. ve Ganz, T., (1988). "Concurrent assessment of inner and outer Mammalian Antimicrobial Peptides membrane permeabilization and bacteriolysis in E. coli by multiplewavelength spectrophotometry.", J Immunology Methods: 153–158.
- [70] Lehrer, R.I., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T. ve Selsted, M.E., (1989). "Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. ", J Clin Invest: 553–561.
- [71] Shimoda, M., Shimamoto, Y. ve Kohashi, O., (1995). "Morphology of defensin-treated Staphylococcus aureus.", Infect Immun: 2886–2891.
- [72] Boman, H.G., (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity. ", Annu Rev Immunology: 61–92.
- [73] Tang, Y.Q., Ösapay, G., Ösapay, K., Tran, D., Miller, C.J. ve Ouellette, A.J., (1999). "A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.", Science: 498–502.
- [74] Gudmundsson, G., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B. ve Salcedo, R., (1996). "The human gene FALL39and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes.", Eur J Biochem Biophys Res Commun: 325–332.
- [75] Brogden, K.A. ve Huttner, K.M., (1997). "Small, anionic, and chargeneutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. ", Antimicrob Agents Chemother: 1615–1617.
- [76] Lehrer, R.I. ve Ganz, T., (1998). Defensins and other antimicrobial peptides., Mucosal Immunology. 89–99.
- [77] Martin, E. ve Lehrer, R.I., (1995). "Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. ", J Leuk Biol: 128–136.
- [78] Diamond, G., (1998). "Beta-defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response.", Clin Immunol Immunopathol: 221–225.
- [79] Tang, Y.Q., (1993). "Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils.", J Biol Chem: 6649–6653.
- [80] Zimmermann, G.R., Selsted, M.E. ve Pardi, A., (1995). "Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins.", Biochemistry: 13663–13671.

- [81] Zanetti, M., ve Romeo, D., (1995). "Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. ", FEBS Lett: 1–5.
- [82] Ritonja, A., Jerala, R. ve Turk, V., (1989). "Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. ", FEBS Lett: 211-214.
- [83] Zanetti, M., (2004). "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity.", J. Leukoc. Biol.: 39-48.
- [84] Panyutich, A., Boutz, P.L., Zhao, C. ve Ganz, T., (1997). "Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidins.", Infect Immun: 978–985.
- [85] Storici, P., Lenarcic, B. ve Romeo, D., (1996). "Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides.", Eur J Biochem: 769–776.
- [86] Lehrer, R.I., (1999). "Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. ", Current Opinion Immunology: 23–27.
- [87] Turner, J., Dinh, N.N., Waring, A.J. ve Lehrer, R.I., (1998). "Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils.", Antimicrob Agents Chemother: 2206–2214.
- [88] Steinburg, D.A., (1997). Designer assays for antimicrobial peptides., ed. Antibacterial Peptide Protocols., 169–186.
- [89] Levy, O., Weiss, J., Lehrer, R.I. ve Elsbach, P., (1994). "Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on Escherichia coli.", J Clin Invest: 672-682.
- [90] Hancock, R.E. ve Brown, M., (1995). "Cationic bactericidal peptides.", Adv Microb Physiol: 135–175.
- [91] Hill, C.P., Selsted, M.E. ve Eisenberg, D., (1991). "Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. ", Science: 1481–1485.
- [92] White, S.H. ve Selsted, M.E., (1995). "Structure, function, and membrane integration of defensins.", Curr Opin Struct Biol: 521–527.
- [93] Huang, H.J. ve Blecha, F., (1997). "Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. ", J Leuk Biol: 624–629.
- [94] Lillard, J.W., Chertov, O., Oppenheim, J.J. ve McGhee, J.R., (1999). "Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins.", Proc Natl Acad Sci USA: 651–656.

