



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KATELİSİDİN PEPTİT ANTİBİYOTİKLERİNDEN
ESİNLENEREK GELİŞTİRİLEN ANTİMİKROBİYAL
PEPTİTLERİN HİPOKAMPAL NÖRONLAR ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

MUSTAFA TİTİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL - 2019



T.C.
ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KATELİSİDİN PEPTİT ANTİBİYOTİKLERİNDEN
ESİNLENEREK GELİŞTİRİLEN ANTİMİKROBİYAL
PEPTİTLERİN HIPOKAMPAL NÖRONLAR ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

MUSTAFA TİTİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL – 2019

Anabilim Dalı: Fizyoloji

Program: Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans

Tez Başlığı: İnsan Katelisinin Peptit Antibiyotiklerinden Esinlenerek
Geliştirilen Antimikrobiyal Peptitlerin Hipokampal
Nöronlar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Mustafa Titiz

Savunma Sınavı Tarihi: 28 / 06 / 2019

Bu tez çalışması jürimiz tarafında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nevzat Kahveci

Bursa Uludağ Üniversitesi

Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Güldal Süyen

Acıbadem Mehmet Ali

Aydınlar Üniversitesi

Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Meltem Kalgazi

Acıbadem Mehmet Ali

Aydınlar Üniversitesi

Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih :

Adı Soyadı :

İmza :

TEŞEKKÜR

Dünyanın en sabırlı ve anlayışlı insanları olduklarına inandığım, benim bu günlere gelmemde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ANNEM ve saygıdeğer BABAM,

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her daim başaracağıma inanan ve bu doğrultuda motivasyonumu sürekli dinç tutan danışman hocam Prof. Dr. Güldal SÜYEN,

Tezimin hazırlık aşamasında bana tavsiyeleri ile rehberlik eden kıymetli hocalarım Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ, Doç. Dr. Özge Can ve Öğr. Gör. Dr. Nihan ÜNÜBOL,

Çalışmanın deneylerinde her türlü sorunla karşılaştığımda çekinmeden yanlarına gidebildiğim, güler yüz ve samimiyeti hiçbir zaman benden esirgemeyen, gelecekteki akademik hayatımda bana kattıkları değerli bilgilerden istifade edebileceğim kıymetli hocalarım Prof. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKCAER KESKİN ve Dr. Öğr. Üyesi Emre DENİZ,

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının temini için ACU Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi,

Tuğçe Ertüzün, Gözde Ervin Köle, Berna Somuncu, Ayşegül Ekmekçi, Meltem Pak, Gülin Baran, Nesteren Mansur ve Hazal Yılmaz başta olmak üzere Acıbadem Mehmet Ali Aydınları Üniversitesi bünyesindeki tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR VE SİMGE LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Literatür Özeti	3
1.2. Tezin Amacı	4
1.3. Hipotez	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)	6
2.1.1. AMP'lerin etki mekanizması	7
2.1.2. Farklı hücrelerin AMP'lere karşı direnç mekanizmaları	8
2.1.3. AMP'lerin Önemi	10
2.2. Farklı canlılarda bulunan AMP'lerin gruplandırılması	11
2.2.1. Bakterilerdeki AMP'ler	11
2.2.2. Böceklerdeki AMP'ler	11
2.2.3. Amfibilerdeki AMP'ler	12
2.2.4. Bitkilerdeki AMP'ler	13
2.2.5. Memelilerdeki AMP'ler	18
2.3. İnsanda bulunan AMP'ler	19
2.3.1. Defensinler	19
2.3.2. Dermisidinler	21
2.3.3. Histatinler	21
2.3.4. Katelisinler	22
2.4. İnsan katelisinlerinin etki mekanizması	23
2.5. Hipokampal Nöronlar	24
2.5.1. Morfolojileri	24

2.5.2. Fonksiyonları	27
2.6. Hipokampal nöronlarda katelisin peptit ifadesi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Primer hipokampal nöron kültürü	28
3.1.1. Deney Hayvanları	28
3.1.2. Genel Teknikler	29
3.1.2.1. Diseksiyon	29
3.1.2.2. Petrilerin Kaplanması	31
3.1.2.3. Kimyasal Ayrıştırma	31
3.1.2.4. Mekanik Ayrıştırma	31
3.1.2.5. Hücre Ekimi	32
3.2. SRB testi ile sitotoksosite tayini	32
3.3. SRB testi ile antioksidan tayini	34
3.4. RNA İzolasyonu	34
3.5. cDNA Sentezi	35
3.6. qRT-PCR Analizleri	36
3.7. Verilerin istatistiksel analizi	37
4. BULGULAR	38
4.1. Primer hipokampal nöron kültürü	38
4.2. AMP'lerin sitotoksosite düzeyleri	39
4.3. TN-2 ve TN-3 peptitlerinin antioksidan düzeyleri	40
4.4. TN-2 peptidinin neden olduğu gen ekspresyon değişiklikleri	42
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
6.1. Sonuç	49
6.2. Öneriler	49
7. KAYNAKLAR	50
8. EKLER	65
8.1. Etik kurul onayı	65
8.2. ABAPKO proje desteği	67
9. ÖZGEÇMİŞ	69

KISALTMALAR ve SİMGE LİSTESİ

AMP	Antimikrobiyal Peptit
CAMP	Katyonic Antimikrobiyal Peptitler
hCAP-18	18-kDa İnsan Katyonik Antimikrobiyal Protein
CRAMP	Antimikrobiyal Peptit İlişkili Katelisidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
hBD	İnsan Beta Defensin
HD	İnsan Defensin
HNP	İnsan Nötrofil Defensin
HDP	Konak Savunma Peptitleri
HeLa	Henrita Lacks Hücreleri
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Arg	Arginin
Leu	Lösin
Lys	Lizin
Bcl-2	B Hücre Lenfoma 2
BAX	Bcl-2 İlişkili X Proteini
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
18S rRNA	18s ribozomal RNA
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IL-1	İnterlökin 1
IL-8	İnterlökin 8
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
LPS	Lipo Poli Sakkarit
SRB	Sulforodamin B
CA	Cornu Ammonis
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.3.1	Her üç defensin familyasından peptitlerin karikatürel gösterimleri	19
Şekil 2.4	AMP etki mekanizmaları grafiği	24
Şekil 2.5.1	Hipokampal hücrelerinin morfolojisi	25
Şekil 3.1.2.4	Pipet uçlarının gösterimi	32
Şekil 3.2	SRB testi veri hesap formülü	34
Şekil 4.2	Sitotoksisite ölçümleri	31
Şekil 4.3	Antioksidan Ölçümleri	41

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 3.1.2.1-1	Beynin diseksiyon aşamaları	30
Resim 3.1.2.1-2	Hipokampus diseksiyon aşamaları	30
Resim 4.1	Primer hipokampal nöron kültürü	38



TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.2	Peptit amino asit dizileri	33
Tablo 3.5.1	cDNA sentez reaksiyonu	35
Tablo 3.5.2	qRT-PCR Protokolü	36
Tablo 3.6.1	qRT-PCR reaksiyonu karışımı içerikleri ve hacimleri	36
Tablo 3.6.2	qRT-PCR Protokolü	37
Tablo 3.6.3	Primer Sekansları	37
Tablo 4.2	Sitotoksisite ölçümlerinin sayısal verileri	39
Tablo 4.3	Antioksidan ölçümlerinin sayısal verileri	41
Tablo 4.4	qRT-PCR analizlerinin C _q değerleri	42

ÖZET

Antimikrobiyal peptitler (AMP), anti-enflamatuar ve immünomodülatör aktivitelerinin yanı sıra, kanser hücrelerinden bakterilere, mayalara, mantarlara ve virüslere karşı geniş bir antibiyotik aktivite sahip küçük moleküllerdir. Çalışmada, insan katelisinin peptit antibiyotiklerinden esinlenilerek geliştirilen özgün nitelikteki TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 peptitlerinin hipokampal nöronlar üzerindeki toksisite ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi, ayrıca Bcl-2, Bax, Wnt5a ve NF- κ B genlerinin ifadeleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda postnatal 3 günlük balb-c fareler kullanılarak primer hipokampal nöron kültürü oluşturmuş, sonrasında etkileri araştırılmak istenen peptitler farklı konsantrasyonlarda (0.5 – 32 μ g/ml) hücre kültürüne eklenmiş ve 16 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon ardından, peptitlerin hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla Sulforodamin B (SRB) sitotoksosite testi uygulanmış, en az toksik etki gösteren peptitler saptanmıştır. Antioksidan tayin için hücre kültürü 100 uM hidrojen peroksit ile 10 dk 37°C'de inkübe edilmiş ve hücre kültüründeki nöronların oksidatif strese girmeleri sağlanmıştır. 0.5 – 32 μ g/ml konsantrasyon aralığında hücre kültürüne eklenen TN-2 ve TN-3 peptitlerinin SRB testi ile antioksidan etkileri ölçülmüştür. qRT-PCR tekniği kullanılarak Bax, Bcl-2, Wnt5a, NF- κ B ve 18S rRNA genlerinin ifade düzeyleri ölçülmüştür. TN-2 ve TN-3 peptiti eklenen gruptaki sitotoksosite değerleri kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır (n=3, p<0.05). TN-1 ve TN-6 peptiti eklenen gruplarda ise kontrol grubuna göre sitotoksosite değerleri daha yüksek gözlenmiştir (n=3, p<0.05). Olası rejeneratif özelliklerinden dolayı antioksidan değerlendirme için sadece TN-2 ve TN-3 peptitleri kullanılmıştır. TN-2'nin hipokampal nöronlar üzerinde toksik etki oluşturmadığı, hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres modelinde ise post-operatif uygulanmasının nöronların hayatta kalımlarını arttırdığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hipokampus, Katelisinin peptit antibiyotik, Antioksidan, Toksisite

SUMMARY

Investigation of the Effects of Antimicrobial Peptides Inspired by Human Peptide Antibiotics on Hippocampal Neurons

Antimicrobial peptides are small molecules with a wide range of antibiotic activity against yeasts, cancer, fungi and viruses as well as anti-inflammatory and immunomodulatory activities. In this study, cytotoxic and antioxidant properties of TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 and TN-7 peptides which were developed by the inspiration of human cathelicidin peptide antibiotics were aimed to be investigated. Besides, their effects on expression pattern of Bcl-2, Bax, Wnt5a and NF- κ B genes were inquired. Primary neuron culture were established using neonate mice and peptides to be investigated were added to cell culture at different concentrations (0.5–32 μ g/ml) for 16 hours. Then, SRB cytotoxicity assay was performed to assess the effects of peptides on cell viability and ones that has least toxic effect were revealed. For antioxidant determination, cell culture was incubated with 100 μ M hydrogen-peroxide for 10 min to induce oxidative stress model. TN-2 and TN-3 peptides were added into the cell culture before and after oxidative stress at concentrations of 0.5–32 μ g/ml. The expression levels of Bax, Bcl-2, Wnt5a, NF- κ B and 18S rRNA genes were measured by using qRT-PCR. As a result of cytotoxicity measurements, cytotoxicity values of TN-2 and TN-3 peptide groups were lower than control group (n=3, p<0.05). However, the cytotoxicity values of TN-1 and TN-6 peptide groups were higher than control group (n=3, p<0.05). TN-2 and TN-3 peptides were only used for antioxidant evaluation. It has been shown that TN-2 doesn't have toxic effects on hippocampal neurons and post-operative administration of TN-2 in oxidative stress model increases the survival of neurons.

Keywords : Hippocampus, Cathelicidin peptide antibiotics, Antioxidant, Toxicity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Literatür Özeti

Çevremizde çok sayıda ve çeşitlilikte mikroorganizmalar bulunmaktadır ve bu organizmaların istilasına karşı birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem ve trakeobronşiyal açıklığı kaplayan deri keratinositleri ile epitel hücreleri zararlı mikroorganizmalara karşı ilk bariyer olarak görev alırken, alt katmanlarda bulunan fagositik nötrofiller ve monositler dolaşımda etkinlik göstermektedirler. Buna rağmen, bu savunma basamakları çoğu zaman geçer. Epitel hücreleri ve fagositler tarafından üretilen AMP'lerin salınması ile ikincil savunma mekanizması etkili bir sonuç ortaya koymaktadır (1,2). 400'den fazla AMP, bitkilerde, böceklerde ve hayvanlarda tanınlanmıştır (3). Son zamanlarda, bazı memeli AMP'lerinin, doğuştan gelen konakçı savunması ve / veya adaptif immün yanıtlara girmesi için konakçı hücreleri hızlı bir şekilde çeken ve aktive eden ikinci bir ana fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir (4). Bu AMP'lerin bazıları bariyer epitel hücrelerinde ve fagositlerde depolandığından, bir dizi uyarana cevaben degranülasyon yoluyla ekzositoz gerçekleşir ve mikrobiyal saldırı bölgelerinde hızlı bir şekilde kullanılabilir hale gelebilirler. Degranülasyonla sonuçlanan uyarıcılar arasında fagositoz işlemi, lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal ürünler, hücre zedelenmesi ve tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 8 (IL-8) gibi koruyucu sitokinler bulunmaktadır. Bu endojen mediatörler, mikrobiyal invazyon ve mikrobiyal ürünlere cevap olarak uyarılmakta ve dolayısıyla, indüklenebilir AMP'lerin epitelyal hücrelerinin salgılanmasını uyaran ilk savunma hattının ürünlerini temsil etmektedir (5).

Memeli AMP'leri defensin ve katelisin ailesine ait peptitlerdir. Defensinler, sekanslarında altı sistein dizisi içermekte ve intramoleküler disülfid bağları ile stabilize edilmiş karakteristik β -tabaka yapıları bulundurmaktadır (6). Katelisinler, matür formdaki AMP'lere karşılık gelen yüksek oranda korunmuş bir katelisin benzeri amino asit dizisi ve değişken karboksil-terminal sekansları ile karakterizedirler (7). 18 kDa'lık insan katyonik antibakteriyel proteini (hCAP18,

ayrıca LL-37 veya FALL39 olarak da bilinirler) insanlarda bulunan tek katelisinin peptit antibiyotikidir ve temel olarak nötrofillerin sekonder granüllerinde bulunmaktadır (8). LL-37 peptiti, makrofajlardan / monositlerden ve çeşitli epitel hücrelerinden aktifleşmiş bir yapı olarak salınmaktadır (9).

1.2. Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, insan katelisininin esinlenilerek tasarlanan ve sentezlenen antimikrobiyal özellikteki peptitlerin hipokampal nöronlar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İnsan katelisinin proteinlerinin hipokampal nöronlarda proinflamatuvar ve antimikrobiyal etkinlik gösterdiği literatürde mevcuttur (10), ancak yapay olarak tasarlanan ve sentezlenen TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 peptitlerinin hipokampal nöronlar üzerinde nasıl etkinlik gösterdiği bilinmemektedir. Bu doğrultuda hipokampal nöronların kullanılması TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 olarak isimlendirilmiş antimikrobiyal özellikteki peptitlerin etkilerinin aydınlatılmasına yöneliktir.

1.3. Hipotez

Tez çalışmasında kullanılan antimikrobiyal özellikteki peptitler, katelisinin LL-37'nin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu bilinen C-terminal bölgesindeki homolog amino asit dizilerin yapısal özellikleri göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır (11). Peptitlerin yapısının omurgasında, bir tarafta bakteri hücre zarının fosfolipidlerini hedefleyen hidrofobik amino asitler, diğer tarafta ise pozitif yüklü amino asitleri içeren alfa sarmal yapılar bulunmaktadır.

Bu yapı, bir pozitif yüklü amino asit ve iki ila dört arasında değişen hidrofobik özellikteki amino asit ihtiva etmektedir. Peptitlerin yapısına, katelisinin 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 eklenmiştir. Pozitif yüklü amino asitlerin, fosfolipid zarının negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime gireceği, hidrofobik bölümün ise zar içine gömüleceği öngörülmüştür.

Tasarlanan peptitlerin yapısındaki amino asit değişiklikleri göz önünde bulundurulduğunda, peptitlerin hücre zarına olan etkinliği artar. Bu değişimin nöronlar üzerinde nasıl bir etkiye neden olacağı ve bu etkinin hangi moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleşebileceği bu tez çalışmasının araştırma konusudur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)

Konak savunma peptitleri (HDP) olarak da adlandırılan AMP'ler; virüsler, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere tüm canlı organizmalarda enfeksiyonlara karşı eski bir konak savunma mekanizmasını temsil eder (12). AMP'ler konakçı hücrenin korunmasında ve ilk canlı hücrel formların kompleks çok hücreli organizmalara evrilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hem doğal hem de edinilmiş bağışıklık sistemlerinden gelen yanıtlardan kaçınılırlar (13).

Bakteriyel direncin üstesinden gelmek için yeni antibiyotikler geliştirmek amacıyla önemli araştırmalar yapılmıştır. AMP'lerin yapısı ve işlevlerine odaklanma son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. AMP'ler, doğrudan antimikrobiyal bir aktivite sergileyerek, aracılı bağışıklık yanıtını tetikleyerek ve potansiyel patojenlere karşı konak organizmanın ilk savunma sistemi olan doğal bağışıklık tepkisinin önemli bir kısmını oluşturur (12,13).

Doğal AMP'lerin keşfi, Dubos'un *Bacillus brevis* tarafından üretilen antimikrobiyal bir ajan olan gramisidin'i topraktan izole ettiği 1939 yılına kadar uzanır. Gramisidin, geniş bir Gram pozitif bakteri aralığına karşı hem in vitro hem de in vivo aktivite göstermiştir. Daha sonra kobaylarda enfekte olmuş yaralara karşı etkili olduğu ve klinik kullanım için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (14). 1980'lerde, lineer katyonik α -sarmalı oluşturan peptitler, sekropinler (*Hyalophora cropropia*'dan) ve magaininler (*Xenopus laevis*'ten, Afrika pençe kurbağası) de dahil olmak üzere HDP'ler izole ve karakterize edilmişlerdir (15,16).

Keşiflerinden bu yana AMP'ler, tüm çok hücreli canlı organizmalarda tespit edilmiş, ek olarak, birkaç yüz AMP'nin biyolojik etkileri ve amino asit bileşimleri literatür bilgisine kazandırılmıştır (17). Antimikrobiyal özelliklerine ek olarak, AMP'ler, anjiyogenez, arteriyogenez, enflamatuar tepkiler, hücre sinyalleme ve yara

iyileşmesi tepkileri gibi hücre içi süreçlerde, yeni ilaçların araştırılmasında ve geliştirilmesinde ilginç adaylar olarak görülmektedir (18,19).

2.1.1. AMP'lerin etki mekanizması

Birçok AMP, mikrobiyal membranın fiziksel bütünlüğünün bozulmasına neden olarak ve/veya hücre içi hedefler üzerinde doğrudan etki ederek hızlı bir antimikrobiyal aktivite sergiler (20). Membran etkileşiminin, AMP'lerin doğrudan antimikrobiyal aktivitesi için, hem membranın kendisi hedeflendiğinde hemde translokasyon yoluyla hücre içi bir hedefe ulaşması gerektiğinde kilit bir öneme sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (21). Katyonik özellikte olan AMP'ler ve negatif yüklü bakteriyel yüzey arasında oluşan elektrostatik kuvvetler, peptit ve mikrobiyal membran arasındaki etkileşimin kritik belirleyicisidir (22). Bakteriler genellikle hücre zarı yapısındaki farklılıklara dayanarak Gram-pozitif ve Gram-negatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Gram-pozitif bakterilerde sitoplazmik membran kalın bir peptidoglikan tabakası ile çevrili iken, Gram-negatif bakterilerin sitoplazmik membranı, ince bir peptidoglikan tabaka ile çevrilidir (23). Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin sitoplazmik membranları, negatif yüklü gruplara sahip olan ve pozitif yüklü AMP'ler için oldukça etkileşimi yüksek fosfolipid fosfatidilgliserol, kardiyoipin ve fosfatidilserin yapıları bakımından zengindir (24). Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında ve Gram-negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaritlerin (LPS) yapısında bulunan teikoik asitler bakteri yüzeyine ek elektronegatif yük sağlar (23).

