



**İNSAN β -DEFENSİN-2 PROTEİNİNİN *Pichia*
pastoris'TE REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

Şeymanur ÇOBANOĞLU

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

**2022
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İNSAN β -DEFENSİN-2 PROTEİNİNİN *Pichia pastoris*'TE REKOMBİNANT
ÜRETİMİ**

Şeymanur ÇOBANOĞLU

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

03 / 06 / 2022

Şeymanur ÇOBANOĞLU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN β -DEFENSİN-2 PROTEİNİNİN *Pichia pastoris*'TE REKOMBİNANT ÜRETİMİ

Şeymanur ÇOBANOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Antimikrobiyal peptitler (AMP) 6-100 aminoasit içeren ve canlılar tarafından üretilebilen genelde katyonik, hidrofobik, lizin ve arjinin aminoasitleri açısından zengin olan kısa peptidlerdir. İnsan beta defensin-2 (hBD-2), düşük molekül ağırlıklı, sistein açısından zengin katyonik özellik içeren, epitel hücrelerinde enfeksiyon durumunda üretimi artan antimikrobiyal bir peptittir. *Pichia pastoris* ökaryotik protein üretimi için kullanılabilen yüksek ifade, indüklenebilirlik, ökaryotlara yakın glikolizasyon mekanizması gibi avantajlara sahip ekspresyon sistemidir. Bu tez çalışmasında, FaDu (ATCC® HTB-43™) hücre hattı *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) bakterileri ile indüklenmiş ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu RNA'lardan cDNA sentezi yapılmış ve özgün primerler kullanılarak hBD-2 polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Elde edilen hBD-2'nin önce pGEM-T easy vektörüne alt klonlaması yapılmıştır. Ardından pPICZ α A vektörüne klonlaması yapılarak elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* X-33 hücrelerine transforme edilmiştir. hBD-2 peptidinin, elde edilen rekombinant *P. pastoris*'te AOX promotörü kontrolünde 30 °C'de 96 saat boyunca üretimi agar difüzyon testi, qRT-PCR, SDS-PAGE ve western blotlama yöntemleri kullanılarak izlenmiştir. Sonuçta, hBD-2 peptidinin 30 °C, 150 rpm'de ve %2 metanol indüklemesi ile 96 saatte üretiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen fonksiyonel özelliklerini koruyan hBD-2 peptidi terapötik amaçlar için kullanılabilir.

2022, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: hBD-2, Antimikrobiyal peptit, Rekombinant DNA teknolojisi, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

MS. Thesis

RECOMBINANT PRODUCTION OF HUMAN β -DEFENSIN-2 PROTEIN IN *Pichia pastoris*

Şeymanur ÇOBANOĞLU

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Antimicrobial peptides (AMP) are short peptides containing 6-100 amino acids. It can be produced by living organisms, generally rich in cationic, hydrophobic, lysine and arginine amino acids. Human beta defensin-2 (hBD-2) is an antimicrobial peptide with low molecular weight, containing cysteine-rich cationic properties, and whose production is increased in case of infection in epithelial cells. *Pichia pastoris* is an expression system that can be used for eukaryotic protein production with advantages such as high expression, inducibility, and glycosylation mechanism close to eukaryotes. In this study, FaDu (ATCC® HTB-43™) cell line was induced by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) and RNA was isolated. cDNA was synthesized from these RNAs and hBD-2 was amplified with polymerase chain reaction using unique primers. The resulting hBD-2 was first subcloned into the pGEM-T easy vector. Then, it was cloned into the pPICZαA vector and transformed into *P. pastoris* X-33 cells by electroporation. Production of hBD-2 peptide in the obtained recombinant *P. pastoris* under the control of AOX promoter for 96 hours at 30 °C was monitored using agar diffusion test, qRT-PCR, SDS-PAGE and western blotting methods. As a result, it was determined that the hBD-2 peptide was produced at 30 °C, 150 rpm and 96 hours with the induction of 2% methanol. The resulting functional active hBD-2 peptide can be used for therapeutic purposes.

2022, 65 page

Keywords: hBD-2, Antimicrobial peptide, Recombinant DNA technology, *Pichia pastoris*

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamda, 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlardan “Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri” programı ile beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalıőmalarımnda desteğini esirgemeyip gösterdiği anlayıő ve paylaőtıđı bilgilerle her zaman yanımda olan kendisiyle çalıőmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI’ya ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ’ye teşekkür ederim.