- [95] Yang, D., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schrsder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M.Z. ve Oppenheim, J.J., (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.", *Science*: 525–528.
- [96] Higazi, A.A., Bdeir, K., Ulrich, A.M., Jamieson, D.G., Rader, D.J., Usher, D.C., Ganz, T. ve Cines, D.B., (1997). "Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells.", *Blood*: 4290–4298.
- [97] Lencer, W.I., Strohmeier, G.R., Currie, M.G., Ouellette, A.J., Selsted, M.E. ve Madara, J.L., (1997). "Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptins 2 and 3.", *Proc Natl Acad Sci USA*: 8585–8589.
- [98] Befus, A.D., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S. ve Bateman, A., (1999). "Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. ", *J Immunology*: 947–953.
- [99] Tominaga, T., Naito, Y., Nakai, Y., Funakoshi, S., Fujii, N. ve Imura, H., (1990). "Effects of corticostatin-1 on rat adrenal cells in vitro.", *J Endocrinology*: 287–292.
- [100] Marchini, G., Lindow, S., Brismar, H., Ståbi, B., Berggren, V., Ulfgren, A.K., Lonne-Rahm, S., Agerberth, B. ve Gudmundsson, G.H., (2002). "The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: Peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. ", *J. Dermatol.*: 1127-1134
- [101] Da Silva, B.R., de Freitas, V.A., Nascimento-Neto, L.G., Carneiro, V.A., Arruda, F.V., de Aguiar, A.S., Cavada, B.S. ve Teixeira, E.H., (2012). "Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature.", *Peptides*: 315-321.
- [102] Yount, N.Y.Y. ve Yeaman, M.R., (2012). " Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. ", *Toxicol*: 337-360.
- [103] Wang, G.L. ve Wang, Z., (2009). "The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design.", *Nucleic Acids Res.*: D933-D937.
- [104] De Smet, K. ve Contreras, R., (2005). "Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins", *Biotechnol Lett*: 1337-1347.
- [105] Drannik, A.G., Nag, K., Sallenave, J.M. ve Rosenthal, K.L., (2013). "Antiviral activity of trappin-2 and elafin in vitro and in vivo against genital herpes. ", *J. Virol.*: 7526-7538.
- [106] Wang, G., Watson, K.M. ve Buckheit, R.W., (2008). "Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins. ", *Antimicrob. Agents Chemother.* : 3438-3440.

- [107] Winter, J., Pantelis, A., Reich, R., Martini, M., Kraus, D., Jepsen, S., Allam, J.P., Novak, N. ve Wenghoefer, M., (2011). "Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation.", *Cancer Invest.*: 196-201.
- [108] Wang, G., Mishra, B., Epand, R.F. ve Epand, R.M., (2014). "High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments.", *Biochim. Biophys. Acta*.
- [109] Svensson, D., Westman, J., Wickström, C., Jönsson, D., Herwald, H. ve Nilsson, B.O., (2014). "Human endogenous peptide p33 inhibits detrimental effects of LL-37 on osteoblast viability.", *J. Periodontal Res.*
- [110] Yung, S.C. ve Murphy, P.M., (2012). "Antimicrobial chemokines.", *Front Immunol.*
- [111] Lee, W.Y., Savage, J.R., Zhang, J., Jia, W., Oottamasathien, S. ve Prestwich, G.D., (2013). "Prevention of anti-microbial peptide LL-37-induced apoptosis and ATP release in the urinary bladder by a modified glycosaminoglycan. ", *PLoS One*.
- [112] Oudhoff, M.J.B., Nazmi, K., Scheres, N., Bolscher, J.G. ve Veerman, E.C., (2010). "The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity", *Biol. Chem.*: 541-548.
- [113] Wang, G., (2013). "NMR of membrane proteins. In *Advances in Protein and Peptide Sciences*", Bentham Sci.
- [114] Nguyen, L.T., Haney, E.F. ve Vogel, H.J., (2011). "The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action.", *Trends Biotechnol.*: 464-472.
- [115] Zhao, C., Wang, I. ve Lehrer, R.I., (1996). "Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells.", *FEBS Lett.*: 319-322.
- [116] Ganz, T., (2001). "Defensins in the urinary tract and other tissues. ", *J. Infect. Dis.*
- [117] Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M. ve Wilson, J.M., (1998). "Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. ", *J. Clin. Invest.*: 874-880.
- [118] Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L. ve Bevins, C.L., (1991). "Tracheal antimicrobial peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA.", *Proc Natl Acad Sci*: 3952–3956.
- [119] Selsted, M.E., Tang, Y.Q., Morris, W.L., McGuire, P.A., Novotny, M.J., Smith, W., Henschen, A.H. ve Cullor, J.S., (1993). "Purification, primary structures, and

antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils.", *J Biol Chem*: 6641–6648.