Mikrobiyal ve memeli hücre zarları arasındaki temel farklar, memeli hücrelerini AMP'lere karşı korumakta ve bu peptitlerin seçici etkilerini sağlamaktadır (21). Bakterilerin aksine, memeli hücrelerinin sitoplazmik zarı hem pozitif hem de negatif yüklü fosfolipidlerden olan fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin ve sfingomyelin bakımından zengindir, bu da nötr yüke sahip bir zar sağlar (21,25). Memeli zarlarında fosfolipidlerin asimetrik bir dağılımı vardır, yapısında pozitif ve negatif yük içeren fosfolipidler dış katmanda bulunurken, negatif yüklü gruplara sahip fosfolipidler sitoplazmaya bakan iç katmanda lokalize olurlar (26,27). Bu nedenle,

AMP'ler ve memeli hücre zarı arasındaki etkileşimler, temel olarak, AMP'ler ve bakteriyel membranlar arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimlere kıyasla nispeten zayıf olan hidrofobik etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Ayrıca, memeli hücre zarları, mikroorganizmaların aksine, yüksek bir kolesterol içeriğine sahiptir (26,28). Kolesterolün, ikili fosfolipit katman stabilizasyonu yoluyla AMP'lerin aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (26).

Özellikle, bakteriyel hücreler tipik olarak -90 ila -110 mV arasında değişen transmembran potansiyeline sahipken, memeli hücreleri -130 ila -150 mV arasında bir iç negatif transmembran potansiyeline sahiptir (24, 25, 29). Bakterilerdeki daha güçlü bir negatif membran potansiyeli, AMP'lerin bakteriyel ve memeli hücreleri arasındaki seçiciliğe katkıda bulunmaktadır.

2.1.2. Farklı hücrelerin AMP'lere karşı direnç mekanizmaları

AMP'ler tipik olarak çeşitli yapılarda üretilebilen küçük, elektrostatik olarak yüklü, amfipatik moleküllerdir. Yapısal olarak çeşitlilik gösterse de AMP'lerin çoğu bakteri hücre yüzeyi ile etkileşime girerek çalışmakta ve ardından hücre bütünlüğün bozulmasına neden olmaktadır. Buna göre, bakteriyel direnç mekanizmalarının çoğu, AMP'lerin bakteriyel hücre yüzeyi ile etkileşimini sınırlayarak işlev görmektedir. AMP direnç mekanizmaları, peptitlerin yakalanmasını veya sekestre edilmesini, AMP'lerin proteoliz ile tamamen imha edilmesini, AMP'lerin aktif taşıma yoluyla hücreden çıkarılmasını ve AMP'lerle etkileşimi önlemek için hücre yüzeyinin yapısal modifikasyonunu içermektedir. Bu direnç mekanizmalarının birçoğu AMP'lere cevap olarak düzenlenir, bu da bakterilerin AMP'lerin etkilerine adaptif olarak karşı koymalarını sağlamaktadır. Bu direnç mekanizmalarının kaybedilmesi, bakterilerin bitki veya hayvan konakçılarında kolonileşebilme kabiliyetlerini zayıflatabilir ve birçok patojen için virülansı hafifletebilir. Direnç mekanizmaları özellikle farklı bakteri suşları içinde gelişebilir veya diğer AMP dirençli organizmalardan genetik olarak aktarılabilir.

Ekstraselüler Direnç Mekanizmaları: Enzimatik Bozunma ve AMP Engelleme

AMP etkileşiminin ilk bölgesi bakteri hücre yüzeyindedir. AMP'nin inaktivasyonunun hücre dışı mekanizmaları, bakteri hücrelerine verilen zararı en aza indirmek için birinci savunma hattı olarak geliştirilmiştir.

Hücre dışı AMP direnç mekanizmaları enzimatik inaktivasyon ve sekestrasyon olarak iki ana biçimde ortaya çıkmıştır. Doğrudan hedefleme mekanizmalarının çoğu katyonik AMP'leri tanımak için gelişmiştir. Katyonik AMP'ler; teikoik asitler, lipid II ve fosfatidilgliserol de dahil olmak üzere (30) dış hücre zarındaki negatif yüklü kısımları kademeli olarak hedefleyebilen pozitif yüklü peptitlerdir. AMP'lerin proteazlarla bozulması, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* dahil olmak üzere birçok Gram pozitif bakteri türlerinde bulunan bir direnç mekanizmasıdır (31). AMP'lerin degradasyonuna neden olan proteazlar genellikle geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Bu proteazlar tipik olarak memeli patojenlerinde bulunur ve hem metalopeptidazları hem de sistein proteazları içermektedirler (32). AMP'lerin degradasyonuna neden olan proteazlar genellikle bakteriler tarafından kendilerini çevreleyen hücre dışı ortama salgılanır. Fırsatçı patojen *E. faecalis*'in bazı suşları tarafından üretilen hücre dışı bir metalopeptidaz olan jelatinaz, insan katalibidin LL-37'yi parçalayarak, *in vitro* antimikrobiyal aktivite kaybına neden olmaktadır (33).

Gram-pozitif proteazlar ayrıca AMP'leri bakteri yüzeyinde hedefleyebilir. SpeB, patojenik bakteri *Streptococcus pyogenes* tarafından salgılanan bir sistein proteinazıdır (34).

Membran ve Hücre Duvarı Modifikasyonları

Bakteriyel hücre duvarı ve membranı, AMP'lerin bakterisidal aktivitesi için ana bir hedef içermektedir (35). Bakteriler, hücrenin net negatif yükünü azaltarak, membran akışkanlığını değiştirerek veya AMP hedeflerinde doğrudan değişiklik yaparak AMP'lerin etkilerine karşı koymak için sıklıkla hücre yüzeyi bileşenlerinde modifikasyonlar meydana getirmektedirler (36).

AMP Akış Mekanizmaları

Hücre içindeki zararlı moleküllerin hücre dışına taşınması, Gram-pozitif bakteriler tarafından toksik bileşiklerin ve antimikrobiallerin hücrelerden uzaklaştırılmasında kullanılan yaygın bir mekanizmadır. Antimikrobiyal peptit akış mekanizmalarının çoğu, substratların hücre zarı boyunca ya da dışına taşınmasını sağlayan ve bunun için ATP kullanan çok proteinli ABC (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcı sistemlerinden oluşmaktadır (37).

2.1.3. AMP'lerin Önemi

AMP'lerin hızlı bakterisidal aktivitesi, onları terapötik kullanımları için umut verici adaylar yapmaktadır. Ayrıca, birçok AMP, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif organizmaları içeren polimikrobiyal enfeksiyonların hızlı bir şekilde arttığı karmaşık cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi durumlarda terapötik etki konusunda bir avantaj olarak bilinen geniş etkiye sahiptir (28). Bugüne kadar, sadece birkaç AMP, 1950'lerde tanıtılmış olan ve en iyi şekilde karakterize edilen polimiksin adlı antimikrobiyal peptit ile klinik kullanım için onay almıştır (38). Polimiksinler, Gram negatif patojenlerin neden olduğu ilaca dirençli enfeksiyonların intravenöz tedavisi için son çare ilaçlardır ve lokal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde topikal formülasyonlar olarak da uygulanabilmektedirler (39).

Genel olarak, AMP'ler, geleneksel antibiyotiklere kıyasla direnç indüksiyonuna daha az eğilimli olan etki mekanizmalarına sahiptir, antimikrobiyal ve immünomodülatör ajanlar olarak standart tedavilere göre daha umut verici alternatifler sunmaktadır. Klinik olarak uygulanmayan aday AMP'lerin başarılı klinik ürünlere dönüştürülmesindeki zorluklar iyi bilinse de yeni jenerasyon terapötik peptitlerin ve peptit mimetiklerinin keşfi ve ticari gelişimi; genel olarak bu peptitlerin etki ve direnç mekanizmalarını ve akıllı formülasyon stratejilerini anladıktan sonra ivme kazanacaktır.

2.2. Farklı canlılarda bulunan antimikrobiyal peptitlerin gruplandırılması

AMP'ler doğada birçok yerde bulunur, mikroplardan hayvanlara kadar çeşitli organizmalarda patojen ve zararlılara karşı konakçı savunma olarak görev almaktadırlar (40). AMP'ler farklı moleküler formlarda bulunmaktadır ve bunların çoğu böceklerden, hayvanlardan ve bitkilerden gelen doğrusal peptitlerdir.

Bununla birlikte, bakteriler antibiyotik gibi polisiklik peptitler üretirken, bitkiler siklotitler ve hayvanlar θ -defensinler içeren dairesel peptitler üretmektedir (41,42,43).

2.2.1. Bakterilerdeki AMP'ler

Hem katyonik hem de nötr özellikte olan antimikrobiyal peptitler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerden salgılanmaktadır. Bakterilerden salgılanan antimikrobiyal peptitler, bakteriyosin olarak adlandırılmakta ve bu peptit grubu altında sınıflandırılmaktadır (44). Bakteriyosinler genellikle posttranskripsiyonel modifikasyon ve/veya spesifik bağışıklık mekanizmaları (45) nedeniyle konakçı bakteriye çok az zarar verir veya hiç zarar vermez, bu etki sırasında spesifik bakteriyel rakipleri öldürmektedir. Protein sentezini inhibe eden koli basiline (*Escherichia coli*) ait 7-amino asit peptid mikrosin C7 ve peptidoglikan biyosentezini inhibe eden *Lactococcus* peptid mersasidin, bakteriyel fonksiyonları inhibe eden spesifik mekanizmalara sahiptir. Bununla birlikte, bu peptitlerin çoğunun, örneğin, nisin ve epidermidin, hedef hücre zarlarının geçirgenliğini değiştirerek etkinlik gösterdiği bilinmektedir (45,46).

2.2.2. Böceklerdeki AMP'ler

Böcekler, evrimsel süreçte diğer canlılara göre çok daha başarılı olmuşlardır, bu nedenle şu an mevcut olduğu bilinen tüm hayvan türlerinin dörtte üçlük bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Böcekler, dünyadaki birçok farklı ekolojik nişlerde bulunması nedeniyle sayısız potansiyel patojen bakteri, virüs, mantar, protozoan ve helmint parazitleri ile karşılaşmaktadırlar. Tüm bu potansiyel patojenlere karşı oldukça etkili savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (47). H.G. Boman 1970'li

yıllarda, Cecropia güvesinin pupalarına yaptığı bakteri enjeksiyonu sonucunda immün proteinlerin sentezinin arttığını gözlemlemiştir. Boman, bu proteinlerin birçoğunu saflaştırmıştır ve sekropinler ve attasinler olmak üzere iki yeni antibakteriyel peptit tanımlamıştır (48)(49). Daha sonraki süreçlerde birçok bilim insanı çeşitli böcek kaynaklarından yeni AMP'ler izole etmişler ve şu an bu peptitlerin sayısı 150'ye ulaşmıştır.

Böceklerde ifade edilen AMP'ler yapısal olarak dört ana grup olarak sınıflandırılır; (a) amfipatik α -sarmalı oluşturan peptitler, (b) intramoleküler disülfür köprülerine sahip β -tabakalı peptitler, (c) prolin bakımından zengin antibakteriyel peptitler, (d) glisin bakımından zengin polipeptitler (47).

Birçok AMP, diğer peptitler gibi etkinliğini hücre zarı üzerinde göstermektedir (50). Hücre zar yapısındaki kanal proteinlerin iletkenliğini değiştirerek zarda delik meydana getirmekte ve bu şekilde antimikrobiyal özellik sergilemektedir (51).

2.2.3. Amfibilerdeki AMP'ler

Amfibiler geniş bir evrimsel geçmişe sahiptir ve bu süreçte karşılaştıkları birçok mikroorganizma ile başa çıkmak için çeşitli bağışıklık savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Şu ana kadar tanımlanan 6400 farklı amfibi türü bulunmaktadır (52) ve bu listeye her geçen gün yenileri eklenmektedir (53).

Son birkaç on yılda amfibi türlerinin durumunu değerlendirmek için yapılan araştırmalar, birçok amfibi popülasyonunun azaldığını ve bazı türlerin neslinin tükendiğini göstermektedir (54, 55). Birçok bilim insanı, etkileşimli faktörlerin amfibi popülasyonundaki düşüslere neden olabileceğini düşünmektedir. Bunların arasında habitat tahribatı (56), iklim değişikliği (57), artan ultraviyole-B ışınları (58), yerli olmayan türlerin farklı ekolojik alanlara salınımı (59) ve çevre kimyasalları (60) bulunmaktadır.

Kara kurbağaları amfibi derilerinde bulunan birçok molekülün aynı kökene sahip olduğu ve bu nedenle bu hayvanların derilerinin oldukça zengin AMP kaynağı olduğu bilinmektedir. İlk AMP, yaklaşık 30 yıl önce Avrupa kurbağa türlerinden

olan *Bombina variegata*'nın derisinde bulunmuştur. Çeşitli bakteri, protozoa ve mantarlara karşı geniş spektrumlu mikrobisitler gibi davranan amfibi peptidleri, benzersiz özellikleri ve potansiyel terapötik kullanımı nedeniyle artan ilgi uyandırmaktadır.

Phyllomedusa ağaç kurbağalarının derisinde ifade edilen ve geniş bir AMP ailesine ait olan dermaseptinler, yapısal özelliklerinin aydınlatılması için yaygın olarak araştırılmaktadır. Hemolitik ve anti-mikrobiyal dermaseptin S4'ün peptidinin yapısının, membran bağlanma özelliklerinin ve sitotoksik aktivitesinin detaylıca araştırılması; iki pozitif ve negatif elektrostatik potansiyel yüzey lobunun açık bir şekilde ayrılması ile aktif türevlerin ortak bir amfipatik yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır (61).

2.2.4. Bitkilerdeki AMP'ler

Birçok bitki; kuraklık, soğuk, ağır metal, kirlenici maddeler, mantar, bakteri ve virüslerin neden olduğu patojen saldırıları gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik stres koşullarına karşı koymak için çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkilerde çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara cevap olarak, kazanılmış direnç mekanizmaları ile ilişkili birtakım genlerin ifadesinde artış olduğunu gösterilmiştir (62).

Genel direnç; fitoaleksinler, tanenler ve polifenolik bileşikler gibi sekonder metabolitlerin salınması ve patogenez ile ilişkili (PR) proteinlerin üretilmesi ile sağlanmaktadır. PR proteinleri ilk olarak 1970'lerin başında tütün yapraklarında, totobak mozaik virüs enfeksiyonlarına yanıt olarak üretildiği keşfedilmiş ve daha sonra patojenik saldırılar sırasında salınan uyarılmış proteinler olarak tanımlanmıştır (63).

Yakın zamanda yapılan bir incelemeye göre, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, chitinaz ve proteinaz inhibe edici aktiviteye sahip ve savunma ile ilgili çok çeşitli özellikler gösteren, şu ana kadar tespit ve izole edilmiş en az 17 farklı AMP ailesi bitkilerde tanımlanmıştır (64).

Bitkilerde, AMP'lerin çoğu, kompakt bir yapının oluşmasını sağlayan, kimyasal ve proteolitik bozulmaya karşı direnç kazandıran çoklu disülfid bağlarının (genellikle iki ila altı) oluşmasına neden olan Sistein bakımından zengin amino asit dizilimlerine sahiptir (65).

Genel olarak, bitki AMP'leri mikrop, böcek ve hayvanlarda bulunan AMP'ler ile ortak özelliklere sahiptir. Bunların başında, moleküler formları, pozitif yükleri ve amfipatik yapıları gibi özellikler gelmektedir. Tüm bu özellikler AMP'lere antifungal, antibakteriyel ve antiviral etkinlik kazandırmaktadır. Bu özellikler, Sistein bakımından zengin amino asit dizisine sahip iki farklı AMP ailesi tiyoninler ve bitki defensinleri tarafından ortaya konmaktadır.

Diğer bitki AMP aileleri, hayvan AMP'lerinden farklı bir mekanizma yoluyla patojenler üzerinde etki etmektedirler. Örneğin, hevein benzeri peptitler kitinleri bağlar, knottin tipi peptitler ise proteazlar gibi enzimleri inhibe eder, lipid transfer proteinleri hücre zarlarına lipidleri bağlayarak mikrobiyal penetrasyonu bozmaktadırlar.

Bitki AMP familyalarının sınıflandırılması büyük ölçüde, iki komşu Sistein amino asidi arasında tanımlanmış, Sistein olmayan amino asit dizisinin sayısına göre yapılmaktadır. Bu Sistein motiflerini kullanan sekans analizi ve genomik veri madenciliği, AMP özelliklerine sahip Sistein bakımından zengin peptitlerin (CRP) önceden tahmin edilemediğini ortaya koymaktadır (66).

Bitkilerde ifade edildiği bilinen birçok AMP, genel olarak tiyoninler, bitki defensinleri, hevein benzeri peptitler, knottin benzeri peptitler, snakinler ve siklotidler olmak üzere altı farklı peptit ailesi altında sınıflandırılmıştır.

Tiyoninler (Thionins)

Tiyoninler; arginin, lizin ve sistein amino asitleri bakımından zengin, düşük moleküler ağırlıklı (yaklaşık 5 kDa) olan AMP ailesidir. Yapıları iki antiparalel α -sarmalı ile üç veya dört disülfür bağlantısı olan antiparallel çift sarmallı bir β -

tabakası içerir. Nötr pH ortamlarda pozitif olarak yüklenirler. α -sarmalı ile β -tabakası arasında kalan bölge Tyr 13 amino asidini içerir ve bu da hücre lizis mekanizması olarak kabul gören hücre sızıntısına neden olmaktadır (67).

Tiyoninler; bakteri, mantar ve mayalara karşı toksik etki göstermektedirler. On beşten fazla bitki türünde (örneğin; monokot, dikotiledon ve rositler) yaklaşık 100 farklı tiyonin amino asit dizisi tanımlanmıştır (68). İlk olarak tiyoninler 1942 yılında Balls ve arkadaşları tarafından buğday endosperminden izole edilmiştir ve sonrasında purotiyonin olarak adlandırılmıştır (69) Tiyonin ismi, iki farklı bitki peptid grubu için kullanılır, bunlar α/β - tiyoninler ve γ - tiyoninlerdir. γ -tiyoninler, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan ve defensinler adı verilen geniş bir membran aktif peptid familyası ile çok daha yakın benzerlik göstermektedir (70). Thioninler, ~ 20 amino asit uzunluğunda ana bir peptid ve ~ 60 amino asit uzunluğunda yardımcı bir peptid ile ortak bir gen yapısına sahiptir. Bu ortak gen yapısı bazik toksinleri nötralize etmektedir (68). Ana peptid grubunun bölünmesi, toksinlerin aktivasyonu için gereklidir. Birçok farklı tiyoninler, endospermden yapraklara kadar hemen hemen her önemli bitki dokusunda bulunmaktadır. Tiyoninlerin toksik etkilerinin, bağlandıkları hücre zarlarının parçalanmasına neden olduğu için ortaya çıktığı varsayılmaktadır.

Toksisitenin altında yatan kesin mekanizma bilinmemektedir. Tiyoninlerin antifungal aktivitesi, pozitif yüklü tiyonin ile fungal zarlarda bulunan negatif yüklü fosfolipitler arasındaki elektrostatik kuvvetlerin neden olduğu protein-membran etkileşimi sonucu görülmektedir (71).