Kanser hücre hatının temininde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŐ’a ve hücre kültürü deneylerinde bilgilerini paylaşan ve yardımlarını eksik etmeyen Özel ÇAPIK’e teőekkürler ederim.

Çalıőmalarım boyunca destek olan ekip arkadaşlarım Elif ARSLAN ve M. Kürőat COŐKUN’a teşekkür ederim. Varlığını her zaman yanımda hissettiğim, beni her koőulda destekleyen kıymetli dostum iğdem AKTAŐ’a ve aynı laboratuvar ortamında çalıőmaktan mutluluk duyduğum Arő. Gör. Damla RÜZGAR’a teşekkür ederim.

Bugüne kadar maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her daim yanımda olan sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Şeymanur ÇOBANOĞLU

Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Peptitler.....	1
1.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Keşfi.....	1
1.3. Yapılarına Göre Antimikrobiyal Peptitler.....	4
1.4. Antimikrobiyal Peptitlerin Biyolojik Özellikleri.....	5
1.4.1. Antibakteriyel özellik.....	5
1.4.2. Antikanser özellik	6
1.4.3. Antiviral özellik	6
1.4.4. Antikandidal özellik	7
1.4.5. Kemotaktik aktivite.....	7
1.4.6. Yara iyileştirme.....	7
1.5. Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizması.....	7
1.5.1. Membran aktif AMP	8
1.6. Yük İçerikleri.....	10
1.6.1. Amfipatiklik ve hidrofobiklik.....	10
1.7. Kaynaklarına Göre AMP'ler.....	10
1.7.1. Memeli AMP'leri.....	11
1.7.2. İnsan AMP'leri.....	11
1.7.2.1. İnsan defensinleri	12
1.8. İnsan β -Defensin 2 (hBD-2)	13
1.9. Klinik Çalışmalarda AMP'ler.....	14
1.10. Rekombinant Protein Üretimi.....	15

1.10.1. Prokaryotik ekspresyon sistemleri	16
1.10.2. Ökaryotik ekspresyon sistemleri	16
1.10.3. Diğer ekspresyon sistemleri.....	17
1.11. <i>Pichia pastoris</i>	17
1.11.1. <i>P. pastoris</i> 'te protein salgılanması.....	18
1.12. Tez Çalışmasının Amacı.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Cihazlar.....	23
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları.....	24
3.1.2.1. Luria-Bertani ve ampisilinli Luria-Bertani besiyeri.....	24
3.1.2.2. YPD agar besiyeri	25
3.1.2.3. Düşük tuz içerikli LB zeosin (Lslb) besiyeri	25
3.1.2.4. Düşük tuz içerikli zeosin agar besiyeri	25
3.1.2.5. Maya özütü, pepton, dekstroz ve sorbitol (YPDS) agar ve broth besiyeri	25
3.1.2.6. BMGY ve BMMY besiyeri	25
3.1.3. %20 TCA Çözeltisi	26
3.1.4. SDS-PAGE malzemeleri	26
3.1.5. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve hücre hattı.....	26
3.1.6. pPICZ α A vektörü.....	27
3.1.7. Primerler	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. FaDu hücre hattının kültüre edilmesi ve <i>P. aeruginosa</i> ile indüklenmesi	29
3.2.2. FaDu hücrelerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	29
3.2.3. Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) ile indüklemenin kontrolü.....	30
3.2.4. hBD-2 genin PCR ile çoğaltılması.....	30
3.2.5. pGEM-T Easy vektörüne klonlama (Sub-Cloning) ve DNA dizileme	31
3.2.6. pGEM-T-hBD-2 vektöründen hBD-2'in elde edilmesi.....	31
3.2.7. pPICZ α A vektörüne ligasyon ve <i>E. coli</i> 'ye klonlama	32
3.2.8. <i>E. coli</i> hücrelerinden elde edilen rekombinant vektörlerin doğrulanması.....	32
3.2.9. Rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi.....	32
3.2.10. Elektrokompentent <i>P. pastoris</i> 'lerin hazırlanması.....	33
3.2.11. pPICZ α A-hBD-2 vektörünün <i>P. pastoris</i> X-33 suşuna aktarımı.....	33