- [120] Harwig, S.S.L., Swiderek, K.M., Kokryakov, V.N., Tan, L., Lee, T.D., Panyutich, E.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V. ve Lehrer, R.I., (1994). "Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes.", *FEBS Lett*: 281–285.
- [121] Diamond, G. ve Bevins, C.L., (1998). "Beta-defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. ", *Clin Immunol Immunopathol*: 221–225.
- [122] Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R.A., Schechter, N.M., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A. ve Gallo, R.L., (2006). "Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin.", *FASEB J.* : 2068-2080.
- [123] Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Joźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L., ve Bagnicka, E., (2012). "Cathelicidins: family of antimicrobial peptides.", *Mol Biol Rep*: 10957–10970.
- [124] Murakami, M.O., Dorschner, R.A., Schitteck, B., Garbe, C. ve Gallo, R.L., (2002). "Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin.": 1090-1095.
- [125] Schitteck, B.H., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M. ve Schroeder, K.B., (2001). "Dermcidin: A novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands.", *Nat. Immunol.*: 1133-1137.
- [126] Rieg, S.G., Sauer, B., Kalbacher, H. ve Schitteck, B., (2004). "Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions.", *Br. J. Dermatol.*: 534-539.
- [127] Rieg, S.S., Kern, W.V., Jonas, D., Bruckner-Tuderman, L. ve Hofmann, S.C., (2013). "Expression of the sweat-derived innate defence antimicrobial peptide dermcidin is not impaired in *Staphylococcus aureus* colonization or recurrent skin infections.", *Clin. Exp. Dermatol.*
- [128] Krause, A.N., Mägert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P. ve Adermann, K., (2000). "LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity.", *FEBS Lett.*: 147-150.
- [129] Pigeon, C.I., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. ve Loréal, O., (2001). " A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. ", *J. Biol. Chem.*: 7811-7819.
- [130] Roetto, A.P., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D. ve Camaschella, C., (2003). "Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. ", *Nat. Genet.*: 21-22.

- [131] Lay, F.T., Mills, G.D., Adda, C.G., Payne, J.A., Phan, T.K., Ryan, G.F.W. ve Veneer, P.K., (2014). "Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis.", *Elife*.
- [132] Lee, C.C.S., Qian, S. ve Huang, H.W., (2011). "Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. ", *Biophys. J.*: 1688-1696.
- [133] Maisetta, G.V., Scorciapino, M.A., Rinaldi, A.C., Petruzzelli, R., Brancatisano, F.L., Esin, S.S., Colone, M. ve Luzi, C., (2013). "pH-dependent disruption of *Escherichia coli* ATCC 25922 and model membranes by the human antimicrobial peptides hepcidin 20 and 25.", *FEBS J.*: 2842-2854.
- [134] Stewart, S.E.K., Matthews, A.Y., D'Angelo, M.E., Dunstone, M.A., Whisstock, J.C. ve Trapani, J.A.B., (2014). "The Perforin Pore Facilitates the Delivery of Cationic Cargos. ", *J. Biol. Chem. Phys. Lett.*: 9172-9181.
- [135] Sieprawska-Lupa, M. ve arkadaşları, (2004). "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases.", *Antimicrob. Agents Chemother.*: 4673- 4679.
- [136] Nyberg, P., Rasmussen, M. ve Bjorck, L., (2004). "Alpha2-macroglobulin-proteinase complexes protect *Streptococcus pyogenes* from killing by the antimicrobial peptide LL-37. ", *J. Biol. Chem.*
- [137] Galvan, E.M., ve Schifferli, D.M., (2008). "Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin.", *Infect. Immun.*: 1456- 1464.
- [138] Joo, H.S., Fu, C.I. ve Otto, M., (2016). "Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. ", *Phil. Trans. R. Soc. B.*
- [139] Jin, T., Foster, T., Mitchell, J. ve Higgins, J., (2004). "*Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism.", *J. Immunol.*: 1169- 1176.
- [140] Otto, M., (2006). "Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. ", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*: 251 - 258.
- [141] Otto, M., (2012). "Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections.", *Semin. Immunopathol.*: 201- 214.
- [142] Vuong, C., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R. ve Otto, M., (2004). "Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. ", *Cell Microbiol.*: 269- 275.
- [143] Cole, J.N., von Kockritz-Blickwede, M., Hollands, A., Walker, M.J., ve Nizet, V., (2010). "M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype M1T1 group A *Streptococcus*.", *MBio*.