Bitki Defensinleri (Plant Defensins)

Bitki defensinleri ilk olarak buğday türü *Triticum aestivum* ve arpa türü *Hordeum vulgare*'den izole edilmiştir. Bitki defensinleri yaklaşık 5 kDa ağırlığında, bazik özellikte ve sistein bakımından zengin amino asit dizisine sahiptir. Çoğu bitki defensinleri 45-50 amino asit uzunluğunda ve pozitif yüklü olarak bulunmaktadır. Bitki defensinleri için bildirilen biyolojik aktiviteler arasında antifungal, antibakteriyel, proteinaz ve böcek amilaz inhibitör aktiviteleri bulunmaktadır (72). Bitki defensinlerinin üç boyutlu moleküler yapısı, dört disülfür köprüsüyle paralel

olarak stabilize edilmiş bir α -sarmalı ile üç iplikli β -tabakası tarafından şekillenmektedir. Bitkilerde ifade edilen defensinler, memeli ve böceklerin savunma mekanizmasında görev alan peptitler ile aynı ortak korunmuş bölgelere sahiptir. Bitki defensinleri genellikle monomerik formlarda bulunan bir alt birimden oluşmaktadır ve bu nedenle farklı monomerik yapıdaki alt birime sahip defensinlerin farklı etkilere neden olduğu düşünülmektedir.

Muhtemel defensinler, mantar hücre zarı lokalizasyonunda reseptör olarak glukosil seramidleri kullanmakta, ardından defensinlerin pozitif yükleriyle hücre zarına itilmesi, membranın bozulmasına, zarın dengesizleşmesine ve iyon akışına yol açmaktadır (73). Bitki defensinleri gösterdiği etki açısından; (a) mantar iplikçiklerinin morfolojik yapısını bozarak fungal büyümeyi önleyen ve (b) morfolojik bozulma olmadan mantar büyümesini önleyen olarak iki kısımda incelenebilir (74). Çoğu bitki defensini tohumlardan izole edilmektedir. Örneğin, turp bitkisinin tohumlarında bulunan defensin RS-AFP'ler tohumdaki toplam proteinin % 0.5'ini temsil etmektedir. Defensinler, ayrıca *Heuchera sanguinea* (Hs-AFP1), *Raphanus sativus* (Rs-AFP1), *Aesculus hippocastanum* (Ah-AMP1), *Dahlia merckii* (Dm-AMP1) gibi bitki türlerinin yapraklarından, baklalarından, yumrularından, meyvelerinden, köklerinden, kabuklarından ve çiçek organlarından izole edilebilmektedir (69). Defensinler normal bitki büyümesi ve gelişimi sırasında birçok dokuda ifade edilmekte, çevresel faktörler ile biyotik ve abiyotik stres tarafından indüklenmektedir (75). Patojen enfeksiyonu sonucu indüklenen defensin gen ifadesinin, bezelye, tütün, arabidopsis ve ladin ağaçlarında arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76). Bitki defensinleri; bakteri, maya, oomycetes ve nekrotrofik patojenler gibi geniş spektrumdaki bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri göstermektedirler (77). Ayrıca birçok bitki defensini, antikanser ve antiviral özelliği sayesinde tıbbi uygulamalar için potansiyel ilaç olarak düşünülmektedir (78).

Hevein benzeri peptitler (Hevein like peptides)

Hevein, *Hevea brasiliensis* türü kauçuk ağacının lutoid gövdelerinde bulunan, kitin bağlayıcı özelliği olan ve yaklaşık 4,7 kDa ağırlığında sistein bakımından

zengin bir peptittir (79). Bu protein, kitine bağlanarak mantar iplikçi uzantılarının gelişimini inhibe etmektedir. Antimikrobiyal aktiviteye sahip diğer hevein benzeri proteinler, farklı bitki türlerinde de tanımlanmıştır (80). Hevein benzeri peptitler yaklaşık 43 amino asit uzunluğunda bir diziyeye sahiptir. Bilinen tüm kitin bağlayıcı proteinler, karbonhidratın bağlanmasından sorumlu olan, kitin bağlama bölgesi olarak adlandırılan ve birkaç sistein ve glisin dizisi içeren 20-40 amino asitlik korunmuş ortak yapısal bir motif içermektedir. Hevein benzeri AMP'lerde bulunan disülfid bağlarının sayısı farklılık göstermektedir. Birçoğunda dört disülfid bağı oluşturan sekiz sistein amino asit dizisi bulunmaktadır (81).

Knottin benzeri peptitler (Knottin like peptites)

Knottin benzeri antifungal özellikteki peptitler, *Mirabilis jalapa* L. (Mj-AMP1) ve *Phytolacca americana* (PAFP-S) türü bitkilerden izole edilmiştir (82). *Phytolacca americana* bitkisinden elde edilen PAFP-S peptitinin yapısı, 2 farklı paralel olmayan β -yapraklarını birbirine bağlayan uzun bir ilmek bölgesi olmak üzere 3 zincirden meydana gelmektedir. Bezelye bitkisinden izole edilen PA1b peptiti, vakuolar ATPaz inhibisyonu üzerinden böcek öldürücülere etki etmektedir (83).

Snakinler (Snakins)

Snakin olarak adlandırılan peptitler patates yumrularından izole edilmiştir. Moleküler ağırlıkları ortalama 6.9 kDa olan ve 63 amino asitlik peptit dizisine sahip hücre duvarı ilişkili snakin-1 (StSN1) ve snakin-2 (StSN2) peptitleri %38'lik benzerlik göstermektedir. Bu peptitler, farklı bitki türlerinin bakteri ve mantar patojenlerine karşı benzer antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. Bütün snakin peptitlerinde 12 farklı korunmuş sistein dizisine ve altı tane disülfid bağı bulunmaktadır (84). Snakin peptitlerinin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Patates bitkisinde bulunan StSN1 geni, gelişim sırasında farklı dokularda tutarlı bir şekilde ifade edilmektedir fakat abiyotik veya biyotik strese karşı yanıt oluşturmamaktadır. StSN2 geninin ifadesi ise yara ile lokal olarak indüklenmekte ve patojen enfeksiyonlarına karşı farklı tepkiler oluşturmaktadır. Snakin peptitlerinin yapısında altı disülfür bağının bulunması ve sistein amino asiti bakımında zengin bir diziyeye sahip olmasından dolayı stabil bir moleküler yapıları vardır (85).

Siklotidler (Cyclotides)

Siklotitler; bakteri, bitki ve hayvanlarda keşfedilmiş ve doğal olarak dairesel bir moleküler yapıya sahip protein grubudur (86). Bitki siklotidleri, ribozomal biyosentez yolağı üzerinden üretilen ve gen sekansı bitkinin genomik DNA'sında kodlanmış peptitlerdir. Bitki siklotidleri 28-37 amino asit içermektedir ve yapısında siklik sistein düğümü (CCK) olarak adlandırılan bir yapı bulunmaktadır. Bu sistein düğümü, sistein1 ile sistein4 ve sistein2 ile sistein5 dizileri arasında disülfid bağının varlığı ile meydana gelmektedir (87). CCK, siklotidlerin yapısal stabilizesinden sorumludur ve proteinin hidrofobik kısımlarını moleküler yüzeye maruz kalmaya zorlamaktadır. Hidrofobik dizi yüzey üzerinde bir yama oluşturarak genel yapının amfipatik özellik kazanmasına neden olur (88). Birçok bitki siklotidleri, proteolitik ve parçalayıcı süreçlere karşı dirençli aktivite göstermektedir. Siklotid yapılar, korunmuş sistein dizileri arasında altı farklı düğüm ve bu düğümdeki farklı sekans çeşitliliğinden meydana gelmektedir (89). Örneğin, düğüm 1 ve 4 hem büyüklük hem de amino asit dizisi açısından yüksek oranda korunurken, diğer düğümlerdeki sekans ve moleküler yapı daha değişkendir. Yapısal benzerliklerine dayanarak siklotidler iki alt aileye ayrılabilir; (a) sis-prolin bakımından zengin olan grup ve (b) sis-prolin dizisi içermeyen grup (90).

2.2.5. Memelilerdeki AMP'ler

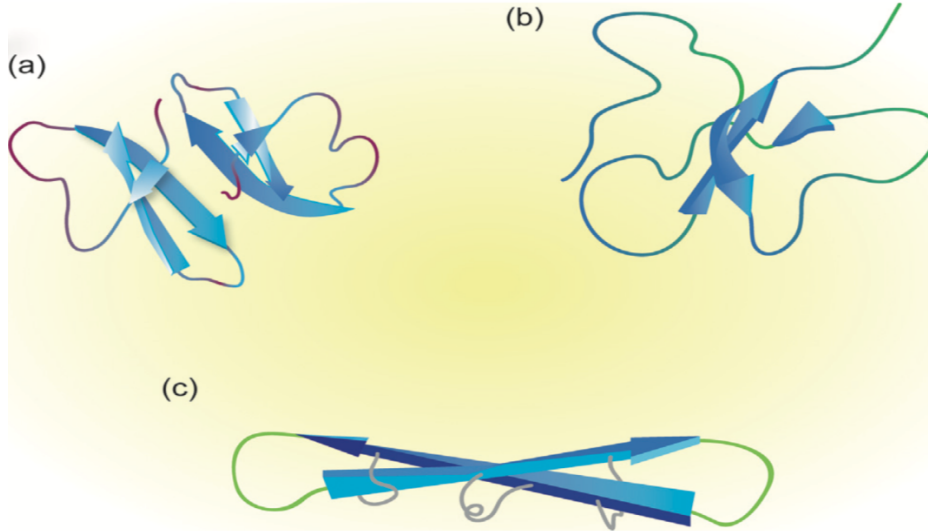
Memelilerden izole edilen AMP'ler; nötrofillerin granülleri içerisinde, epitelyal hücrelerin mukozal veya cilt salgılarında, proteinlerin bozulma ürünleri olarak bulunabilmektedir (91). Özel bir antimikrobiyal fonksiyona sahip olan nötrofiller, bakteri yok edici/geçirgenlik arttırıcı proteinler, katyonik antimikrobiyal proteinler, lizozim, laktoferrin, bastenesinler, defensinler, indolisidinler ve katelisinler dahil olmak üzere bir dizi antimikrobiyal protein ve peptid içermektedir (92). Epitel hücreleri (β -defensinler üreten) ve trombositler (trombosit mikrobisidal proteinler üreten) gibi diğer hücre tipleri de antimikrobiyal özellikte maddeler üretmektedir. En çok araştırılan memeli peptidleri defensinlerdir (93). Defensinler β -defensinler ve α -defensinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Her iki grup defensinler de üç çift disülfid bağlı sistein ve yüksek miktardaki arginin içeriğine sahiptir, ancak sisteinlerin yeri ve bağlanabilirliği iki grup arasında farklılık göstermektedir.

Memelilerde, klasik defensinler olarak adlandırılan α -defensinler başlıca nötrofiller ve Paneth hücrelerinde bulunmaktadır ve α -defensinler epitelyal hücrelerden, nötrofillerden ve lökositlerden izole edilebilmektedir. Memeli defensinlerinin; bakteri, mantar ve virüs gibi birçok patojene karşı çeşitli aktiviteleri bulunmaktadır (93). Katyonik proteinlerin proteolitik bozulmasının, antimikrobiyal peptidlerin oluşumuna da katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

2.3. İnsanda bulunan antimikrobiyal peptitler

2.3.1. Defensinler

Antimikrobiyal aktiviteye sahip küçük katyonik peptitler ilk olarak 50 yıl önce tavşan lökositlerinden izole edilmiştir (94). 1985 yılında, insan nötrofillerinden izole edilen üç homolog sistein bakımından zengin bir AMP olan insan nötrofil peptidi 13 (HNP13) için “defensinler” terimi kullanılmıştır (95). Memelilerde üç defensin familyası yapılarına göre α -, β - ve θ -defensinler olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.3.1).



Şekil 2.3.1: Her üç defensin familyasından peptitlerin gösterimleri (a) α -defensinlerin üç boyutlu yapısal gösterimi, (b) β -defensinlerin üç boyutlu yapısal gösterimi ve (c) θ -defensinlerin üç boyutlu yapısal gösterimi. Antiparalel β -tabakaları mavi renkte ve disülfür bağları gri renkte gösterilmektedir (Kaynak: Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman. Molecular Medical Microbiology (Second Edition), Academic Press, 2015: 2097-2195).

B - defensinler, sığır trakeal epitel hücrelerinden 1991 yılında izole edilmiş (97), siklik formdaki θ - defensinler ise bir makak türü olan hint şebeğinin polimorfonükleer lökositlerden (PMN) 1999 yılında izole edilmiştir (98). İnsan hücrelerinde hem α - hem de β - defensinler ifade edilirken, durdurucu kodonda meydana gelmiş evrimsel mutasyon sonucu θ - defensin peptidlerini eksprese edilemez (99). İnsanlarda altı farklı α - defensin ve on farklı β - defensin peptit varyantının olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (100).

α -Defensinler

α -defensinlerin altı farklı varyasyonun hepsi insan hücrelerinde ifade edilir ancak farklı dokularda ekspresyon seviyeleri farklıdır. İnsan nötrofil peptit 14 (HNP14), nötrofil hücrelerinin depolama granüllerinde yüksek seviyede ifade edilirken insan defensin 5 ve 6 (HD5, HD6) peptitleri ise ince bağırsağın Paneth hücrelerinde eksprese edilmektedir (101). HNP'ler hem immatür nötrofillerde (kemik iliğinde bulunan promyelosit hücreleri) hem de dolaşımdaki matür nötrofillerde sentezlenir, bununla birlikte α -defensin pro-peptidleri sadece promyelositlerde işlenerek fonksiyonel hale gelebilir (102). α -defensinler, patojenler tarafından degranülasyonun aktive edilmesine kadar nötrofillerin veya Paneth hücrelerinin granüllerinde depolanmaktadır. HD5 ve HD6 peptitleri servikal ve seminal sıvı içerisinde bulunmaktadır ve hem kadın hem de erkek üreme sistemindeki enfeksiyon durumlarında yanıtlar oluştuğunda ekspresyonları artmaktadır (103).

β -Defensinler

β -defensinler başlıca bağırsak, cilt, hava yolu, ağız, böbrek, burun, gözler, meme bezleri ve dişi - erkek genital yollarındaki mukoza yüzeylerinde bulunan epitel hücreleri tarafından ifade edilmektedir. İmmatür haldeki α -defensinin öncül parçasının aksine, β -defensin kısa ve eksik bir öncül parçadan oluşmaktadır, bu sayede immatür halde bulunan β -defensinler fonksiyonel açıdan nötr özellik gösterebilmektedir. İnsan β -defensin 2 (HBD2)'nin lameller granüllerde salgılandığı ve bu bölümlendirilenin, yüksek derecede yüklü β -defensinlerin, salgılanana kadar hücrel membranlarla etkileşime girmesinin önlenildiği bir mekanizma sağlayabileceği gösterilmiştir (104).

2.3.2. Dermisidinler

Proteolizi indükleyici faktör (PIF) olarak da bilinen dermisidin, insanlarda DCD geni tarafından kodlanan bir proteindir (105). İnsan ektrin ter bezleri tarafından temel işlevi doğal bağışıklık sistem savunmasının bir parçası olan derinin yüzeyinde anti-mikrobiyal etkinlik amacıyla salınmaktadır. Anti-mikrobiyal aktiviteyi, hedef hücrede iyon kanalı oluşturarak veya protolitik etkinlik sonucu göstermektedirler. İnsan dermisidin geni, 53.324,699–53.328,544 konumunda 12q13.1 kromozomunda bulunmaktadır. Matür formdaki dermisidin RNA'ları 110 amino asitlik öncül proteinleri kodlamaktadır ve moleküler ağırlıkları ortalama 11.2 kDa'dur. 2001 yılında Birgit Schitteck tarafından keşfedilen dermisidinler hakkında literatürde çok fazla mevcut değildir (181).

2.3.3. Histatinler

Histatinler, insan tükürüğünde (106) bulunan 3-4 kDa'lık küçük, katyonik, histidin bakımından zengin bir peptid ailesini ihtiva etmektedir. Bu peptitler yapısal olarak submandibular, dil altı ve parotid bezleri tarafından üretilir ve salgılanır (107). Histidin bakımından zengin olan bu peptitler, ilk olarak 1970'lerin başında mikroorganizmaların glikolitik aktivitesini artıran peptitler olarak tanımlanmıştır (108). Daha sonra yapılan çalışmalar, potansiyel bakterisidal etkilerinin olduğunu (109) ve daha da önemlisi fungisidal özelliklerini ortaya koymuştur (110). Bu peptitler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturmaktadır ve ağız boşluğundaki enfeksiyonları sınırlandırarak ağız sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Histatin peptid ailesi birkaç üyeden meydana gelmektedir (111), bunlardan en önemlileri histatin 1, histatin 3 ve histatin 5'dir. Histatinler, birbirine yakın iki gen (HIS1 ve HIS2) tarafından kodlanmaktadır ve bu genlerden HIS1'in ürünü olarak histatin 1, HIS2'nin ürünü olarak histatin 3 sentezlenmektedir. Histatin 5 peptiti ise, histatin 3'ün farklı işlemlere maruz kalması sonrasında ürün olarak sentezlenir (112). Bu üç peptidin karakterizasyonu, sırasıyla 38, 32 ve 24 amino asit dizisi içeren lineer yapıya sahip olduklarını ve her birinin ortak yedi histidin dizisine sahip olduğunu

göstermektedir (113). Sekonder yapının karakterizasyonu, histatin 5'in, sulu solventlerde rastgele bir bobin yapısına ve sulu olmayan solventlerde bir helezon yapısına büründüğünü göstermektedir (114). Tüm histatinler arasında, histatin 5 en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve histatinler üzerinde yapılan birçok araştırma bu peptide odaklanmıştır. Histatin 5, patojenik mantar türleri olan *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'a karşı güçlü antifungal aktiviteye sahiptir (115). Antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, histatinlerin birçok farklı özellikleri bulunmaktadır. Histatinler, hidroksiapatitlere (116), insan tükürük müsin MG1'e (117) ve tanenler'e, bitki kaynaklı polifenolik bileşiklere bağlanabilmektedirler (118). Ayrıca histatin 5, insan fibroblastlarından enflamatuar sitokin indüksiyonunu (119), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'ın lökotosin aktivitesini (120) ve periodontal hastalıkta ortaya çıkan bakteri enzimlerini inhibe etmektedir (121) Bununla birlikte metalopeptit benzeri özellik sergilemektedir (122).

Histatin 5'in 12-amino asitlik bir fragmanı olan P-113, ana bileşiği ile karşılaştırılabilir antikandidal aktiviteyi koruyan en küçük fragman olarak tanımlanmaktadır (123). Bu peptit, ağız durulama ve jel formülasyonlarında faz I / II klinik çalışmalarında güvenliğini ve plak ve diş eti iltihabına karşı etkinliğini değerlendirmek için kullanılmış ve her iki çalışmanın verileri de bu formülasyonların insanlar tarafından güvenli ve tolere edilebildiğini göstermiştir. Ek olarak, insan deneysel dişeti iltihabı modelinde diş eti kanaması, dişeti iltihabı ve plak gelişimini azalttığı gösterilmiştir (124).