3.2.12. Rekombinant <i>P. pastoris</i> 'lerden genomik DNA izolasyonu	33
3.2.13. Rekombinant hBD-2'nin üretimi	34
3.2.14. TCA ile protein örneklerini çöktürme	34
3.2.15. SDS-PAGE	34
3.2.16. Western blotlama	35
3.2.17. hBD-2'nin antimikrobiyal aktivitesinin kontrolü	35
3.2.17.1. Agar difüzyon testi	35
3.2.17.2. Mikro sıvı-bakteriyel koloni gösterimi.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	37
4.1. Fadu Hücre Hattında hBD-2 İfadesinin İndüklenmesi.....	37
4.1.1. qRT-PCR ile İndüksiyonun Kontrolü	38
4.1.2. hBD-2'nin PCR ile çoğaltımı	39
4.2. pGEM-T Easy Vektörüne Alt Klonlama.....	40
4.2.1. Ligasyon ve transformasyon	40
4.2.2. Pozitif transformantların belirlenmesi.....	40
4.3. pPICZ α A Vektörüne Klonlama	41
4.3.1. pPICZ α A-hBD-2 konstrüksiyonunun elde edilmesi	42
4.3.2. <i>P. pastoris</i> 'e elektroporasyonu	43
4.3.3. Rekombinant suşların belirlenmesi	44
4.4. hBD-2 Peptidinin Üretiminin Analizi	45
4.4.1. Üretim sürecince metanol oranlarının belirlenmesi	46
4.4.2. Qrt-PCR ile hBD-2 üretiminin doğrulanması.....	47
4.4.3. SDS-PAGE ile hBD-2 üretiminin kontrolü	48
4.4.4. Western blotlama	48
4.4.5. Rekombinant hBD-2'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	54
EKLER.....	64
EK 1 hBD-2'nin sekans sonuçlarına ait bioedit programı analiz görüntüsü	64
EK 2 hBD-2'nin sekans sonuçlarına ait bioedit programı analiz görüntüsü	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler **Açıklama**

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
aa	Aminoasit
L	Litre
ng	Nanogram
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

AMP	Antimikrobiyal peptit
AOX	Alkol oksidaz
BMGY	Tamponlu gliserol kültür ortamı
BMMY	Tamponlu metanol kültür ortamı
dH ₂ O	Distile su
FBS	Fetal bovin serum
hBD-2	İnsan β-defensin 2
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrororezi
TCA	Triklorasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptitlerin keşfinin zaman çizelgesi	3
Şekil 1.2. α -heliks polipeptit yapısı	4
Şekil 1.3. β -tabaka polipeptit yapısı	4
Şekil 1.4. Halka (loop) polipeptit yapısı	5
Şekil 1.5. Düzensiz şekilli polipeptit yapısı	5
Şekil 1.6. AMP'lerin etki mekanizmalarına ait modeller	9
Şekil 1.7. AMP kaynak dağılımının grafiği	10
Şekil 1.8. hBD-2'nin moleküler yapısı ve aminoasit dizi.....	14



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Cihazların adı ve modelleri.....	23
Çizelge 3.2. Sarf malzemeler	24
Çizelge 3.3. Kitler.....	24
Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler	28



1. GİRİŞ

1922 yılında ilk bilinen insan antimikrobiyal peptidi (AMP) olan lizozim ve nisin Alexander Fleming tarafından tanımlanmıştır. 1928 yılında penisilinin keşfedilmesinin ardından 20. yüzyılın ortalarında diğer antibiyotik sınıfları da keşfedilmiştir (Fleming 1929). "Antibiyotiklerin Altın Çağı" olarak adlandırılan dönem, 1943'te penisilin ve streptomisin klinikte uygulanmasıyla başlamıştır. Fakat bu süreç antibiyotiklerden önce keşfedilen AMP'lerin gölgede kalmasına neden olmuştur (Fleming 1922). Günümüzde ise, antibiyotik dirençliliğinin hızla artması AMP'lere olan ilgiyi yeniden gündeme getirmiştir.