- [144] Ogunleye, A., Irorere, V.U., Hill, D. ve Williams, C., (2015). "Poly-gamma-glutamic acid: production, properties and applications.", *Microbiology*: 1 - 17.
- [145] Batoni, G., Brancatisano, F.L. ve Esin, S., (2011). "Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits.", *Curr. Med. Chem.*: 256 - 279.
- [146] Strempel, N. ve Overhage, J., (2015). "Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. ", *Curr. Pharm. Des.* : 67- 84.
- [147] Di Luca, M. ve Nifosi, R., (2014). "Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. ", *Pathog. Dis.*: 257- 270.
- [148] Revilla-Guarinos, A., Alcantara, C., Staron, A., ve Zuniga, M., (2013). "Characterization of a regulatory network of peptide antibiotic detoxification modules in *Lactobacillus casei* BL23.", *Appl. Environ. Microbiol.*: 3160- 3170.
- [149] Andersson, D.I., Hughes, D. ve Kubicek-Sutherland, J.Z., (2016). "Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides", *Drug Resistance Updates*: 43-57.
- [150] Mukherjee, S.Z., Derebe, M.G., Callenberg, K.M., Partch, C.L., Rollins, D., Propheter, D.C.R., Grabe, M. ve Jiang, Q.X., (2013). "Antibacterial membrane attack by a poreforming intestinal C-type lectin. ", *Nature*: 103-107.
- [151] Emson, C.L.F., Lindwall, G., Li, K.W., Hellerstein, M.K., Maibach, H.I. ve Liao, W.T., (2013). "A pilot study demonstrating a non-invasive method for the measurement of protein turnover in skin disorders: Application to psoriasis.", *Clin. Transl. Med.*
- [152] Wang, G., (2010). *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategi.*
- [153] Lee, J.H., Hwang, S.W., Lee, W.J., Yoon, H.K., Lee, H.S. ve Hong, S.S., (2000). "High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. ", *Biochem Biophys Res Commun* 575-580.
- [154] Majerle, A. ve Jerala, R., (2000). "Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*:an application to the production of a 15 N-enriched fragment of lactoferrin. ", *J Biomol NMR*: 145-151.
- [155] da Costa, J.P., Cova, M., Ferreira, R. ve Vitorino, R., (2015). "Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines?", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 2023-2040.
- [156] Zhang, S., Qiao, S., Ren, M., Zeng, X., Ma, X., Wu, Z., Thacker, P. ve Wu, G., (2013). "Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein

diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs", *Amino Acids*, 45: 1191-1205.

- [157] Li, X., Stith, C.M., Burgers, P.M. ve Heyer, W.D., (2009). "PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ ", *Molecular Cell*, 36: 704-713.
- [158] Harper, S. ve Speicher, D.W., (2011). *Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase*, D. Walls ve Loughran, S.T., *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 259-280.
- [159] Guerreiro, C.I., Fontes, C.M., Gama, M. ve Domingues, L., (2008). "Escherichia coli expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum*", *Protein Expr Purif*, 59: 161-168.
- [160] Meiyalaghan, J.M.L., Kralicek, A.V., Shaw, M.L., Lewis, J.G., Conner, A.J. ve Barrell, P.J., (2014). "Expression and purification of the antimicrobial peptide GSL1 in bacteria for raising antibodies", *BMC Research Notes*.
- [161] Lemaitre, B., Michaut, L., Reichhart, J.M. ve Hoffmann, J.A., (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.", *Cell*: 973–983.
- [162] Huttner, K.M., (1999). "Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense.", *Pediatr Res*: 785–794.
- [163] Bevins, C.L., (1999). "Scratching the surface: inroads to a better understanding of airway host defense. ", *Am J Respir Cell Mol Biol*: 861–863.
- [164] Hancock, R.E., (1998). "Cationic peptides: a new source of antibiotics.", *Trends Biotechnology*: 82–88.
- [165] Bals, R., Moscioni, A.D., Meegalla, R.L. ve Wilson, J.M., (1999). "Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. ", *Infect Immun*: 6084–6089.
- [166] Moll, G.N., Konings, W.N. ve Driessen, A.J., (2000). "Comparison of the membrane interaction and permeabilization by the designed peptide AcMB21-NH(2) and truncated dermaseptin S3. ", *Biochemistry*: 11907-11912.
- [167] Hong, S.Y. ve Lee, K.H., (1999). "Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. ", *Biochem Pharmacol*: 1775-1780.