2.3.4. Katelisidinler

Katelisidinler, yüksek oranda korunmuş bir sinyal sekansı ile katelin'e oldukça homolog olan katepsin L inhibitörü olan bir öncül bölge içeren proteinlerden elde edilen AMP ailesidir (125). İnsanlarda sadece LL-37 olarak adlandırılan bir katelisidin varyantı karakterize edilmiştir. Bu peptit, insan CAP18 proteininin (hCAP18) C-terminal ucundan proteolizle türetilmektedir (126). Bu peptit nötrofiller, monositler, NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri gibi lökositlerde, ayrıca testis, deri, gastrointestinal ve solunum yollarının epitel hücrelerinde ifade edilmektedir (127). LL-37, enflamatuar veya bulaşıcı uyarılar tarafından indüklenmektedir (128) ve hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik

göstermektedir (129). Antimikrobiyal aktivitesinin yanı sıra, bu peptit, LPS'yi bağlayarak nötralize eder ve endotoksik şoka karşı korur (130). Ayrıca, nötrofiller, monositler, mast hücreleri ve T hücreleri için kemotaktik özellik sergilemektedir. Mast hücrelerinin degranülasyonunu indüklerken, makrofajlarda transkripsiyonel tepkileri değiştirir, iyileşmekte olan yaralarda vaskülarizasyonu ve yeniden epitelizasyonu uyarır (131). Antitümör aktivitesine sahip olan (132) LL-37 peptidi, 37 amino asit dizisinden oluşmaktadır ve sistein içermediğinden doğrusal bir yapıya sahiptir. Peptit, hidrofilik bir ortamda büyük ölçüde rastgele bir bobin konformasyonunu sergilerken ve hidrofobik ortamda ise α -sarmal bir yapı göstermektedir (133).

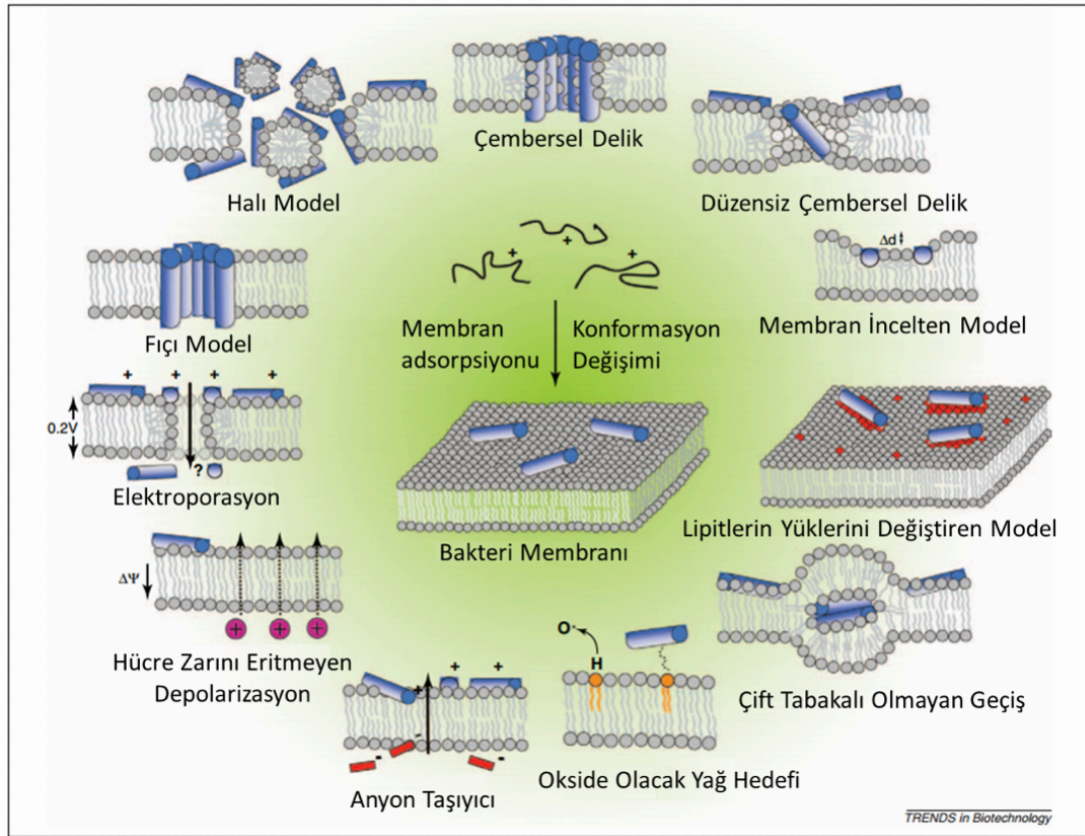
2.4. İnsan katelisinlerin etki mekanizması

LL-37'nin konakçı hücreleri farklı şekillerde etkileme kapasitesi üzerine birçok makale yayınlanmıştır, öyle ki son zamanlarda factotum peptidi olarak adlandırılmaktadır (134)(182). LL-37 peptidinin, dolaşan konak immün hücrelerinde bir kemotaktik aktiviteye neden olduğu, pro-enflamatuar sinyal moleküllerinin epitel veya dolaşımdaki hücrelerden salgılanmasını sağladığı ve mikrobiyal bileşenlerin pro-enflamatuar aktivitelerini modüle ettiği literatür bilgisinde gösterilmiştir (183). Bu etkiler, konak hücre reseptörlerini aktiveleştirme, işlemden geçirme veya moleküler kargonun konak hücrelere translokasyonu ile sağlanmaktadır.

LL-37'nin bütün bu özellikleri, sulu tuz çözeltisi içindeki farklı katlanma eğilimi sayesinde etkinlik göstermektedir. Peptidin 3 boyutlu konformasyonu hem konak hücrelerin nötr membranlarını hem de hücre dışı mikrobiyal veya endojen molekülleri ile etkileşerek görev yapmaktadır.

Temel olarak, LL-37'nin konakçı hücre aktivitelerini etkileyebileceği Şekil 2.4'de gösterildiği üzere birçok mekanizma üzerinden gerçekleşebilmektedir: (1) Hücre zarlarında geçici gözenekler veya lezyonlar oluşturarak hücre dışına salınacak maddelerin çıkışına yardımcı olabilmektedir. (2) Alıcıları çevreleyen zar bölgelerinde birikebilir ve daha sonra bağlanma bölgeleriyle veya trans membran bölgeleriyle etkileşime girerek bunları aktive edebilmektedir. (3) Membran bağlantılı

faktörlerle etkileşime girerek serbest bırakılma / aktivasyona ve reseptör etkinleştirilmesine neden olabilmektedir. (4) Mikrobiyal LPS, LTA veya hasar görmüş konak hücrelerden salınan materyaller gibi hücre dışı bileşenleri bloklayabilir ve bunların TLR reseptörleri ile etkileşimlerini önleyerek, pro-enflamatuar etkilerini azaltabilmektedir. (5) Alternatif olarak daha kontrollü bir pro-enflamatuar yanıt için endositozla hücre içi reseptörlere veya bölmelere bu tür molekülleri etkili bir şekilde iletebilmektedir.



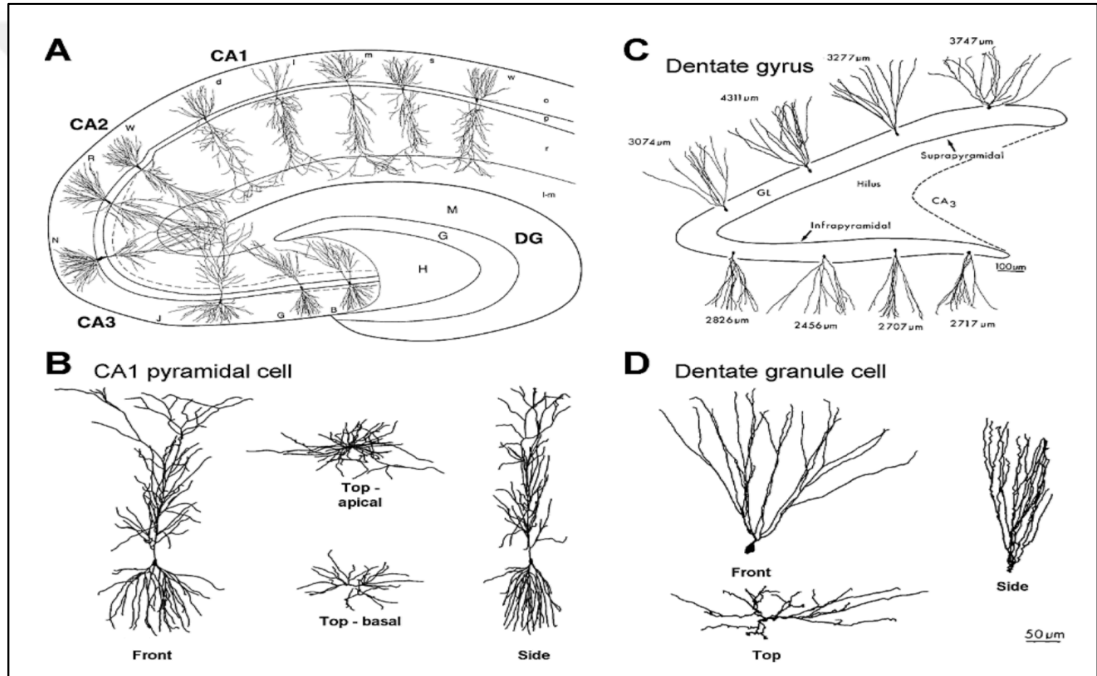
Şekil 2.4: AMP Etki Mekanizmaları Grafiği Antimikrobiyal peptitlerin bakteri sitoplazmik membranı üzerindeki etki mekanizmaları (Kaynak: Ünübol N. Doğal Peptit Antibiyotiklerden Esinlenerek Yeni Etkin Antibakteriyellerin Geliştirilmesi. Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2017 (Danışman: Prof. Dr. A Allahverdiyev))

2.5. Hipokampal Nöronlar

2.5.1. Morfolojileri

Hipokampus dokusu, insan ve diğer omurgalı canlılarda merkezi sinir sisteminin önemli bir bileşenidir. İnsan ve memelilerde beyin her iki hemisferinde bir tane

olmak üzere iki tane hipokampus dokusu bulunmaktadır. Hipokampus, serebral hemisferlerin dorsomedial yönlerinden gelişen filogenetik olarak çok eski bir kortikal yapıdır “archicortex”. Hipokampus dokusu, kortikal tabakanın birbirine kenetlenmiş iki kıvrımından, hipokampus ve dentat girus’dan (DG) oluşur (135). Makroskopik olarak, hipokampusun kavisli yapısı, bir koç boynuzu ile benzerlik göstermektedir, bu nedenle Latince *cornu ammonis* (CA) olarak da isimlendirilmektedir. Kranial “septal” kutup, yarımkürenin dorsal kısmında orta hatta yakın, korpus kallozumun altında, kaudal “temporal” kutup ise temporal loblara ventrolateral olarak uzanır (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5.1: Hipokampus hücrelerinin morfolojisi (a) CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki piramidal hücreler. **(b)** Ön, yan ve üst görünümünden gösterilen bir CA1 piramidal hücrenin üç boyutlu yapısı. **(c)** Dentat girus’da bulunan granül hücrelerinin çeşitliliği. Hücelere bitişik değerler toplam dendritik uzunluğu belirtmektedir. **(d)** Ön, yan ve üst görünümünden gösterilen bir granül hücrenin üç boyutlu yapısı. (Kaynak: Vida I. (2010) Morphology of Hippocampal Neurons. In: Cutsuridis V., Graham B., Cobb S., Vida I. (eds) Hippocampal Microcircuits. Springer Series in Computational Neuroscience, vol 5. Springer, New York, NY)

CA1 Pramidal Nöronları

CA1’in piramidal hücreleri, beyindeki en iyi araştırılmış nöron türlerinden biridir. Bu nöronlar bir piramidal veya oval hücre gövdesi, büyük kalibreli apikal bir dendrit ve birkaç küçük kalibreli bazal dendrit ile karakterize edilmektedir.

CA3 Piramidal Nöronları

CA3 bölgesinin piramidal hücreleri, morfolojilerinde CA1 piramidal hücrelerine birçok yönden benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, dikkate değer farklılıklar da vardır. Hücre gövdeleri daha büyüktür ve CA1 piramidal hücrelerinkinden yaklaşık iki ila dört kat daha yüksek bir yüzey alanına sahiptir. CA3 piramidal hücrelerin proksimal dendritleri büyük kompleks dikenlere sahiptir (“dikenli dışlamalar”). Bu kompleks dikenler, yosunsu lifli uzantıların postsinaptik hedefleridir (137).

CA2 Piramidal Nöronları

CA2 piramidal hücreleri, CA1 ve CA3 alanlarının arasında lokalize olurlar ve benzer morfolojik özellikler gösterirler. Bu nöronların hücre gövdeleri, CA3 nöronlarınkine kadar büyüktür, ancak hücreler kompleks dikenlerden yoksundur ve dendritik dallanma desenleri, CA1 piramitlerinkine benzerdir. Yapılan bir in vitro çalışmada işaretli nöronların dendritlerinin kantitatif analizi sonucunda, CA2 piramidal hücrelerinin CA1 ve CA3 piramidal hücrelere kıyasla en yüksek toplam dendritik uzunluğa sahip olduğu bulunmuştur (138).

DG Nöronları

Granül hücreleri dikenli dendritlerin hücre gövdesinin üst kutbundan dışarı doğru uzanması ve tabandan çıkan aksonal uzantı ile keskin bir bipolar morfoloji sergilemektedir (139). DG nöronları küçük, yuvarlak veya oval hücre gövdelerine sahiptir ve ~10 µm çapındadır. DG nöronları granül hücre katmanında yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Bir ila dört adet birincil dendrit uzantıları hücre gövdesinden ortaya çıkar ve moleküler tabaka içinde bir dendritik küme oluşturmak için üç ila altı kez çatallaşan morfolojik yapı sergilerler. Bu dallanmalar çoğunlukla hipokampus fissürüne uzanır ve oluşan bükülme, moleküler katman içinde daha geniş (~300µm) ve daha dar (~180µm) konik şekilli bir hacmi meydana getirir.

2.5.2. Fonksiyonları

Sinir hücreleri (nöronlar), sinir sisteminin yapısal ve işlevsel birimleridir ve beyin devrelerinde nöronların oynadığı fonksiyonel rollerdeki farklılıkları makul bir şekilde yansıtan çeşitli boyut ve şekillerde bulunmaktadır. Bir yandan da dendritlerin ve aksonların dağılımı, sinaptik girdileri ve mevcut hedefleri hücrelere tanıtmaktadır. Öte yandan, nöronal işlemlerin üç boyutlu yapısı, sinyallerin bütünleştiği ve işlendiği kablo yapısını oluşturmaktadır.

Hipokampus da dahil olmak üzere kortikal bölgelerdeki nöronlar genel olarak iki ana sınıfa ayrılabilirler: ana hücreler ve internöronlar. Ana hücreler, nöronal popülasyonun çoğunluğunu (%80-90) oluşturmaktadır ve büyük ölçüde homojen fakat alana özgü morfolojik özellikler göstermektedir. Bunlar glutamaterjik, uyarıcı nöronlardır ve bilgi işleminin işgücü olarak kabul edilirler. Bu hücreler akson uzantılarını diğer beyin alanlarına göndermekte ve bu nedenle “projeksiyon nöronları” olarak da adlandırılmaktadırlar. İnternöronlar, GABAerjik, inhibe edici hücrelerdir ve yerel nöronların büyük popülasyonlarının aktivitesini kontrol etmelerini ve koordine etmelerini sağlayan yoğun yerel aksonal dallanma ile karakterizedirler. Her ne kadar internöronlar nöronal popülasyonun sadece küçük bir kısmını oluştursalar da yüksek derecede morfolojik bir heterojenite sergilemekte ve çeşitli alt tiplere ayrılabilirlerdir. İnternöronların çeşitliliği makul derecede ana hücre aktivitesinin mekansal-zamansal kontrolünde bir iş bölümü sunmaktadır.

2.6. Hipokampal nöronlarda katelisin peptit ifadesi

Merkezi sinir sistemi, diğer dokularla karşılaştırıldığında istilacı patojenlerden iyi korunmaktadır ve beyin enfeksiyonları nispeten nadir görülen klinik bir fenomendir. Bazı patojenler yalnızca ağır bakteriyemi sırasında dolaşım sistemi üzerinden beyine girebilir. Bu koruma esas olarak kan-beyin bariyerinin endotel hücrelerine atfedilmiştir (140), ancak bu bariyerin içinde enfeksiyon veya yaralanma ile aktive edilebilen ayrı bir doğal bağışıklık sistemi mevcuttur (141). Mikroglial hücreler, bu sistemin önemli bir parçasıdır ve temel olarak, patojenleri algılayabilmeleri bakımından, periferdeki makrofajlara karşılık gelir. Ek olarak,

mikroglia, adaptif bağıışıklığın hücrelerini toplayan sitokinler ve kemokinler gibi enflamatuar mediatörler üretebilir (142). Ayrıca, nöronların, merkezi sinir sisteminin immün savunması olan mikroglialara katıldığı da öne sürülmüştür (143). Karşılıklı olarak, mikroglia hücreleri, astrositler, endotel hücreleri ve merkezi sinir sistemi (MSS) infiltre edici immün hücrelerle iletişim kurar (144).

Kateisidin ailesine ait gen sekanslarının, insan ve sıçan genomunda bulunduğu bilinmektedir. İnsanlarda bu gen sekansı LL-37'yi ifade ederken sıçanlarda bulunan rCRAMP'lar ise Termen ve arkadaşları tarafından ortaya çıkartılmıştır (145). Merkezi sinir sistemindeki kateisidin ekspresyonunun tek bildiriimi beyindeki LL-37'nin nokta-blot hibridizasyonu ile tespitidir (146). Hücrel lokalizasyon ve bu lokasyondaki LL-37'nin olası fonksiyonları ile ilgili birkaç çalışma olmasına rağmen henüz kesin olarak bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Primer hipokampal nöron kültürü

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Balb-C ırkı postnatal üç günlük fareler kullanılmıştır. Fare kullanılmasının nedeni tez çalışmasında kullanılan peptitler tasarlanırken ilham alınan kateisidin ilgili antimikrobiyal proteinlere (CRAMP) ait LL-37 varyantının nükleotid dizisinin farelerde bulunmamasıdır. Bu durum deney sonuçlarının tamamen kullanacağımız peptitlere bağımlı olduğunu ortaya koyacaktır. Fareler Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2018/15 karar sayılı izni ile Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM)'dan temin edilmiştir. Postnatal dönemde hayvanın akciğerleri ve alveolleri tam olarak gelişimini tamamlamadığından gaz alış-verişi etkili olarak gerçekleşmemektedir, bu nedenle inhalasyon anestezisi etki göstermemekte ve aksine hayvanın acı çekmesine neden olarak hayvan refahı açısından etik dışı bir durum oluşturmaktadır. Enjeksiyon yolu ile uygulanacak anestezi postnatal dönemdeki hayvanın vücut büyüklüğünden dolayı hızlı ve pratik bir yöntem değildir. Üç günlük

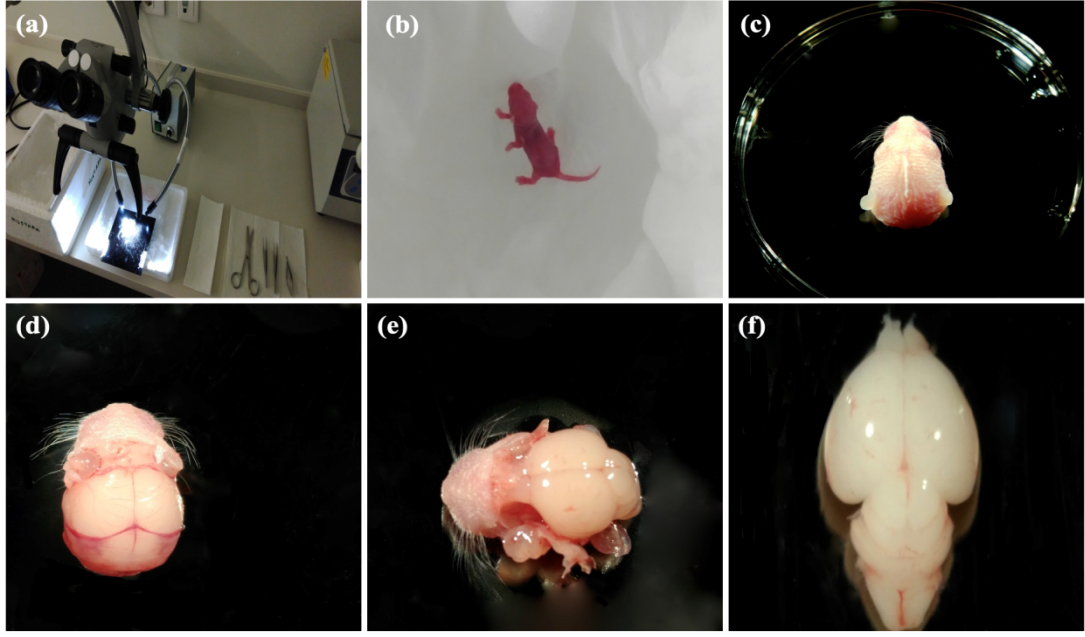
yavru farelerin hipokampus dokusundan primer nöron kültürü oluşturmak için önce hayvanlara hipotermi anestezisi uygulanmıştır (147). Sonrasında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen farelerden diseksiyon mikroskobu altında hipokampus dokusu çıkartılmış ve bu dokular kültür işlemlerine alınmıştır.