1.1. Antimikrobiyal Peptitler

AMP'ler 6-100 aminoasit içeren host defensin (HDP) olarak da adlandırılan, canlılar tarafından üretilen, genellikle katyonik ve hidrofobik özellik gösteren, lizin ve arjinin aminoasitleri açısından zengin kısa peptid molekülleridir (Mookherjee et al. 2020). AMP'ler tek hücreli organizmaların biyolojik nişlerini paylaşan diğer organizmalara karşı besin maddeleri için rekabet etmelerine yardımcı olurken, çok hücreli canlılarda bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Aynı zamanda enfeksiyöz ajanlara karşı ilk savunma hattıdır (Lai and Gallo 2009). Bu moleküller, canlı organizmalar arasında hayatta kalmak için kullanılan biyolojik silahlardır. Bugüne kadar bakterilerden 391, arkelelerden 5, protistlerden 8, mantarlardan 22, bitkilerden 364 ve hayvanlardan 2446 AMP izole edilmiştir (<https://aps.unmc.edu/database>). Pozitif yükleri +2' den +10'a kadar değişen özellik göstermektedir (Wang et al. 2017). Ayrıca, %40 ile %60 arası hidrofobik aminoasite sahiptir (Hancock and Sahl 2006).

1.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Keşfi

Tarihsel süreçte 1896'da buğday ununda bulunan ve ekme mayalarını öldürebilen bir maddenin olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (Jago and Jago 1926). 1920'lerin başında Alexander Fleming lizozim ve nisin adlı antimikrobiyal aktiviteye sahip molekülleri bulmuştur (Fleming and Allison 1922).

1. GİRİŞ

AMP'ler, virüslerden parazitlere kadar geniş bir hedef organizma yelpazesine sahiptir. Fleming'den sonra keşfedilen AMP, 1939 yılında René Jules Dubos'un topraktan izole ettiği *Bacillus brevis*'den gramisidin'dir. Bu peptid, ilk kez terapötik olarak kullanılmış, yaraların ve ülserin tedavisi için etkili olduğu belirlenmiştir. Bu AMP'nin çeşitli Gram pozitif bakterilere karşı aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. (Dubos and Cattaneo 1939).

1941'de başka bir AMP, tirosidin keşfedilmiş ve hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuştur (Dubos and Hotchkiss 1941). Ardından, *Triticumaestivum* bitkisinden purotionin olarak adlandırılan mantarlara ve bazı patojenik bakterilere karşı etkisi bulunan başka bir AMP molekülü daha izole edilmiştir (Dubos and Hotchkiss 1941; Balls et al. 1942).

1950 yılında bazı *Escherichia coli* suşlarından polimiksin E (kolistin) izole edilmiştir. Polimiksin E, bir lipid kuyruğunun izlediği siklik bir peptid yapısına sahiptir (Stansly et al. 1947). Bu lipopeptid, 2003 yılında Gram negatif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için FDA tarafından onaylanmıştır. Günümüzde, polimiksin E, Gram negatif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için son çare olarak klinik kullanımda olan bir bakteriyosindir.

1956 yılında ilk hayvansal kaynaklı AMP, tavşan lökositlerinden izole edilmiştir (Hirsch 2004). 1962 ve 1965 yılında ineklerin epitel dokudan izole edilen bombinin tanımlanmıştır. 1963 yılında ise insan lökositlerinin lizozomlarında AMP varlığını keşfedilmiştir (Zeya and Spitznagel 1963; Groves et al. 1965).

1967 yılında alametisin, *Trichoderma viride* mantarından izole edilen bir peptid antibiyotiktir. Gram pozitif bakteri ve mantarlara karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Fox and Richards 1982; Leitgeb et al. 2007). 1980'lerde Steniner ve arkadaşları *Hyalophora cecropia* güvesinden sekropinleri keşfetmiştir (Steiner et al. 1981). 1987'de, Afrika pençeli kurbağasından magaininler keşfedilmiştir. Bunlar, membranlarla birleşerek amfipatik bir sarmal içeren lineer peptitlerdir (Zasloff 1987).