- [168] Egal, M., MacDonald, D.L., Maloy, W.L., Motley, M. ve Genco, C.A., (1999). "Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on herpes simplex virus, type 1.", *Int J Antimicrob Agents*: 57-60.
- [169] Hong, J. ve Shai, Y., (1999). "Structure and organization of hemolytic and nonhemolytic diastereomers of antimicrobial peptides in membranes.", *Biochemistry*: 16963-16973.
- [170] Porter, E.A., Lee, H.S., Weisblum, B. ve Gellman, S.H., (2000). "Nonhaemolytic beta-amino-acid oligomers.", *Nature*.
- [171] Seebach, D., (1997). " β -Peptides: a surprise at every turn.", *J Chem Soc Chem Commun*: 2015-2022.
- [172] Leach, A.R., (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*.
- [173] Allen, M.P. ve Tildesley, D.J., (1990). *Computer Simulation of Liquids*, Oxford.
- [174] Verlet, L., (1967). "Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules", *Phys. Rev. A*: 98-103.
- [175] Hockney, R.W. ve Eastwood, J.W., (1988). *Computer simulations using particles.* : Bristol.
- [176] Klauda, J.B., Venable, R.M., Freites, J.A., O'Connor, J.W., Tobias, D.J., Mondragon-Ramirez, C. ve Pastor, R.W., (2010). "Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types.", *The journal of physical chemistry*: 7830-7843.
- [177] Wu, E.L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K.C., Dávila Contreras, E.M. ve Klauda, J.B., (2014). "CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations.", *Journal of Computational Chemistry*.: 1997-2004.
- [178] Phillips, J.C., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E. ve Villa, E., (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*." : 1781-1802.
- [179] Brooks, B.R., MacKerell, A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B. ve Karplus, M., (2009.). "CHARMM: The Biomolecular Simulation Program.", *Journal of Computational Chemistry*.
- [180] Thévenet, P., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P. ve Tufféry, P., (2012). "PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides.", *Nucleic Acids Research*.
- [181] Humphrey, W. ve Schulten, K., (1996). "VMD: visual molecular dynamics.", *Journal of molecular graphics*.

- [182] Jorgensen, W.L., Madura, J.D., Impey, R.W. ve Klein, M.L., (1983). "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.", *The Journal of Chemical Physics.*: 926-935.
- [183] Cheatham, T.E., Miller, J.L., Fox, T., Darden, T.A. ve Kollman, P.A., (1995). "Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins.", *Journal of the American Chemical Society.*: 4193-4194.
- [184] Tovchigrechko, A. ve Vakser, I.A., (2006). "GRAMM-X public web server for protein-protein docking.", *Nucleic Acids Res.*
- [185] Behrendt, R., White, P. ve Offer, J., (2016). "Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis", *J. Pept. Sci.*: 4-27.
- [186] Eren, T., Rennie, J.R., Nelson, C.F., Urgina, Y., Nußslein, K., Coughlin, E.B. ve Tew, G.N., (2008). "Antibacterial and Hemolytic Activities of Quaternary Pyridinium Functionalized Polynorbornenes", *Macromolecular Journals*: 516-524.
- [187] Tokur, O. ve Aksoy, A., (2017). "In Vitro Sitotoksosite Testleri", *Harran Üniv Vet Fak Derg.*: 112-118.
- [188] Vichai, V. ve Kirtikara, K., (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening".
- [189] G-Biosciences, CytoScan™ SRB Cell Cytotoxicity Assay Protocol.
- [190] Hartmann, M., Hawecker, J., Ardakani, M.F., Gerthsen, D. ve Ulrich, A.S., (2010). "Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*: 3132-3142.
- [191] Feng, J., Zhang, S., Shi, W. ve Zhang, Y., (2014). "An optimized SYBR Green I/PI assay for rapid viability assessment and antibiotic susceptibility testing for *Borrelia burgdorferi*", *PloS one*.
- [192] Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B. ve Shai, Y., (1999). "Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity", *Biochem J*, 341 (Pt 3): 501-513.
- [193] Park, Y., Jang, S.H., Woo, E.R., Jeong, H.G. ve Choi, C.H., (2003). "A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism.", *Biochim Biophys Acta*: 172-182.

- [194] Wang, G., (2015). "Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides.", *Methods in molecular biology*: 43-66.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nihan ÜNÜBOL
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.05.1983 / İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : nihan.unubol@acibadem.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoteknoloji	Yeditepe Üniversitesi	2010
Lisans	Biyoloji	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2007
Lise	Fen	Beykent Koleji	2001

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011-Halen	Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
2009-2011	Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	Laboratuvar sorumlusu

YAYINLARI

Makale

1. **Nihan Ünubol**, Suleyman Selim Cinaroglu, Merve Acikel Elmas, Sümeyye Akçelik, Arzu Tugba Ozal Ildeniz, Serap Arbak, Adil Allahverdiyev, Tanil Kocagoz, (2017). "Peptide Antibiotics Developed by Mimicking Natural Antimicrobial Peptides" Clin Microbiol 6: 291. doi:10.4172/2327-5073.1000291

Bildiri

1. **Nihan Ünubol**, Tanıl Kocagöz, Merve Açikel Elmas, Süleyman Selim Çınaroğlu, Tuğba Arzu Özal İlideniz, Serap Arbak, Adil Allahverdiyev, Developing Peptide Antibiotics by Mimicking Natural Antimicrobial Peptides, 27th ECCMID, 22-25 April 2017, Vienna, Austria. (sözlü bildiri)