3.1.2. Genel Teknikler

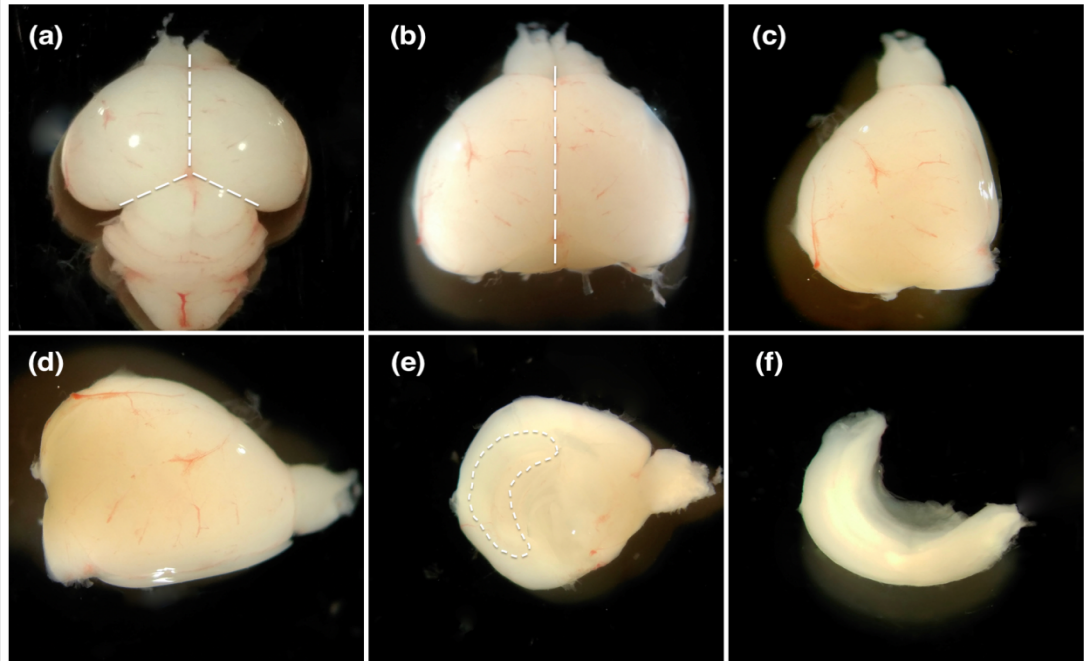
3.1.2.1. Diseksiyon

Diseksiyon vasatı olarak Hibernate-A vasatı kullanılmıştır. Hibernate-A, birçok hücre kültüründe kullanılan zenginleştirilmiş bir besi ortamıdır. Diğer vasatlardan en önemli farkı kalsiyum konsantrasyonunun daha az olmasıdır. Bu nedenle aşırı uyarılma toksisitesini azaltır. (Bu özelliği akson uzamasını azalttığından kültür vasatı olarak kullanılmamıştır.) Diseksiyon vasatı, Hibernate-A içerisine %1 oranında glutamin ve %1 oranında antibiyotik-antimikotik solüsyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlanmıştır. Diseksiyon soğuk ortamda yapılacağı için diseksiyon vasatı, kullanılana kadar (+4°C)' de bekletilmiştir.

Diseksiyonda uygulanan prosedürün postnatal 3 günlük balb-c fareden, hipokampal dokuya ulaşılması Şekil 3.1.2.1-1 ve Şekil 3.1.2.1-2'de fotoğraflarıyla birlikte aşama aşama gösterilmiştir.



Resim 3.1.2.1-1: Beyin Diseksiyon Aşamaları (a) Diseksiyon mikroskobunun ve soğuk tablanın hazırlanması. (b) Postnatal 3 günlük balb-c farenin buz üzerinde hipotermi anestezisine alınması. (c) Kafatasının kesilmesi ve petride dorsal şekilde yerleştirilmesi. (d) Kafa derisinin temizlenmesi. (e) Kafatasının açılması. (f) Beynin kafatasının içinden çıkarılması ve petri kabına alınması.



Resim 3.1.2.1-2: Hipokampus Diseksiyonu Aşamaları (a) Beynin petride dorsal şekilde yerleştirilmesi. (b) Arka beyin ayrılması. (c) İki hemisferin birbirinden ayrılması. (d) Hemisferin hipokampus dokusuna zarar verilmeden sabitlenmesi. (e) Hipokampus dokusunun belirlenmesi. (f) Hipokampus dokusunun disekte edilmesi.

3.1.2.2. Petrilerin Kaplanması

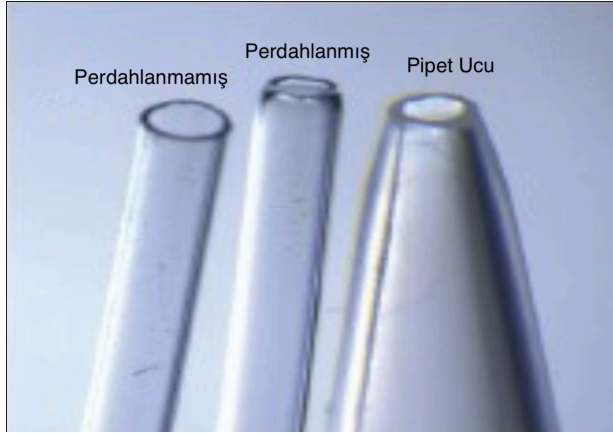
Sinir hücrelerinin in vitro ortamda canlılıklarını uzun süre koruyabilmeleri için bir yüzeye tutunabilmeleri gerekmektedir. Bu işlem iki basamakta gerçekleştirildi. İlk olarak, elektrostatik özelliği sayesinde hücrelerin yapışmasını sağlayan Poly-L-Lysin (Sigma-P6282) 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 24 kuyucuklu plakanın (CytoOne, CC7682-7524) taban yüzeyi kaplandı. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildikten sonra ikinci basamak olarak yüzey steril distile su ile yıkandı.

3.1.2.3. Kimyasal Ayırıştırma

Hipokampal primer hücreleri elde etmek için öncelikle nöron kültüründe hücreleri bir arada tutan yapılar enzimler yardımıyla parçalanmalıdır. Bu yapılar, içerisinde bağ doku, bazal lamina, hücreler arası bağlantıları ihtiva eder. Papain; hücreler arası bağlantıları koparmak için kullanılırken, DNase enzimi ise nekroz olan hücrelerden solüsyona dağılan DNA kısımlarını parçalayarak, bu yapıların yığın oluşturmasını önlemek amacıyla kullanıldı. Diseksiyon sonrasında elde edilen doku parçaları (+4°C)'de 45 dk. boyunca 20 U/ml Papain (Sigma-P4762) içeren L-15 (Leibovitz's Medium, %1 glutamine ve %1 antibiyotik-antimikotik) vasatı ile inkübe edildi. Bu kısımdan sonra mekanik ayırıştırma uygulandı ve hücre süspansiyonu 800 rpm'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı atıldı. Pellet kısmı, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 15 dk. boyunca 50 U/ml DNase (Sigma-D4513) içeren L-15 (%1 glutamine, %1 antibiyotik-antimikotik) vasatı ile inkübe edildi.

3.1.2.4. Mekanik Ayırıştırma

Primer hücrelerin elde edilmesi için kimyasal muameleye ek olarak mekanik ayırıştırmaya da ihtiyaç vardır. Bunun için enzimatik yollarla hücreler arası bağlantıları gevşetilen hücre gruplarının tritürasyon tekniği ile ayrışması sağlandı. Öncelikle mavi pipet ucu ve sarı pipet ucundan doku parçaları yavaş ve hassas bir şekilde geçirildi. En son ise perdahlanmış cam pastör pipet ile dokuların iyice ayrışması sağlandı.



Şekil 3.1.2.4: Pipet Uçlarının Gösterimi Soldan sağa doğru perdahlanmamış, perdahlanmış ve mikropipet uçlarının gösterimi (148).

3.1.2.5. Hücre Ekimi

Hipokampal nöronları içeren hücre solüsyonu 800 rpm'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra supernatant kısım atıldı. Hücreleri içeren pellet, NBA (Neurobasal-A, %1 glutamine, %1 antibiyotik-antimikotik, %2 B27 suplement içeren) vasatı ile çözülerek süspansiyon elde edildi ve 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 20,000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kültürler %5 CO₂ ayarlı +37° C'lik etüvde inkübasyona alındı.

3.2. SRB testi ile sitotoksosite tayini

Oluşturulan hipokampal nöron kültüründeki nöronların akson uzatmaları için 24-48 saat arası kültüre hiçbir özel işlem uygulanmadı. Etkileri araştırılacak peptitlerin kültür ortamına eklenmesinden önce, her bir kuyucuktaki vasat uzaklaştırıldı ve DPBS ile yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa taze NBA (Neurobasal-A, %1 glutamine, %1 antibiyotik-antimikotik içeren) vasatı ile birlikte 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/ml konsantrasyon aralığında farklı amino asit dizisine sahip TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 sentetik Katelisidin Benzeri Antimikrobiyal Peptitler (CRAMP) eklendi ve 16 saat inkübe edildi. Bu aşamada Cytoscan™ SRB Cytotoxicity Assay (Cat No: 786-213) kiti kullanılarak sitotoksosite tayini yapıldı. Tasarlanmış ve sentetik olarak sentezlenmiş TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 AMP'lere ilişkin karakteristik özellikleri Tablo 3.2'de bulunmaktadır.

Tablo 3.2: Peptit Amino Asit Dizileri İnsan Katelisin proteinlerinden esinlenilerek tasarlanan ve sentetik olarak sentezlenen AMP'lerin karakteristik özellikleri (**R: Arginin, L: Lösin, K: Lizin**) (Kaynak: Ünübol N. Doğal Peptit Antibiyotiklerden Esinlenerek Yeni Etkin Antibakteriyellerin Geliştirilmesi. Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2017 (Danışman: Prof. Dr. A Allahverdiyev)).

Peptid	Amino Asit Dizisi	Moleküler ağırlık (g/mol)	pH7 net yükleri	İzoelektrik nokta	% Hidrofobisite
TN1	RLRLLLLRLLR	1548,02	4	pH 12,58	67%
TN2	KLLKLLKLLL	1194,64	3	pH 10,98	70%
TN3	RLRLLRLLL	1278,68	3	pH 12,4	70%
TN6	RLRLLLLRLLR	1434,86	4	pH 12,58	64%
TN7	RLRLLRLL	1165,52	3	pH 12,4	67%

SRB testi protokolünde öncelikle her bir kuyucuktaki vasat üzerine %10'luk Trikloro Asetik Asit (TCA) eklendi ve +4°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüm kuyucuklardaki solüsyon uzaklaştırıldı ve 3 kere saf su ile yıkandı. Kuyucuklarda kalan az miktardaki suyu tamamen uzaklaştırmak için 24 kuyucuklu plakalar 45-50°C'deki fırında 30 dk. inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 200 µl SRB boyası eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. SRB boyası kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 3 kere kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonu ile yıkandı. Kuyucuklarda kalan az miktardaki yıkama solüsyonunu tamamen uzaklaştırmak için 24 kuyucuklu plakalar 45-50°C'deki fırında 30 dk. inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 200 µl çözücü tampon çözeltisi eklendi ve SRB boyasının karışması için plaka yavaşça çalkalandı. Mikroplaka okuyucuda 565 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı.

Sitotoksisite ve antioksidan deneylerinde her grup 3 tekrarlı (n=3) şekilde çalışıldı, SRB testi ile elde edilen spektrofotometrik sonuçlar Şekil 3.2'deki formül kullanılarak hücrelerdeki toksisite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Sitotoksosite} = \frac{(\text{Kontrol Grubu} - \text{Deney Grubu})}{\text{Kontrol Grubu}} \times 100$$

Şekil 3.2: SRB Testi Veri Hesap Formülü Sitotoksosite değerlerinin hesaplanması için kullanılan formül (Kaynak: Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. Eur J Cancer.1993;29A(3):395-9)

3.3. SRB testi ile antioksidan tayini

Peptitlerin olası antioksidan aktivitelerini değerlendirmek amacıyla, oluşturulan primer hipokampal nöron kültürüne 100 uM hidrojen peroksit eklendi ve 10 dk 37°C’de inkübe edildi. Bu sayede hücre kültüründeki nöronların oksidatif strese girmeleri sağlandı. Oksidatif stres öncesi ve sonrasında 0.5 – 32 µg/ml konsantrasyon aralığında hücre kültürüne eklenen TN-2 ve TN-3 peptitlerinin 16 saat inkübasyonun ardından SRB testi ile antioksidan etkileri ölçüldü. SRB testi, sitotoksosite deneyinde kullanılan protokole bağlı kalınarak gerçekleştirildi.

3.4. RNA İzolasyonu

TN-2 peptitinin her kuyucukta ekili olan nöronlara oksidatif stres modelinde post operatif olarak uygulanmasından 16 saat sonra ortamdaki vasat uzaklaştırıldı. Bu aşamada GeneMark Total RNA Purification Kit (Cat No: TR01) kullanılarak hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu protokolüne göre ilk olarak 350 µl RNA Liziz/2-ME solüsyonu, vasatı uzaklaştırılmış olan hücrelerin üzerine eklendi. 1.5 ml steril ependorf tüp içine alınan örnekler vorteks kullanılarak karıştırıldı. Tüm örnekler insülin enjektöründen geçirilerek hücre lizatlarının iyice parçalanması sağlandı. Her örnek üzerine 350 µl 70%’lik ethanol eklendi ve vorteks kullanılarak iyice karışması sağlandı. 700 µl’lik ethanol-lizat karışımı RNA kolonuna yüklendi ve 14,000 xg’de 1 dk santrifüj edildi. 500 µl RNA yıkama solüsyonu I her bir kolona yüklendi ve 14,000 xg’de 1 dk santrifüj edildi. 82 µl DNase solüsyonu her bir kolona yüklendi ve 24-28°C’de 15 dk inkübe edildi. 500 µl RNA yıkama solüsyonu I her bir kolona

yüklendi ve 14,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. 600 µl RNA yıkama solüsyonu II her bir kolona yüklendi ve 14,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. 600 µl RNA yıkama solüsyonu II her bir kolona yüklendi ve 14,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. RNA kolonlarında kalan fazla ethanol'ü ortamdan uzaklaştırmak için kolon boş olarak 14,000 xg'de 3 dk santrifüj edildi. RNA kolonları steril 1.5 ml ependorf tüp üzerine yerleştirildi. 30 µl nükleaz-free su her bir kolona yüklendi ve 24-28°C'de 10 dk inkübe edildi. RNA kolonları 14,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonların içine yerleştirildiği 1.5 ml'lik ependorf tüplerin içerisinde, elde edilmek istenen RNA örnekleri toplandı. RNA örnekleri, bir sonraki aşama olan cDNA sentezi için taze olarak kullanıldı, ya da hemen kullanılmayacaksa -80°C'ye kaldırıldı.

3.5. cDNA Sentezi

RNA izolasyonu sonucu elde edilen her bir gruba ait farklı RNA örnekleri, ticari olarak satın alınan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. No: 4368814) kullanılarak cDNA sentez reaksiyonlarında kullanıldı. Öncelikle cDNA sentez reaksiyon karışımı kit protokolünün öngördüğü adımlar izlenerek hazırlandı ve sonrasında 4 aşamalı PCR reaksiyonu ile ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.5.1: cDNA Sentez Reaksiyonu. Reaksiyon karışımı içerikleri ve hacimleri

Örnek İçerikleri	Örnek Hacimleri
10X RT Buffer	2.0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2.0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0 µl
RNase Inhibitor	1.0 µl
Nuclease – free water	3.2 µl
TOPLAM	10 µl

Tablo 3.5.2: RT-PCR Protokolü. Ters transkripsiyon reaksiyonu PCR aşamaları

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.6. qRT-PCR Analizleri

En iyi antioksidan özellik gösteren TN-2 peptidinin hangi yolak üzerinden bu etkiyi gösterdiğini incelemek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanılarak Bax, Bcl-2, Wnt5a, NF-κB ve 18S rRNA genlerinin ifade düzeyleri ölçüldü. Bu deney, ticari olarak satın alınan GM SYBR qPCR (W/O ROX) (Cat. No: QPSY02-1) kit protokolüne bağlı kalınarak gerçekleştirildi.

İlk olarak reaksiyon karışımı protokolün öngördüğü oranlarda nükleaz-free su, kalıp DNA, ileri yönlü primer, geri yönlü primer ve GM SYBR qPCR solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Ardından başlangıç denatürasyonu olarak reaksiyon karışımı 94°C’de 2 dk inkübe edildi ve kit tarafından öngürülen parametrelerde PCR reaksiyonu 35 döngü ile gerçekleştirildi (Tablo 3.6.1).

Tablo 3.6.1: qRT-PCR reaksiyon karışımı içerikleri ve hacimleri

Örnek İçerikleri	Örnek Hacimleri
Nuclase – free water	X µl
cDNA	Y µl (100 ng)
Forward Primer	0.2 µl
Reverse Primer	0.2 µl
GM SYBR qPCR solution	12.5 µl
TOPLAM	25 µl

Tablo 3.6.2: qRT-PCR Protokolü

Step	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	94-95 °C	15-30 sn
Annealing	60 °C	20-45 sn
Extension	72 °C	30 sn-1 dk

Tablo 3.6.3: Primer Sekansları Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri, T_m dereceleri ve Aplikon Uzunlukları (AU).