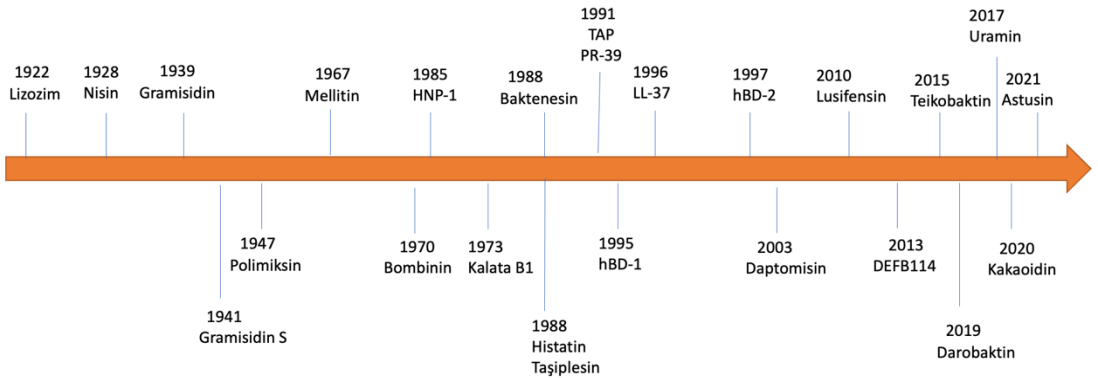
1. GİRİŞ

1988'de, katelisidin ailesinin ilk üyesi olan sığır baktenesin tanımlanmıştır (Romeo et al. 1988). 1995 yılında, homolog bir gen araştırmasına dayalı olarak, bilinen tek insan katelisidini olan LL-37, keşfedilmiştir (Gudmundsson et al. 1996). 1998 yılında inek sütünden laktoferrin ve insan CD8+ sitolitik T hücrelerinde tanımlanan ilk AMP olan granülisin keşfedilmiştir (Pena et al. 1997).

2010 yılında lucifensin, böceklerden keşfedilen ve kurtçuk tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip önemli bir AMP'dir (Cerovsky et al. 2010). 2015 yılında Lewis ve arkadaşları, yapmış olduğu deneyde direnç gelişimine neden olmayan yeni bir peptit antibiyotik olan teikobaktini I-chip (isolation chip) teknolojisi kullanarak keşfetmişlerdir. Bu AMP'nin Gram pozitif patojenlerle savaşmak için tıbbi kullanımının olabileceği düşünülmektedir (Ling et al. 2015).

Yukarıda tarihsel sıra ile anlatıldığı gibi, günümüze kadar çok sayıda AMP molekülü tanımlanmıştır. AMP'ler çoğunlukla havadaki patojenlere maruz kalan dokularda, organlarda ve doğuştan gelen savunmanın öncüleri olup virüslere, bakterilere ve mantarlara karşı etkili olduğu bilinmektedir (Zasloff 2002; Radek and Gallo 2007; Schaubert and Gallo 2008). AMP'ler herhangi bir semptomu neden olmadan çoğu enfeksiyonun durdurulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Böylece geleneksel antibiyotiğe umut verici bir alternatif olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır (Li et al. 2012; Xiao et al. 2013; Wang et al. 2016).

ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN KEŞFİ



Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptitlerin keşfinin zaman çizelgesi

1.3. Yapılarına Göre Antimikrobiyal Peptitler

AMP'ler yapılarına göre α -heliks polipeptitler, β -tabaka içeren polipeptitler, halka yapısındaki polipeptitler ve düzensiz şekilli polipeptitler olmak üzere 4'e ayrılırlar (Koczulla and Bals 2003).

α -heliks polipeptitler, 40 aa'den daha az uzunluklarda olup sistein içermeyen lineer sarmal yapıdadırlar (Brogden et al. 2003). Doğada en yaygın bulunan amfipatik özellik gösteren katyonik peptitler sınıfı içinde en çok araştırılan gruptur (Zasloff 2002; Haney et al. 2009; Mihajlovic and Lazaridis 2010). α -heliks peptitler sadece primatlarda ve kemirgenlerde bulunur (Patil et al. 2004). Şekil 1.2'de gösterilen bu yapı, mellitin, magainin ve LL-37 gibi AMP'lerde bulunur.