GEN	No	Oligonükleotid Dizisi		T _m	AU
Bax	NM_007527.3	F	5' - TGAAGACAGGGCCTTTTGG - 3'	60.2	140
		R	5' - AATTCGCCGGAGACTCG - 3'	62.1	
Bcl2	NM_009741.5	F	5' - ATGCCTTTGTGGAATATATGGC - 3'	60.7	120
		R	5' - GGTATGCACCCAGAGTGATGC - 3'	62.8	
Wnt5a	NM_001256224.2	F	5' - CAACTGGCAGGACTTTCTCAA - 3'	60.2	128
		R	5' - CA TCTCCGA TGCCGGAAC - 3'	61.5	
NFKB	NM_008689.2	F	5' - ATGGCAGACGATGATCCCTAC - 3'	61.1	110
		R	5' - TGTTGACAGTGGTATTCTGGTG - 3'	60.4	
18S RNA	NR_003278.3	F	5' - GGGAGCCTGAGAAACGGC - 3'	60	68
		R	5' - GGGTCGGGAGTGGTAATTT - 3'	60	

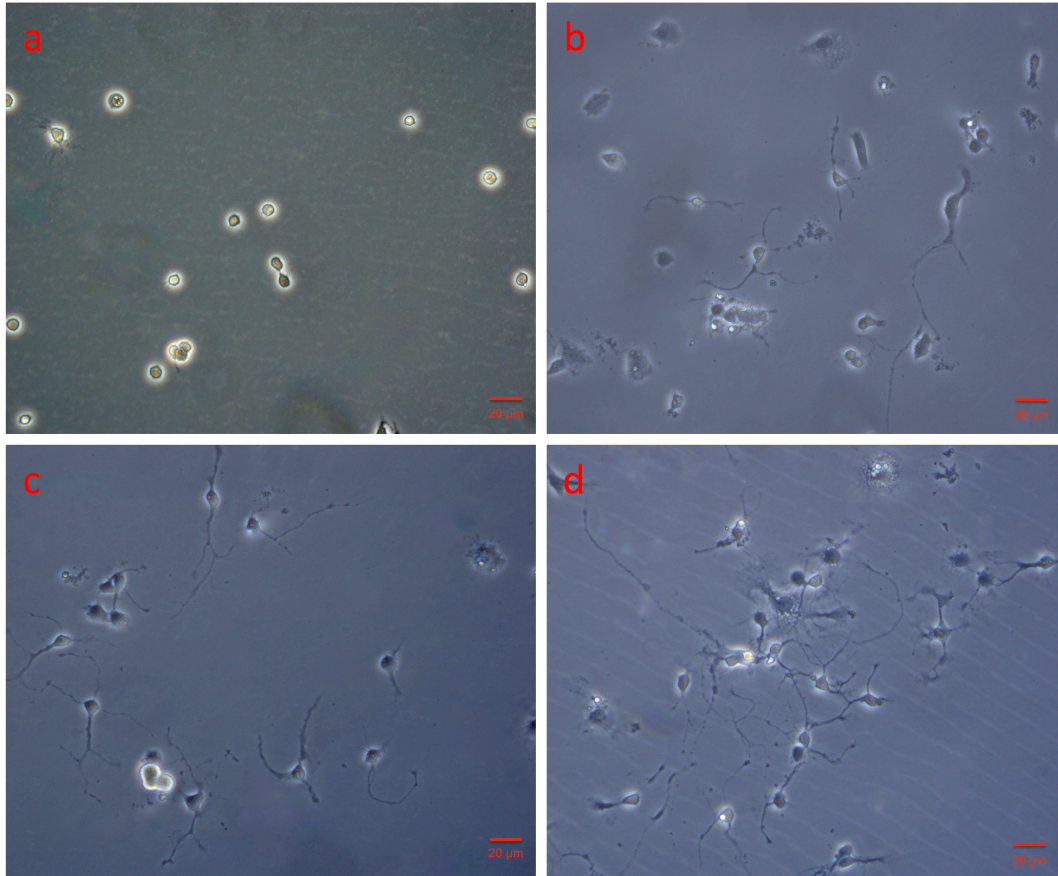
3.7. Verilerin istatistiksel analizi

Tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Primer hipokampal nöron kültürü

Tüm deney gruplarında, primer nöron kültürlerine 3 gün boyunca hiçbir işlem uygulanmadı. Kültüre edilen nöronların uygulanacak işlem öncesinde stres altında olmadıklarının kanıtı olarak akson uzatmaları beklendi (Resim 4.1). Bu süre boyunca akson uzatmayan nöronların nekroz ve apoptoz süreçlerine gittiği morfolojik olarak gözlemlendi. Nekroz ve apoptoz süreçlerine giden nöronların deney sonuçlarını etkilememesi için uygulanacak işlem öncesinde petrilere PBS ile yıkanarak kültür ortamı bu nöronlardan temizlendi. Ardından petrilere taze kültür vasatı eklenerek sitotoksisite veya antioksidan deneylerine devam edildi.



Resim 4.1: Primer hipokampal nöron kültürü (a) Nöronların morfolojik görüntüleri, ekim yapıldığı gün (0.gün) ışık mikroskobu altında 20X objektif kullanılarak elde edildi. (b) Nöronların morfolojik görüntüleri, 1.gün ışık mikroskobu altında 20X objektif kullanılarak elde edildi. (c) Nöronların morfolojik görüntüleri, 2.gün ışık mikroskobu altında 20X objektif kullanılarak elde edildi. (d) Nöronların morfolojik görüntüleri, 3.gün ışık mikroskobu altında 20X objektif kullanılarak elde edildi.

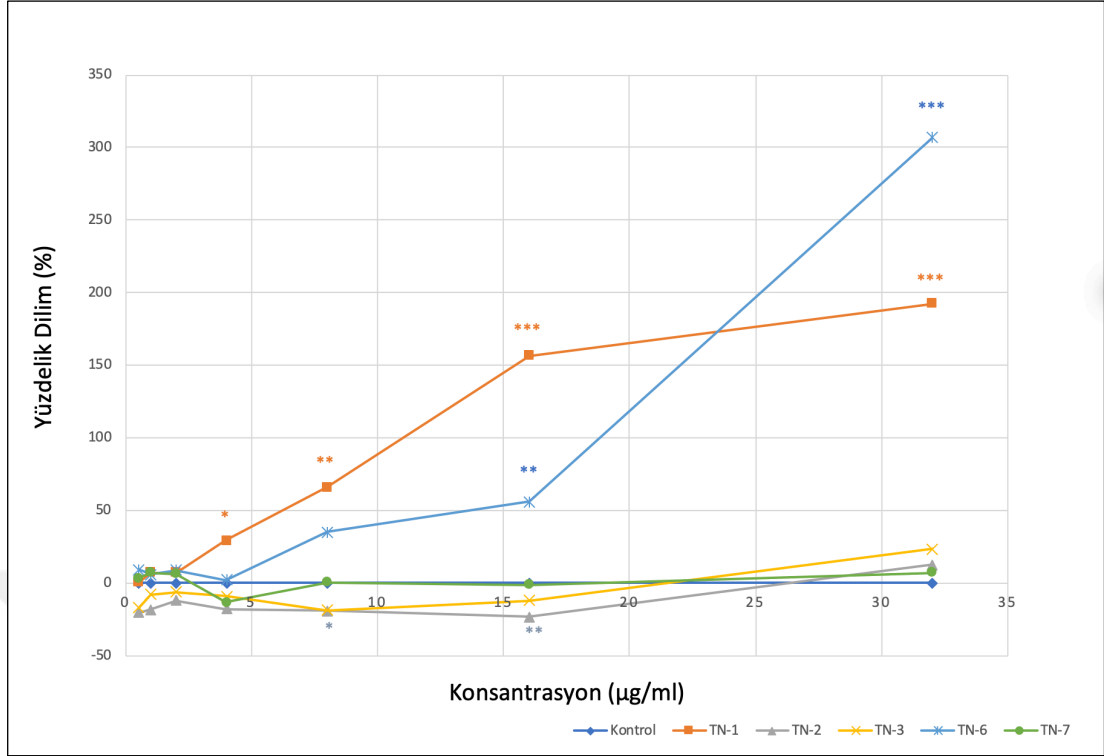
4.2. Antimikrobiyal peptitlerin sitotoksisite düzeyleri

Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak çalışılmış ve ortalama değerleri baz alınmıştır. TN-1 peptiti eklenen grupta sitotoksisite; 4, 8, 16 ve 32 µg/ml konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$). TN-2 peptiti eklenen grupta sitotoksisite; 8 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). TN-3 peptiti eklenen grupta sitotoksisite, kontrol grubuna göre düşük bulunsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir. TN-6 peptiti eklenen grupta sitotoksisite; 16 ve 32 µg/ml konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$). TN-7 peptiti eklenen grupta sitotoksisite, kontrol grubuna göre yüksek saptandı fakat çıkan artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Olası rejeneratif özelliklerinden dolayı antioksidan değerlendirme için sadece TN-2 ve TN-3 peptitleri kullanıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Sitotoksisite Ölçümlerinin Sayısal Verileri Etkileri araştırılan peptitlerin hipokampal nöronlar üzerindeki sitotoksik değerleri (ort ± standart hata) gösterilmektedir.

	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
TN-1	0.227 ± 6.34	-6.944 ± 1.74	6.944 ± 3.65	29.305 ± 5.73	66.111 ± 5.69	156.66 ± 6.26	192.63 ± 23.01
TN-2	-20.235 ± 10.05	-18.518 ± 6.39	-12.077 ± 6.21	-17.874 ± 5.09	-19.269 ± 4.10	-23.563 ± 4.18	12.399 ± 15.88
TN-3	-17.069 ± 3.50	-8.064 ± 6.30	-6.316 ± 3.84	-9.139 ± 0.35	-18.682 ± 1.58	-12.23 ± 0.35	23.386 ± 1.67
TN-6	9.159 ± 10.86	5.85 ± 12.59	8.708 ± 3.10	2.249 ± 3.49	34.984 ± 6.91	56.155 ± 12.47	306.75 ± 21.72
TN-7	3.153 ± 6.93	7.207 ± 3.92	6.456 ± 5.45	-13.513 ± 18.46	0.300 ± 7.97	-1.051 ± 5.84	7.056 ± 6.90



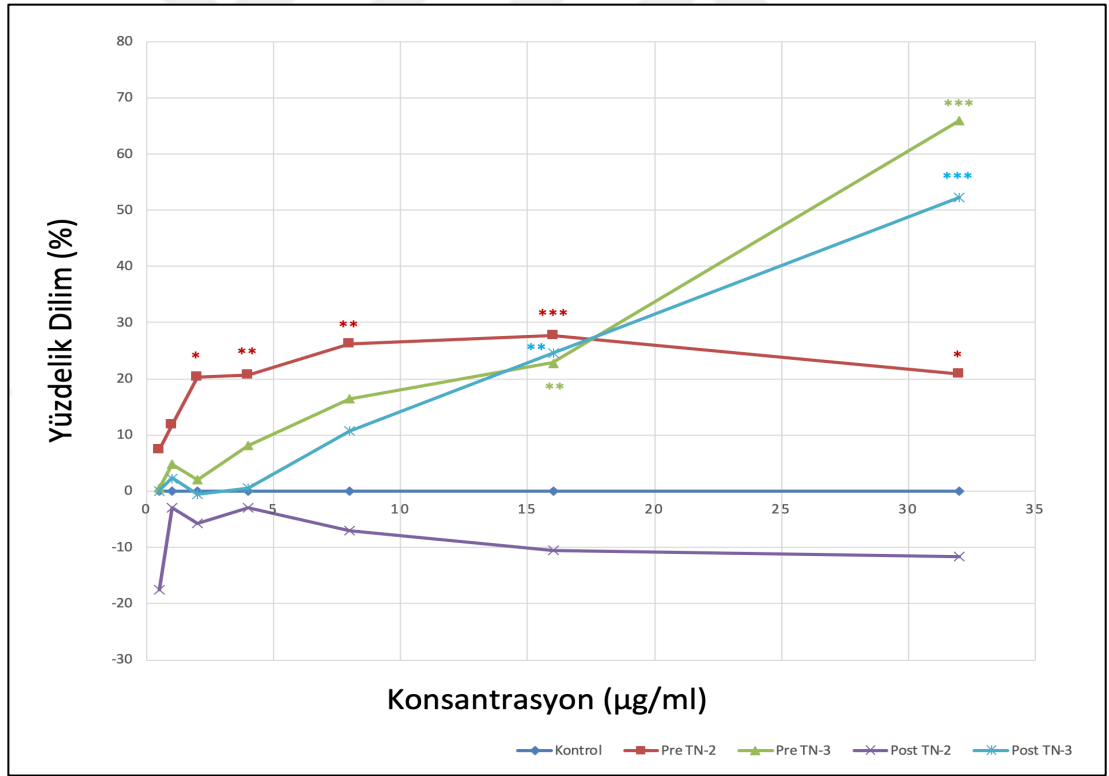
Şekil 4.2: Sitotoksosite Ölçümleri Kontrol (n=3), ve TN-1, TN-2, TN-3, TN-6, TN-7 (n=3) olan deney gruplarındaki sitotoksosite düzeyleri. Kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.3. TN-2 ve TN-3 peptitlerinin antioksidan düzeyleri

Antioksidan ölçümlerde hidrojen peroksit öncesi TN-2 peptidinin uygulandığı Pre TN-2 grubunda sitotoksosite 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/ml konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı (sırasıyla, p<0.05, p<0.01, p<0.001). Hidrojen peroksit sonrası TN-2 peptidinin uygulandığı Post TN-2 grubunda sitotoksosite tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre düşük saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hidrojen peroksit öncesi TN-3 peptidinin uygulandığı Pre TN-3 grubunda sitotoksosite 16 ve 32 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek gözlemlendi (sırasıyla p<0.01, p<0.001). Hidrojen peroksit sonrası TN-3 peptidinin uygulandığı Post TN-3 grubunda sitotoksosite 16 ve 32 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ölçüldü (sırasıyla p<0.01, p<0.001).

Tablo 4.3: Antioksidan Ölçümlerinin Sayısal Verileri Olası antioksidan etkilerinin araştırıldığı TN-2 ve TN-3 peptitlerinin hipokampal nöronları üzerindeki antioksidan değerleri gösterilmektedir.

	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
Pre TN-2	7.448 ± 3.99	11.844 ± 1.60	20.391 ± 6.47	20.635 ± 3.52	26.252 ± 7.00	27.717 ± 7.00	20.879 ± 11.41
Pre TN-3	0.585 ± 7.13	4.795 ± 4.15	1.988 ± 3.06	8.070 ± 5.48	16.491 ± 3.86	22.807 ± 1.07	65.848 ± 1.87
Post TN-2	-17.617 ± 4.18	-2.936 ± 4.57	-5.699 ± 7.93	-2.936 ± 3.98	-7.081 ± 4.57	-10.535 ± 4.19	-11.572 ± 3.07
Post TN-3	0.100 ± 10.24	2.302 ± 7.87	-0.501 ± 5.26	0.501 ± 5.63	10.711 ± 4.60	24.525 ± 4.13	52.352 ± 4.70



Şekil 4.3: Antioksidan Ölçümleri Kontrol (n=3) ve TN-2, TN-3 (n=3) olan deney gruplarındaki sitotoksosite düzeyleri. Kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.4. TN-2 peptit etkisinin neden olduğu gen ekspresyon seviyeleri

Her bir grup ve gen için elde edilen C_q değerleri Tablo 4.4’da belirtildiği üzeredir. qRT-PCR analizlerinde referans gen olarak 18S rRNA belirlendi. Genlerin referans genine göre normalizasyon işlemi $(\Delta C_q) = (C_q)_{GEN} - (C_q)_{REFERANS}$ formülü kullanılarak yapılan matematiksel bir işlemdir (150). Bu işlem ile her bir genin referans gene göre eşik döngü değerinde ne kadar farklılık gösterdiği tespit edilmektedir. Normalizasyon işleminden sonra elde edilen ΔC_q değerlerinden, $(2^{-\Delta C_q})$ formülü ile genlerin DNA miktarındaki artış veya azalış tespit edilmektedir. Gen ifade değişikliklerindeki farklılıkların anlamlı olup olmadığı bu formül sonucu elde edilen DNA miktarlarının istatistiksel analizleri sonucu elde edilebilmektedir.

Tablo 4.4: qRT-PCR analizlerinin C_q değerleri Tez çalışmasında araştırılması planlanan genler ve bu genlerin farklı deney gruplarındaki C_q değerleri gösterilmektedir. NA ile ifade edilenler ölçülebilir aralıkta olmayan C_q değerlerini ifade etmektedir.

Cq Values	Negatif Kontrol	Kontrol	0.5 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
Bax	20,5044	NA	NA	2,4792	1,8113
	20,2092				
Bcl-2	23,1844	NA	NA	29,1155	37,1573
	21,7437				
Wnt5a	33,4096	NA	NA	NA	2,4165
	33,4607				
NF-kB	21,784	1,0465	NA	31,2322	39,3573
	21,3482				
18s RNA	11,3661	8,1015	7,402	9,6045	10,227
	10,266	8,6925	7,9194	9,2036	9,4225
	10,1112	7,9067	8,0532	8,2798	9,0421

Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerin yetersiz olmasından dolayı deneyler tek tekrarlı olarak uygulanmıştır ve bazı genlerin C_q değerleri ölçülebilir aralığın altında olduğu için kantite edilememiştir. Bu nedenle normalizasyon işlemi ve gen ifade düzeylerindeki farklılıklar hesaplanamamıştır.

5. TARTIŞMA

Antibiyotik direnci, dünyanın birçok bölgesinde tehlikeli derecede yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Zararlı mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı yeni direnç mekanizmaları geliştirmekte ve bulaşıcı hastalıkları tedavi edebilme şansı gün geçtikçe kısıtlanmaktadır. Pnömoni, tüberküloz, sepsis, gonore ve gıda kaynaklı hastalıklar gibi giderek artan bir enfeksiyon listesi oluşmakta ve antibiyotiklerin daha az etkili hale gelmesi nedeniyle bu hastalıkların yayılması da bir o kadar hızlanmaktadır (151).

Son yıllarda yeni potansiyel antibiyotiklerin gelişmesi ile birlikte, antibiyotik direnci sorunlarına karşı önemli adımlar atılmıştır. Doğadan esinlenerek tasarlanan ve sentezlenen birçok AMP'nin, mükemmel derecede antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve immunomodulator aktivite gösterdiği yapılan araştırmalar sonucu gösterilmiştir (152).

İnsan katelisinin peptid antibiyotiklerinden esinlenilerek tasarlanan ve yapay olarak sentezlenen antimikrobiyal özellikteki peptitlerin hipokampus nöronları üzerine etkilerini incelemek amacıyla sırasıyla sitotoksite, antioksidan ve gen ifade analizleri uygulanmıştır. Antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronları üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla SRB sitotoksite testi kullanılmıştır. SRB testi, 1990'da (153) geliştirilmiş bir tekniktir ve o zamandan bu yana, hücre tabanlı çalışmalarda sitotoksiteyi araştırmak için kullanılmıştır (154). Bu yöntem, hafif asidik koşullar altında proteinlere stokiyometrik olarak bağlanan ve daha sonra bazik koşullar kullanılarak elde edilebilen SRB boyasının özelliğine dayanmaktadır. Bu nedenle, proteinlere bağlı boya miktarı, hücre kütlelerini yaklaşık olarak göstermektedir. Bu teknik ile hücre kütlesi üzerinden hücre çoğalması tahmini olarak ölçülebilmektedir. SRB testi dört ana aşamadan meydana gelmektedir; (a) örneklerin hazırlanması, (b) hücrelerin deney kimyasalı ile inkübe edilmesi, (c) hücre fiksasyonu, (d) SRB boyasının eklenmesi ve spektrofotometrik ölçüm alınması. Bu aşamaların her biri önemli olmasına rağmen hücre fiksasyonu kısmında daha dikkatli olunması gerekmektedir çünkü bu aşamada herhangi bir nedenden dolayı ölü hücrelerin debrisisi veya sağlıklı hücrelerin kaybı yaşanırsa beklenen miktardan daha

az SRB boyası ortamda kalabilir, bu da deney sonucunun yanlış çıkmasına neden olabilir. Hücre fiksasyonu ile ilgili önemli başka bir konu ise fiksasyon sırasında hücrelerin içinde bulunduğu vasatta serum bulunmaması gereğidir (184). Primer ve sekonder hücre kültüründe normal koşullar altında hücre canlılığını artırmak amacıyla temel vasat içerisine %10 oranında serum eklenmektedir fakat fiksatif çözelti hücre kültürüne eklendiği zaman serum içerisinde bulunan proteinlerin çökmesine neden olmaktadır. Bu durum SRB boyasının çökmüş protein yapılarına bağlanmasına neden olup deney sonucunun yanlış çıkmasına sebebiyet verebilir. Bu nedenle kendi çalışmamızda sitotoksik etkisini araştırdığımız antimikrobiyal özellikteki peptitleri hipokampus nöronları ile inkübe etmeden önce, hücrelerin içerisinde bulunduğu vasat (serum ihtiva eden) petri ortamından uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Sonrasında serum içermeyen vasat ile birlikte antimikrobiyal özellikteki peptitler hücre kültürüne eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Böylelikle fiksasyon aşamasında ortamda fikse edilen tüm protein yapılarının hücrelere ait olduğu öngörülebilmektedir.

Bcl-2, ventriküler bölgelerin nöroepitelyal hücrelerinin yanı sıra kortikal plağın post-mitotik hücreleri, serebellum, hipokampus ve omuriliğin de dahil olduğu birçok beyin bölgesinde yaygın olarak eksprese edilmektedir (155). Bcl-2 geni silinmiş fareler normal embriyonik gelişim gösterirken, lenfoid apoptoz, nöronal - bağırsak lezyonları ve terminal böbrek hastalıkları da birlikte görülmüştür (156). Gelişmekte olan sinir sisteminde yüksek Bcl-2 mRNA ekspresyonu gözlenmektedir fakat postnatal beyinlerde önemli ölçüde ifadesi azalmaktadır (157). Buna rağmen başka bir çalışmada yetişkin bireylerde duyuşal ve sempatik nöronların yüksek düzeyde Bcl-2 ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür (155). Bcl-2, gelişmekte olan sempatik nöronların hücre ölüm mekanizmasında önemli bir düzenleyici olarak görev yaptığını fakat matür sempatik nöronlarda rol oynamadığı ortaya koymuştur (158). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, Bax aracılı sitokrom-c salınımını, kaspaz aktivasyonunu ve sinir büyüme faktöründen yoksun sempatik nöronlarda hücre ölümünü inhibe etmektedir (159). Literatür bilgisindeki tüm bu veriler BCL-2'nin özellikle sinir sisteminin gelişimi sırasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Primer nöron kültürleri ve hayvan modellerinde yapılan fonksiyonel çalışmalar, Bcl-2'nun aşırı ekspresyonunun hipokampal nöronları glutamat aracılı eksitotoksositeye karşı koruduğunu ve NMDA kaynaklı eksitotoksik hasara bağlı hipokampustaki lezyon boyutunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (160). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, apoptoz indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleus'a translokasyonunu bloke ettiğini ve fokal beyin iskemisini takiben kortikal nöron sağkalımının artmasına neden olduğunu ortaya koymuştur (161). Bcl-2 eksikliği olan farelerin beyinlerinde oksidatif stres seviyesinin arttığı ve antioksidan seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir (162) ve Bcl'in ifadesindeki artış oksidatif stres sonrası DNA onarımına yardımcı olabilir (163).

Bax, prototipik pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyesidir ve nöron dahil çeşitli hücre tiplerinde hücre ölümünün düzenlenmesinde büyük rol oynar (164). Bax ekspresyonunun yaralanmaya yanıt olarak ve nörodejeneratif hastalıklarda arttığı bilinmektedir (165). Bax mRNA ve protein seviyeleri, travmatik beyin yaralanmalarının ardından korteksin iç kısımlarında artar (166). Bcl-2 ifadesinin azaldığı ve Bax ifadesinin ise arttığı travmatik beyin yaralanmaları sonrasında hasar meydana gelen nöronlarda ve iskemi modelinde gösterilmiştir (167). Buna karşın, global iskemiden sonra CA3 hipokampal nöronları gibi hala hasarları devam eden nöronlarda Bcl-2 gen ifadesinin yükseldiği bildirilmiş ancak Bax gen ifadesi ile ilgili bir bilgi verilmemiştir (168). Bu gözlemler, nöronal hücre ölümünün, anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin hücresel oranına bağlı olarak gerçekleşebileceği fikrini desteklemektedir.

Beyin fonksiyonlarını sürdürmek için nöronal ağların uzun süreli yapısal bakımı esastır. Dendrit dallanmalarının büyüklüğü ve kalıbı, nöronların sinaptik girdileri alma ve entegre etme kabiliyetini ifade eder ve bu nedenle beyindeki bilgi işleminin kritik belirleyicileridir. Gelişim sırasında dinamik olarak kurulan dendrit dallanmalarının ve iskeletinin yetişkin dönemde büyük oranda stabil olduğu düşünülmektedir ve bir organizmanın ömrü boyunca bu yapılar korunur (169). Bu stabilizasyonun normal beyin fonksiyonları için önemi, dendritik sınırların ve iskeletin geç başlangıçlı hasarı, şizofreni, majör depresif bozukluk, anksiyete ve

Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların en tutarlı morfolojik korelasyonları olduğuna dair kanıtlarla vurgulanmıştır. (170). Bu nedenle, yetişkin sinir sisteminde nöronal morfolojinin ve sinaptik bağlantının korunmasını sağlamak için spesifik moleküler sinyaller bulunmalıdır.

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöronal bağlantının kurulması ve sürdürülmesi için yaşam boyunca gerekli olan hücre dışı bir sinyale güzel bir örnektir. BDNF'nin veya bunun reseptörü olan Tirozin reseptörü kinazı B (TrkB)'nin gen ifadesinin durdurulması, yetişkin kortikal nöronların dendritik dallanmalarında azalmaya yol açar (171). Şaşırtıcı bir şekilde, BDNF veya TrkB'nin silinmesi, mekansal öğrenme, hafıza ve kaygı için kritik bir beyin yapısı olan hipokampusun dendrit mimarisini etkilemez (172). Halen, yetişkin hipokampal nöronlardaki dendrit destek mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Hipokampustaki CA1 piramidal nöronlar, Alzheimer hastalığında özellikle hassastır ve bilişsel gerileme derecesi ile ilişkili olan geniş çaplı dendrit dallanma kaybı sergiler (173). Yetişkin nöronlarda onarım mekanizmalarının tanımlanması, hipokampusa bağlı davranışların yapısal temelini yanı sıra, yoğun dendritik anomalilerin yaşamın geç dönemlerinde tezahür ettiği nörodejeneratif hastalıkların etiolojisinin anlaşılması ile büyük ölçüde alakalı olmuştur.

Önceki çalışmalar, kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda gelişimsel akson ve dendrit büyümesini ve sinaps oluşumunu düzenlemede Wnt5a'nın rolünü göstermektedir (174). Wnt5a ifadesi, dendritik mimariyi korumak için yetişkin nöronlarda her hücre için fizyolojik olarak gereklidir. Wnt5a ifadesinin azalması, dendritik regresyonun başlamasından önce hipokampal sinaptik plastisite ve mekansal öğrenme, hafızayı bozar, ancak davranışsal eksiklikler yapısal anormalliklerin ortaya çıkmasıyla daha da kötüleşir. Wnt5a, yetişkin hipokampusunda kalsiyum ve sitoskeletal aracılı sinyalleme yoluyla ve beklenmedik bir şekilde NMDA reseptör alt ünitesinin GluN1'in siklik AMP'ye cevap veren element bağlama (CREB) aracılı transkripsiyonu yoluyla etki eder. Wnt5a'nın geç ekspresyonunun, önemli yapısal kayıptan sonra bile, nöronal morfolojiyi tamamen geri kazandırdığı ve bu yolun yetişkin beynindeki büyümeyi destekleme kapasitesini

vurguladığını göstermektedir. Bu bulgular kanonik olmayan otokrin Wnt sinyalinin erişkin hipokampal bağlantıyı ve sinaptik plastisiteyi koruduğunu ve patolojik durumlarda yapısal eksikliklerle başa çıkmayı hedefleyen trofik bir yol sağladığını ortaya koymaktadır.

NF- κ B ilk olarak olgun B hücre hatlarında kurucu bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (175). Daha sonra, NF- κ B 'nin birçok hücre tipinde indüklenebilir bir formda bulunduğu gösterilmiştir (176). İndüklenebilir formu, hücrelerin viral enfeksiyon, bakteriyel lipopolisakarit, enflamatuvar sitokinler ve oksidanlar da dahil olmak üzere, çok çeşitli koşullara maruz kalması sonucu aktive edilebilir. NF- κ B 'nin sinir sistemindeki rolü, sinaptik süreçlere, nörotransmisyonu ve nöroproteksiyona dahil olmasından dolayı ilgi kazanmıştır. Ayrıca, uyarılabilir NF- κ B, beyinde meydana gelen inflamasyon süreçlerinde ve sinir kök hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. Sinaps yoğunluğu öğrenme süreçleri için önemli bir parametredir. Hipokampustaki NF- κ B ekspresyonunun azalmasından sonra, sinapsların yoğunluğu stratum lucidum olarak adlandırılan bir hipokampal alt dokusunda aşırı derecede düştüğü yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Ek olarak, nöronal NF- κ B ablasyonuna sahip farelerde, aksonal yosunlu fiber projeksiyonlarının oluşumu bozulmuştur. Bu lifler normal olarak granül hücrelerini CA3 piramidal hücrelere bağlama görevini yürütmektedir.

Dendritik arborizasyon, periferik ve kortikal nöronlarda NF-B ile düzenlenir (177). Böylece hem sinayl alıcı yapı (dendrit) hem de sinyal gönderici yapı (akson) NF-B tarafından düzenlenmiş gibi görünmektedir. Mevcut literatür, dendritik ve aksonal büyümenin, farklı nöronlarda farklı şekillerde NF- κ B tarafından düzenlenebileceğini öne sürmektedir. Kortikal nöronlarda dendritik dallanma inhibitör κ B (I κ B) tarafından baskılanır (177). Nöronal bilgi işlemenin önemli bir bölgesi, akson ilk segmentidir (AIS). Bu bölge, membranda lokalize olan voltaj kapılı sodyum kanallarında oldukça zengindir ve akson potansiyeli üretici bölgedir. İlginç bir şekilde, fosforile edilmiş I κ B kinaz-1 (IKK-1), I κ B kinaz-2 (IKK-2) ve I κ B- α formları AIS içinde yoğunlaşmıştır (178). Ranvier düğümü aynı zamanda aksiyon potansiyeli taşıyan sodyum kanalları ile IKK-1, IKK-2 ve I κ B- α 'nın

fosforlanmış formları bakımından zenginleştirilmiştir (179). Fosforlanmış NF-KB regülatörlerinin lokalizasyonu, hücre içi NF-KB aktivasyonunun ana bölgelerini gösterebilir. Özet olarak, bu veriler NF-KB'nin nöronal morfolojinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu ve öğrenme ve hafıza için önemli olan beyin yapılarını şekillendirdiğini göstermektedir.

18S rRNA, ribozomal RNA ailesine aittir ve 18S'deki S, Svedberg birimlerini temsil eder. 18S rRNA, ökaryotik sitoplazmik ribozomların küçük bileşenleri için yapısal bir RNA'dır. Dolayısıyla tüm ökaryotik hücrelerin temel bileşenlerinden biridir. 18S rRNA, prokaryotlarda bulunan 16S ribozomal RNA'nın ökaryotik sitosolik homologudur. 18S rRNA'yı kodlayan genler, 18S rRNA genleri olarak adlandırılır. Bu genlerden gelen sekans verileri, özellikle omurgalılarda moleküler analizde organizmaların evrimsel tarihini yeniden yapılandırmak için, yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni evrimsel süreçteki sapmaların çok düşük olmasıdır.

Hipokampus nöronları ile yapılan qRT-PCR analizlerinde 18s rRNA, GAPDH, Tfrc, B2m ve Gusb gibi birçok referans geni kullanılmaktadır. Literatür bilgisinde kullanılan bu referans genlerin stabilitesi karşılaştırıldığında en kararlı seviyede 18s rRNA geni bulunmuştur (180).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu tez çalışmasında hipotez olarak belirlenen görüş, insan katelisinin peptit antibiyotiklerinden esinlenilerek geliştirilen antimikrobiyal özellikteki peptitlerin hücre membranı ile olan etkileşiminin artacağı yönündeydi. Tasarlanan peptitlerin hücre membranı ile etkileşiminin artması sağlıklı hipokampus nöronları üzerinde nasıl bir etkiye neden olacağı literatür bilgisinde mevcut değildi. Bu kapsamda yürütülen tez çalışmasının sonuçlarına göre; tasarlanan peptitlerden sadece TN-2 peptiti sağlıklı hipokampus nöronları üzerinde sitotoksikite bakımından istatistiksel olarak en az zararlı etkiye neden olmaktadır. TN-2 peptitinin sağlıklı nöronlar ile inkübe edilmesinin ardından nöron hayatta kalımı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak %23 artmıştır. Hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres modelinde yine TN-2 peptitinin hasar sonrasında nöronlar ile inkübe edilmesi, nöron hayatta kalımını kontrol grubuna göre %17.6'lık arttırmıştır.

Yapay olarak sentezlenen TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 peptitlerinin hipokampal nöronlar üzerindeki etkileri araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Fakat, bu peptitlerin hangi moleküler mekanizma üzerinden bu etkiyi meydana getirdikleri tam olarak açıklanamamıştır. Bunun sebebi, qRT-PCR deneylerinden elde edilen sonuçların istatistiksel analiz yapabilecek sayıda olmaması olarak gösterilebilir.

6.2. Öneriler

Doğadaki katelisinin antimikrobiyal peptitlerinden esinlenilerek yeniden tasarlanan ve yapay olarak sentezlenen TN-1, TN-2, TN-3, TN-6 ve TN-7 peptitlerinden sadece TN-2'nin hipokampus nöronları üzerinde iyileştirici etki gösterdiği ve sitotoksik etki bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu bulunmuştur. TN-2 ve diğer tasarlanan antimikrobiyal özellikteki peptitlerin arasındaki temel farklılık yapılarındaki arginin ve lizin amino asitleridir (Tablo 3.2).

Arginin amino asiti içeren peptilerin sağlıklı nöronlar üzerinde daha toksik etkiye neden olduğu, buna rağmen lizin amino asiti içeren peptitin ise hiç sitotoksik etki göstermediği hatta antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu kapsamda, ilerleyen çalışmalar da lizin amino asiti ile benzer fizikokimyasal özellik gösteren amino asitlerin insan katelisin peptit antibiyotiklerinin aktif bölgelerindeki amino asit dizisi ile değiştirilmesi daha etkili ve daha az toksik etkiye sahip antimikrobiyal peptitlerin keşfedilmesine olanak sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 61 – 92.
2. Hoffmann J, Kafatos F, Janeway C, Ezeko R. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284: 1313–18.
3. Lehrer R, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11: 23 – 27.
4. Yang D, Chertov O, Rosenberg H, Chen Q, Anderson M, Shróder J. Mobilization of various types of leukocytes by human granulocyte-derived antimicrobial proteins: identification of novel activities and/or receptors for defensins, cathelicidin, and eosinophil-derived neurotoxin (EDN). *J. Leukoc. Biol.* 2000; 20 :63.
5. Bals R, Wang X, Wu Z, Bafna V, Zasloff M, Wilson M. Human b-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 874 – 80.
6. Sørensen OE, Gram L, Johnsen AH, Andersson E, Bangsbøll S, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Malm J, Egesten A, Borregaard N. Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem.* 2003;278(31):28540-6.
7. Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J.* 2006; 20(12):2068-80.

8. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3718-24.
9. Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun.* 2008;76(3):935-41.
10. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Józwiak A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides: A review. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):10957-70.
11. Ünübol N. Doğal Peptit Antibiyotiklerden Esinlenerek Yeni Etkin Antibakteriyellerin Geliştirilmesi. Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2017 (Danışman: Prof. Dr. A Allahverdiyev)
12. Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.
13. Phoenix, D.A., Dennison, S.R., and Harris, F. 2013. Antimicrobial peptides: their history, evolution, and functional promiscuity, pp. 1–37. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
14. Dubos, R.J. 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: I. preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J. Exp. Med.* 70, 1–10.
15. Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., and Boman, H.G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246–248.
16. Zasloff, M., Martin, B., and Chen, H.C. 1988. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 910–913.
17. Patil, S.D., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Kumar, P., Gupta, M., Chaddha, B.S., Navani, N.K., and Pathania, R. 2015. Antibacterial potential of a small peptide from *Bacillus* sp. RPT-0001 and its capping for green synthesis of silver nanoparticles. *J. Microbiol.* 53, 643–652.
18. Kim, H., Kim, H.R., Kim, N.R., Jeong, B.J., Lee, J.S., Jang, S., and Chung, D.K. 2015. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models. *J. Microbiol.* 53, 47–52.
19. Zaiou, M. 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med. (Berl)* 85, 317–329.

20. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):491-511.
21. Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaert JR, Sathekge MM. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed Res Int.* 2014;2014:867381.
22. Lin TY, Weibel DB. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(10):4255-67.
23. Auer GK, Weibel DB. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry.* 2017 Jul 25;56(29):3710-3724.
24. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-41.
25. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002; 415 (6870): 389-95.
26. Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(8):1687-92.
27. Dryden MS. Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65 (Supplement) 3:iii35-44.
28. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(6):1206-15.
29. Landman D, Georgescu C, Martin D, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21, 449–65.
30. Koprivnjak, T.; Peschel, A. Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, 68, 2243–2254
31. Lai, Y.; Villaruz, A.E.; Li, M.; Cha, D.J.; Sturdevant, D.E.; Otto, M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.* 2007, 63, 497–506
32. Del Papa, M.F.; Hancock, L.E.; Thomas, V.C.; Perego, M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 8835–8843
33. Schmidtchen, A.; Frick, I.M.; Andersson, E.; Tapper, H.; Bjorck, L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 2002, 46, 157–168

34. Hauser, A.R.; Stevens, D.L.; Kaplan, E.L.; Schlievert, P.M. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 1562–1567
35. Powers, J.P.; Hancock, R.E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003, 24, 1681–1691
36. Nizet, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2006, 8, 11–26
37. Davidson, A.L.; Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, 73, 241–268
- 38 - Miller AB. The newer antibiotics, aureomycin, chloromycetin, and polymyxin. *J Am Med Womens Assoc.* 1950 Mar;5(3):93-7.
39. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(6):536-47.
40. Li J, Koh JJ, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci.* 2017 Feb 14;11:73.
41. Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Cebrián R, Maqueda M. Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *J Biol Chem.* 2012;287(32):27007-13.
42. Abee T. Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;129(1):1-10.
43. Baba T, Schneewind O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends Microbiol.* 1998;6(2):66-71.
44. Jack R, Jung G. Natural peptides with antimicrobial activity. *Chimia* 1998; 52:48–55.
45. Field D, O' Connor R, Cotter PD, Ross RP, Hill C. In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against *Staphylococcus* Biofilms. *Front Microbiol.* 2016 Apr 18;7:508.
46. Agarwal S, Sharma G, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Antimicrobial Peptides as Anti-Infectives against *Staphylococcus epidermidis*. *Med Princ Pract.* 2016;25(4):301-8.
47. Charles H, Robert H. *Insect Cationic Antimicrobial Peptides* ed. Peptide Antibiotics Discovery. Modes of Action and Applications. 117-144.

48. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981;292: 246-248.
49. Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 1983; 2:571–576.
50. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res.* 2017 Mar;96(3):254-260.
51. Gazit E, Miller IR, Biggin PC, Sansom MS, Shai Y. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol.* 1996;258(5):860-70.
52. Jörn K, David R, Ronald M, Francisco H, Frank G, Dirk S, Miguel V. New Amphibians and Global Conservation: A Boost in Species Discoveries in a Highly Endangered Vertebrate Group. *BioScience.* 2005; 55(8): 693–96.
53. Blaustein A, Wake D. Declining amphibian populations—a global phenomenon. *Trends Ecol. Evol.* 1990; 5:203–204.
54. Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 2004; 306(5702):1783-6.
55. Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J Exp Biol.* 2010 Mar 15;213(6):921-33.
56. Hecnar S, Closkey M. Regional dynamics and the status of amphibians. *Ecology.* 1996; 77: 2091–2097.
57. Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MP, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez- Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature.* 2006; 439(7073):161-7.
58. Blaustein AR, Belden LK. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evol Dev.* 2003;5(1):89-97.
59. Knapp RA, Boiano DM, Vredenburg VT. Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). *Biol Conserv.* 2007;135(1):11-20.