Şekil 1.2. α -heliks polipeptit yapısı

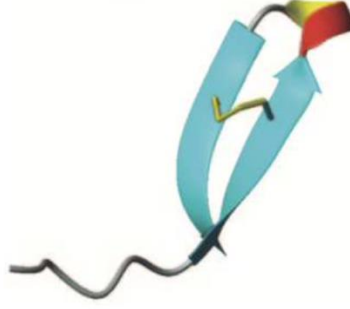
β -tabaka içeren polipeptitler, iki ya da daha fazla disülfid bağlarıyla bağlı, 16-40 aa uzunluğunda sistein açısından zengin yapı içerirler. Şekil 1.3'de gösterilen bu yapı β defensinler ve protegrinler gibi AMP gruplarında bulunur (Brogden et al. 2003). Bu peptitler incelenen her memeli sınıfında bulunmuştur (Patil et al. 2005).



Şekil 1.3. β -tabaka polipeptit yapısı

1. GİRİŞ

Halka (loop) yapısındaki polipeptitler, tek bir disülfid, amid ya da izopeptit bağı ile oluşmuş bir halka içerirler. Prolin-arjinin aminoasitlerini çokça içermesinden dolayı amfipatik özelliğe sahip değildir (Cabiaux et al. 1994). Şekil 1.4’de gösterilen yapıya örnekler bakteresin ve tanatindir.



Şekil 1.4. Halka (loop) polipeptit yapısı

Düzensiz şekilli polipeptitler ise 10-100 aminoasit uzunluğunda olup, yüksek oranda prolin ya da glisin içerir. β -tabaka ve α -sarmal tabakası içermez. Şekil 1.5’de gösterilen bu yapıya indolisidin, PR 39 ve profeninler örnek verilebilir (Brogden et al. 2003).



Şekil 1.5. Düzensiz şekilli polipeptit yapısı

1.4. Antimikrobiyal Peptitlerin Biyolojik Özellikleri

1.4.1. Antibakteriyel özellik

Katyonik AMP’ler Gram negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkaritlere, Gram pozitif bakterilerin ise lipoteikoik asit yapısına ve mantarların mannan yapısının anyonik olmasından dolayı güçlü afinite ile bağlanırlar. AMP’ler, hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlamak için zar yapısının bozulmasına, delinmesine neden olurlar. Bakteriyosinler,

1. GİRİŞ

bakterilerden izole edilen küçük moleküllü katyonik AMP'lerin (30-60 amino asit) büyük bir sınıfıdır. Antibakteriyel aktivite gösterir (Wieprecht et al. 2000).

1.4.2. Antikanser özellik

Antikanser peptidler (ACP'ler), antikanser aktivitesine sahip AMP'lerdir. Yapıları α -sarmal veya β -tabakalı olabilir. Dolaşımdaki veya ilgili dokulardaki defensinlerin, bulaşıcı bir tehditle karşı karşıya kaldığında vücut defensin üretimini arttırabilir. Bu nedenle defensinlerin biyolojik belirteçler olarak çalışması önerilmiştir. AIDS hastalığına sebep olan HIV virüsü ile enfekte olan hasta, enfeksiyonun AIDS durumuna ulaşmasını önlemek için antiretroviral tedavi (ART) almaktadırlar. Uzun süreli ART alan hastalarda İnsan β -defensin 2 (hBD-2) konsantrasyonundaki değişikliklerin olması oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hastalığını erken safhada tespit edilebilmesini mümkün kılmaktadır (Nittayananta et al. 2013). Defensinlerin hem dokuda hem de plazmada farklı ekspresyon seviyeleri ile kolorektal kanser için biyolojik belirteçler olarak çok iyi çalıştığı öne sürülmüştür (Albrethsen et al. 2005; Melle et al. 2005; Albrethsen et al. 2006).

1.4.3. Antiviral özellik

Antiviral ilaçların virüslere karşı olan sınırlı etkinliği nedeniyle antiviral peptitler, varsayılan terapötik ajanlar olarak iyi adayları temsil eder (Kolodziej et al. 2011). Antiviral AMP'ler viral ters transkriptazın veya ön entegrasyon kompleksinin aktivitesini inhibe ederek veya dairesel viral DNA'nın çekirdeğe taşınmasını önlerler. Ayrıca AMP'ler, viral zarflara entegre olarak zar kararsızlığına neden olabilir, böylece virüslerin konakçı hücreleri enfekte etmesini önler (Mulder et al. 2013). Bazı antiviral AMP'ler, memeli hücreleri üzerindeki spesifik reseptörleri bağlayarak viral partiküllerin konakçı hücrelere girmesini önleyebilir. Örneğin, laktoferrin gibi bazı α -sarmal katyonik peptitler, Herpes simpleks virüsü (HSV) viral partiküllerinin konakçı hücre yüzeyine bağlanması için gerekli olan heparan sülfat moleküllerine bağlanarak HSV enfeksiyonlarını önleyebilir, böylece virüs-reseptör etkileşimlerini bloke edebilir (Andersen et al. 2004; Jenssen et al. 2004).