60. Blaustein A, Romansic J, Kiesecker J, Hatch, A. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 2003; 9: 123-140.
61. Kustanovich I, Shalev DE, Mikhlin M, Gaidukov L, Mor A. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16941-51.
62. Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. 1993;75(8):687-706.
63. Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:543195.
64. Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*. 2008;46(11):941-50.
65. Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D963-8.
66. Silverstein KA, Moskal WA Jr, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, VandenBosch KA. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J*. 2007;51(2):262-80.
67. Majewski J, Stec B. X-ray scattering studies of model lipid membrane interacting with purothionin provide support for a previously proposed mechanism of membrane lysis. *Eur Biophys J*. 2010;39(8):1155-65.
68. Stec B. Plant thionins—the structural perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63:1370–85.
69. Mak A, Jones B. The amino sequence of wheat β -purothionin. *Can J Biochem*. 1976; 54:835–42.
70. Pelegriani PB, Franco OL. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(11):2239-53.
71. Hegedus N, Marx F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biol Rev* 2013;26:132–145.
72. Stotz HU, Thomson JG, Wang Y. Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav*. 2009;4(11):1010-2.

73. De Lucca A, Cleveland TE, Wedge DE (2005) Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can J Microbiol.* 2005; 51:1001–14.
74. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* (Review) 2003;3(9):710-20
75. Lay FT, Anderson MA. Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;6(1):85-101.
76. Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacón O, López Y, Rodriguez M, Castillo J, Pujol M, Enriquez G, Borroto C, Trujillo L, Thomma BP, Borrás-Hidalgo O. NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnol J.* 2010;8(6):678-90.
77. Lacerda AF, Vasconcelos EA, Pelegrini PB, Grossi de Sa MF. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol.* 2014 Apr 2;5:116.
78. Ngai PH, Ng TB. Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochem Cell Biol.* 2005;83(2):212-20.
79. Van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta.* 1991;183(2):258-64.
80. Porto WF, Souza VA, Nolasco DO, Franco OL. In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. *Peptides.* 2012;38(1):127-36.
81. Li SS, Claeson P. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. *Phytochemistry.* 2003;63(3):249-55.
82. Gao GH, Liu W, Dai JX, Wang JF, Hu Z, Zhang Y, Wang DC. Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry.* 2001;40(37):10973-8.
83. Chouabe C, Eyraud V, Da Silva P, Rahioui I, Royer C, Soulage C, Bonvallet R, Huss M, Gressent F. New mode of action for a knottin protein bioinsecticide: pea albumin 1 subunit b (PA1b) is the first peptidic inhibitor of V-ATPase. *J Biol Chem.* 2011;286(42):36291-6.
84. Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 1999;12(1):16-23.

85. Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 2002;128(3):951-61.
86. Pelegrini PB, Quirino BF, Franco OL. Plant cyclotides: an unusual class of defense compounds. *Peptides. (Review)* 2007;28(7):1475-81.
87. Colgrave ML, Craik DJ. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry.* 2004;43(20):5965-75.
88. Pränting M, Lööv C, Burman R, Göransson U, Andersson DI. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(9):1964-71.
89. Ireland DC, Clark RJ, Daly NL, Craik DJ. Isolation, sequencing, and structure-activity relationships of cyclotides. *J Nat Prod. (Review)* 2010;73(9):1610-22.
90. Gruber CW. Global cyclotide adventure: a journey dedicated to the discovery of circular peptides from flowering plants. *Biopolymers. (Review)* 2010;94(5):565-72.
91. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol. (Review)* 1995;13:61-92.
92. Hancock RE. The therapeutic potential of cationic peptides. *Expert Opin Investig Drugs.* 1998;7(2):167-74.
93. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol. (Review)* 1997;4(1):53-8.
94. Skarnes RC, Watson DW. Characterization of leukin: an antibacterial factor from leucocytes active against gram-positive pathogens. *J Exp Med.* 1956;104(6):829-45.
95. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1436-9.
96. Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2015: 2097-2195)
97. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(9):3952-6.

98. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999;286(5439):498-502.
99. Selsted ME. Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci*. (Review) 2004;5(5):365-71.
100. Lehrer RI, Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev*. (Review) 2012;245(1):84-112.
101. Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett*. 1993;315(2):187-92.
102. Arnljots K, Sørensen O, Lollike K, Borregaard N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*. 1998;12(11):1789-95.
103. Porter E, Yang H, Yavagal S, Preza GC, Murillo O, Lima H, Greene S, Mahoozi L, Klein-Patel M, Diamond G, Gulati S, Ganz T, Rice PA, Quayle AJ. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infect Immun*. 2005;73(8):4823-33.
104. Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol*. 2003;74(2):180-2.
105. Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1133-7.
106. MacKay BJ, Pollock JJ, Iacono VJ, Baum BJ. Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infect Immun*. 1984;44(3):688-94.
107. Ahmad M, Piludu M, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Hand AR. Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(3):361-70.
108. Holbrook IB, Molan PC. A further study of the factors enhancing glycolysis in human saliva. *Arch Oral Biol*. 1973;18(10):1275-82.
109. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1984;44(3):695-701.

110. Pollock JJ, Denepitiya L, MacKay BJ, Iacono VJ. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1984;44(3):702-7.
111. Castagnola M, Inzitari R, Rossetti DV, Olmi C, Cabras T, Piras V, Nicolussi P, Sanna MT, Pellegrini M, Giardina B, Messina I. A cascade of 24 histatins (histatin 3 fragments) in human saliva. Suggestions for a pre-secretory sequential cleavage pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41436-43.
112. Sabatini LM, Azen EA. Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;160(2):495-502.
113. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7472-7.
114. Raj PA, Marcus E, Sukumaran DK. Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers*. 1998;45(1):51-67.
115. Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van't Hof W, Simoons-Smit I, Veerman EC, Amerongen AV. Amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(3):702-4.
116. Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res*. 1992;71(9):1569-76.
117. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res*. 1997;76(3):734-43.
118. Yan Q, Bennick A. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem J*. 1995;311:341-7.
119. Imatani T, Kato T, Minaguchi K, Okuda K. Histatin 5 inhibits inflammatory cytokine induction from human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(6):378-82.
120. Murakami Y, Xu T, Helmerhorst EJ, Ori G, Troxler RF, Lally ET, Oppenheim FG. Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(3):143-9.

121. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun*. 2001;69(3):1402-8.
122. Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RF, Oppenheim FG. Is salivary histatin 5 a metallopeptide? *Biochim Biophys Acta*. 2001;1545(1-2):86-95.
123. Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, Buxton DK, Oppenheim FG, Friden P. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1367-73.
124. Paquette DW, Simpson DM, Friden P, Braman V, Williams RC. Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(12):1051-8.
125. Sorensen OE, Borregaard N. Cathelicidins--nature's attempt at combinatorial chemistry. *Comb Chem High Throughput Screen*. (Review) 2005;8(3):273-80.
126. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*. 1996;238(2):325-32.
127. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.
128. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15258-63.
129. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(9):2206-14.
130. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun*. 1999;67(11):6084-9.
131. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol*. (Review) 2004;75(1):39-48.
132. Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Shibata T, Hirata M, Isogai H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial

peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.* 2004;212(2):185-94.

133. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(9):2206-14.
134. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-41.
135. Cajal SR (1968) *The structure of the Ammon's horn.* Charles C. Thomas, Springfield, I
136. Vida I. (2010) Morphology of Hippocampal Neurons. In: Cutsuridis V., Graham B., Cobb S., Vida I. (eds) *Hippocampal Microcircuits.* Springer Series in Computational Neuroscience, vol 5. Springer, New York, NY
137. Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325(2): 169–82
138. Mercer A, Trigg HL, Thomson AM (2007) Characterization of neurons in the CA2 subfield of the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 27: 7329–38
139. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2007) Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci* 27: 8430–41
140. Kim K. S. (2003) Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 376–385
141. Nguyen M. D., Julien J. P. and Rivest S. (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 216–227
142. Kielian T. (2004) Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. *Front. Biosci.* 9, 732–750
143. Polazzi E. and Contestabile A. (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev. Neurosci.* 13, 221–242
144. Hanisch U. K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40, 140–155
145. Termen S., Tollin M., Olsson B., Svenberg T., Agerberth B. and Gudmundsson G. H. (2003) Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin

rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 536–549

146. Bals R., Wang X., Zasloff M. and Wilson J. M. (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 9541–9546.
147. Phifer CB, Terry LM. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav.* 1986;38(6):887-90.
148. Beaudoin GM 3rd, Lee SH, Singh D, Yuan Y, Ng YG, Reichardt LF, Arikath J. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc.* 2012 Sep;7(9):1741-54
149. Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer.*1993;29A(3):395-9
150. Yer EN, Baloglu MC, Ayan S. Identification and expression profiling of all Hsp family member genes under salinity stress in different poplar clones. *Gene.* 2018 Dec 15;678:324-336.
151. Thevissen K, Ferket KK, François IE, Cammue BP. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides.* 2003;24(11):1705-12.
152. Costa FT, Neto SM, Bloch C Jr, Franco OL. Susceptibility of human pathogenic bacteria to antimicrobial peptides from sesame kernels. *Curr Microbiol.* 2007;55(2):162-6.
153. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-1112.
154. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112-6.
155. Merry WH, Caplan RH, Wickus GG, Reynertson RH, Kisken WA, Cogbill TH, Landercasper J. Postoperative acute adrenal failure caused by transient corticotropin deficiency. *Surgery.* 1994 Dec;116(6):1095-100.
156. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol.* 1993 Dec;4(6):327-32.


157. Harada N, Abe-Dohmae S, Loeffen R, Foidart A, Balthazart J. Synergism between androgens and estrogens in the induction of aromatase and its messenger RNA in the brain. *Brain Res.* 1993 Sep 17;622(1-2):243-56.
158. Johnson EM Jr, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J Neurotrauma.* 1995 Oct;12(5):843-52.
159. Putcha GV, Deshmukh M, Johnson EM Jr. BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases. *J Neurosci.* 1999 Sep 1;19(17):7476-85.
160. Lavoie JF, Lesauteur L, Kohn J, Wong J, Furtoss O, Thiele CJ, Miller FD, Kaplan DR. TrkA induces apoptosis of neuroblastoma cells and does so via a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2005 Aug 12;280(32):29199-207.
161. Deng M, Zhao JY, Tu PF, Jiang Y, Li ZB, Wang YH. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2004 Nov 28;505(1-3):11-8.
162. Schmidt BJ, Hochman S, MacLean JN. NMDA receptor-mediated oscillatory properties: potential role in rhythm generation in the mammalian spinal cord. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Nov 16;860:189-202.
163. Deng Y, Lin C, Zheng J, Liang X, Chen J, Fu M, Xiao P, Wu M. Mechanisms of arsenic trioxide induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells and protection by Bcl-2. *Sci China C Life Sci.* 1999 Dec;42(6):635-43.
164. Prehn JH, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Miller RJ. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20;91(26):12599- 603.
165. Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu DC, Yan SD, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 2003 Sep;112(6):892-901.
166. Hagan M, Wennersten A, Meijer X, Holmin S, Wahlberg L, Mathiesen T. Neuroprotection by human neural progenitor cells after experimental contusion in rats. *Neurosci Lett.* 2003 Nov 20;351(3):149-52.
167. Gefen A, Gefen N, Zhu Q, Raghupathi R, Margulies SS. Age-dependent changes in material properties of the brain and braincase of the rat. *J Neurotrauma.* 2003 Nov;20(11):1163-77.

168. Lin TN, Chen JJ, Wang SJ, Cheng JT, Chi SI, Shyu AB, Sun GY, Hsu CY. Expression of NGFI-B mRNA in a rat focal cerebral ischemia-reperfusion model. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Dec 31;43(1-2):149-56.
169. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(8):536–550.
170. Kulkarni VA, Firestein BL. The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2012;50(1):10–20.
171. Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci*. 2003;23(17):6856–6865.
172. Bannerman DM, et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(3):181–192.
173. Flood DG. Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. II. Subiculum. *Brain Res*. 1991;540(1-2):83–95.
174. Bian WJ, et al. A novel Wnt5a-Frizzled4 signaling pathway mediates activity-independent dendrite morphogenesis via the distal PDZ motif of Frizzled 4. *Dev Neurobiol*. 2015;75(8):805–822
175. Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Inducibility of K immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. *Cell* 47:921-928
176. Grilli, M., J. J.-S. Chiu, and M. J. Lenardo. 1993. NF- κ B and rel-participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.* 143:1-62
177. Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A 2005. NF- κ B signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132:1713–172
178. Schultz C, Konig HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, Prehn JH, Kogel D, Deller T 2006. Coincident enrichment of phosphorylated I κ B α , activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol Cell Neurosci* 33:68–80
179. Politi C, Del Turco D, Sie JM, Golinski PA, Tegeder I, Deller T, Schultz C 2008. Accumulation of phosphorylated I κ B α and activated IKK in nodes of Ranvier. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:357–365
180. Boda E, Pini A, Hoxha E, Parolisi R, Tempia F. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *J Mol Neurosci* 2009, 37: 238–253.

181. Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*. 2001 Dec;2(12):1133-7.
182. Wu WK, Wang G, Coffelt SB, Betancourt AM, Lee CW, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ, Cho CH. Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications. *Int J Cancer*. 2010 Oct 15;127(8):1741-7.
183. Chen X, Takai T, Xie Y, Niyonsaba F, Okumura K, Ogawa H. Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 19;433(4):532-7.
184. Hilgenberg, L. G., Smith, M. A. Preparation of Dissociated Mouse Cortical Neuron Cultures. *J. Vis. Exp.*(10), e562.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı



ACIBADEM
MEHMET ALİ AYDINLAR
ÜNİVERSİTESİ

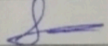
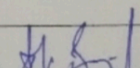
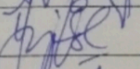
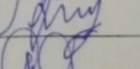
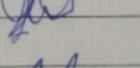
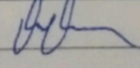
**ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR FORMU**

BAŞVURU TARİHİ: 09.04.2018	KARAR TARİHİ: 09.04.2018
BAŞVURU SAYISI: 2018/14	KARAR SAYISI: 2018/15

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Güldal SÜYEN'in yürüttüğü olduğu "İnsan Katelisinin peptit antibiyotiklerinden esinlenerek geliştirilen antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin incelenmesi" isimli proje başvurusu Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "09.04.2018" tarih ve "02" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan

Uygun Düzeltmesi Gerekir Koşullu Olarak Uygun Uygun Değil

olarak değerlendirilmiştir.

Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		()	()
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		(X)	()
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		()	()
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		(X)	()
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		(X)	()
Doç. Dr. Figen Demir		(X)	()
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	()
Sabiha Turgut Genç		()	()
Vet. Hek. Samed Özer		()	()
Ferhat Bilgili		()	()

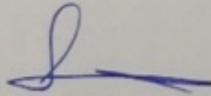
SAYI: HDK-2018/15
KONU: ACU-HADYEK 2018/14 sayılı başvurunuz

03.05.2018

Sn. Prof. Dr. Güldal SÜYEN

ACU-HADYEK 2018/14 sayılı "İnsan Katelisinin peptit antibiyotiklerinden esinlenerek geliştirilen antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin incelenmesi." isimli projeniz Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.04.2018 tarihli 2. toplantısında incelenmiş ve etik olarak uygun bulunmuştur.

ACU-HADYEK 2018/15 sayılı karar ektedir.



Prof. Dr. Serap ARBAK

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı Y.

8.2. ABAPKO Proje Desteği

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYONU TOPLANTI GÜNDEMİ

TOPLANTI NO : 2019/01
TOPLANTI TARİHİ : 08.01.2019
TOPLANTI SAATİ : 10:00
TOPLANTI YERİ : Rektörlük Toplantı Salonu

Acibadem Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN Başkanlığında 08 Ocak Eylül 2019 Salı günü Saat 10:00 'da toplanmıştır.

GÜNDEM:

1. Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Mustafa TITİZ' in yürütücülüğünü, Prof. Dr. Güldal SÖYEN' nin danışmanlığını yaptığı, "İnsan katelsidin peptit antibiyotiklerinden esinlenerek geliştirilen antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin incelenmesi" başlıklı projesine 3.100,00 TL destek verilmesi hakkında görüşme,

KARAR:

KARAR NO: 2019/01/03:

1. Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Mustafa TITİZ' in yürütücülüğünü, Prof. Dr. Güldal SÖYEN' nin danışmanlığını yaptığı, "İnsan katelsidin peptit antibiyotiklerinden esinlenerek geliştirilen antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin incelenmesi" başlıklı projesine 3.000,00 TL destek verilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.


Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN Prof. Dr. Mustafa GÜNEY Prof. Dr. Bekir KAN Prof. Dr. Güldal SÖYEN
Prof. Dr. Cengiz YAKIÇER Prof. Dr. Feriit KOÇAGÖZ Prof. Dr. Fevzi TORAMAN Doç. Dr. İkbal Agah İNCE Prof. Dr. Uğur ÖZBEK

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYONU

TOPLANTI NO : 2019/01
TOPLANTI TARİHİ : 08/01/2019
TOPLANTI SAATİ : 10:00
TOPLANTI YERİ : Rektörlük Toplantı Salonu

TOPLANTIYA KATILAN ÜYELER

Başkan Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN
Üye Prof. Dr. K.R İrfan GÜNEY
Üye Prof. Dr. Beki KAN
Üye Prof. Dr. Güldal SÜYEN
Üye Prof. Dr. Cengiz YAKCIER
Üye Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ
Üye Prof. Dr. Fevzi TIRAKMAN
Üye Prof. Dr. İkbâl Agah İNCE
Üye Prof. Dr. Uğur ÖZBEK



9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa	Soyadı	Titiz
Doğum Yeri	Şanlıurfa	Doğum Tarihi	08.08.1993
Uyruğu	T.C.	Telefon	
E-mail	mtitiz7@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	T.C. İstanbul Üniversitesi	2016
Lise	Hacı Mehmet Sabancı Lisesi	2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Fransızca	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu	
TOEFL IBT	81

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	Çok İyi
Microsoft Office Excel	Çok İyi
Microsoft Office Power Point	Çok iyi

Yer Aldığı Projeler:

İnsan katelisinin peptit antibiyotiklerinden esinlenerek geliştirilen antimikrobiyal peptitlerin hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin incelenmesi ABAPKO – Proje Yürütücüsü – proje tamamlandı. (Proje Danışmanı: Prof.Dr. Güldal SÜYEN, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı)

Yayımlar:

Ulusal ve uluslararası bilimsel dergilerde yayınlanmış makaleler:

E. Cevik, M. Titiz, M. Senel, “Light-dependent photocurrent generation: Novel electrochemical communication between biofilm and electrode by ferrocene cored Poly(amidoamine) dendrimers”, *Electrochimica Acta* 291 (2018) 41-48.

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sözlü ve poster olarak sunulan ve özet kitabında basılan poster ve bildiriler:

M.Titiz, S. Çilingir, G. B. Ertosun, D. Acar, M.Ş. Yavuz, G. Kırıkçı, G.G. Süyen, “Investigation of the influence of music on behavioral findings by valproic acid induced autism model in rats”, *Acta Physiologica (Oxford, England), Turkish Society of Physiological Sciences 44th National Physiology Congress, 01-04 November 2018, Antalya (Turkey)*.