1.4.4. Antikandidal özellik

Yaklaşık 58 insan AMP'sinin antikandidal etki yaptığı bilinmektedir (Wang et al. 2009). β -defensinler, katelisidin LL-37, hepsidinler ve histatinler örnek verilmektedir. İnsan terindeki LL-37'nin mantar enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen savunmasında rol oynadığı görülmektedir (Garcia et al. 2005).

1.4.5. Kemotaktik aktivite

Defensinler ve katelisidin LL-37'nin bulunduğu 35 insan AMP'si kemotaktik özelliklik içermektedir. AMP'ler bakterilerin zarlarıyla etkileşimi hedeflediğinde kemotaktik özellikleri, peptitlerin konak hücre reseptörleri ile birleşmesini sağlar. LL-37, monositlere, makrofajlara, nötrofillere ve T hücrelerine karşı kemotaktik özellik göstermesi formil peptit reseptörü 1 (FPRL-1)'nü bağlayarak sağladığı bilinmektedir (Yang et al. 2000).

1.4.6. Yara iyileştirme

AMP'lerin diğer bir özelliği de yaraların iyileşmesinde rol oynamaktadırlar. Örneğin, histatin 2'nin fibroblast hücre göçünü artırdığı, LL-37'nin ise hücre göçünü indükleyebilmesi ve proliferasyonu tetiklemesinden ötürü bu peptitlerin hızlı yara kapanmasında rol oynadığı öne sürülmektedir (Oudhoff et al. 2010). Bir başka örnek olarak kurtçuk tedavisi verilebilir. Yeşil şişe sineğinin (*Lucilia sericata*) kurtçuk tedavisinde kullanılması, böceklerde bulunan defensin ailesinden lucifensin adlı AMP'nin dezenfekte edici bileşeni içermesinden kaynaklandığı bildirilmektedir.

1.5. Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizması

AMP'ler geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitelere ve diğer birçok biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Genellikle spesifik olmayan mekanizmalarla, mikroorganizmaları inhibe edebilir veya öldürebilir. Dolayısıyla, bu antimikrobiyallere karşı direnç oluşturulması düşük bir ihtimaldir. AMP'ler antibiyotiklere karşı direnç gösteren patojen bakterileri öldürebilme özelliğine sahiptir. AMP'lerin temel etki mekanizması, hücre

1. GİRİŞ

zarını hedeflemesidir. Hücre zarı üzerindeki negatif yük ile etkileşerek bakteri hücrelerini öldürebilirler (Zasloff 2002).

AMP'ler, membran bütünlüğünü proteinleri, DNA ve RNA sentezini inhibe ederek veya belirli hücre içi hedeflerle etkileşime girerek hücreleri öldürürler. Bakteri hücrelerinin toplam proteinlerinin üçte biri, membranla ilişkilidir ve bu proteinler, besin alınımı, solunum, proton gücü, ATP üretimi ve hücreler arası iletişim dahil olmak üzere kritik olan birçok fonksiyona etki ederler (Zhang and Rock 2009). Genellikle AMP'ler sadece bir sınıf mikroorganizma (örneğin bakteri veya mantar) karşı etkili değildir; AMP'lerin farklı türde mikroorganizmalara karşı farklı etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Bazı AMP'ler farklı hücre tiplerini öldürme etkisine sahiptir. Örneğin, PMAP-23, hücre membranlarında gözenekleri oluşturarak hem mantarları hem de parazitleri öldürebilir (Lee et al. 2002; Park et al. 2004).

1.5.1. Membran aktif AMP

AMP'lerin hücre içi hedefleri dahi olsa, antimikrobiyal aktiviteleri için hücre membran ile etkileşimi gerekir (Ludtke and He 1996). Membran aktif AMP'lerin çoğu amfipatiktir, bu da hem katyonik hem de hidrofobik yüklere sahip oldukları anlamına gelir. Bu özellik, negatif yüklü hücre membranı ile elektrostatik etkileşimini ve membranın iç kısmına yerleşmesini sağlar. Daha sonra AMP'nin hidrofobik kısmı, AMP'nin hücre zarı içine yerleştirilmesine yardımcı olur. Etki mekanizmalarına göre, membran aktif AMP'ler 5 farklı model olarak literatürde bulunmaktadır.

Fıçı tahtası modeli, AMP'lerin bakterileri öldürme şeklinin açıklandığı ilk mekanizmadır (Ehrenstein and Lecar 1977). AMP'ler, bakteri yüzeyinde monomerler olarak birikir ve ardından daire desenleri oluştururlar. Bağlanırken membranı halı benzeri bir şekilde kaplayarak lipit çift tabakasına dik olarak yerleşerek gözenekler meydana getirirler (Pouny and Shai 1992).

Halı kilim (deterjan benzeri) peptid modelinde, peptid çift tabaka membrana temas ederek küçük bir alanını kaplar. AMP molekülleri, gözenek oluşturur ve deliklerden geçerek lipit katmanlarına nüfuz eder (Pouny and Shai 1992; Bolintineanu et al. 2012).

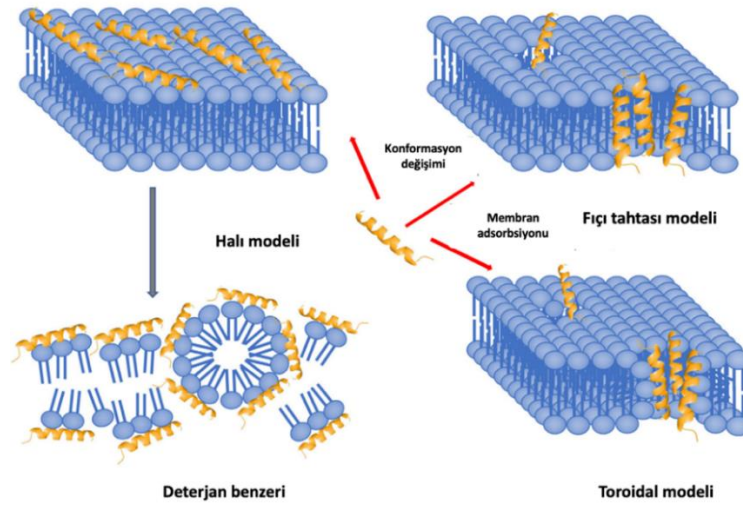
1. GİRİŞ

AMP bir deterjan görevi görerek membranın parçalanmasına sebep olur (Bechinger 2005).

Membran incilmesi modelinde, AMP'ler kendilerini lipit katmanının sadece bir tarafına yerleştirir ve lipit molekülleri arasında bir boşluk oluştururlar. Oluşan bu boşluklar bir güç oluşturur ve komşu lipit moleküllerini kendisine doğru çekerek membran tabakasında incelmeler meydana getirir (Chen et al. 2003; Mecke et al. 2005).

Agregat modeli, farklı yapılarıdaki AMP'ler, membran yüzeyine paralel yapışarak flip flop hareketi ile küre benzeri yapılar oluşturmak için kendilerini dikey olarak zara yerleştirirler. Sitoplazma zarında oluşan küreler agregasyonlara sebep olur ve iyonların geçişine izin verirler. Sonuçta, membran yapısına zarar vererek bozulmasına neden olurlar (Pouny and Shai 1992; Matsuzaki et al. 1996; Wu et al. 1999).

Toroidal gözenek modeli, AMP'ler lipit membranına dikey olarak hizalanırlar. Hidrofobik bölgeleri membranın polar grupları ile yer değiştirerek membranın hidrofobik bölgelerinde yarıklar meydana getirirler (Wu et al. 1999; Brogden et al. 2003). AMP molekülleri zarın daha derinlerine girer. AMP'ler, halı modeline benzer bir şekilde, içine dik bir şekilde sokulup membran üzerinde birikerek bozulmasına neden olur (Matsuzaki et al. 1996). Fıçı tahtası modelinden farklı olarak lipidler, AMP'ler ile transmembran şekilde bağlanır.



Şekil 1.6. AMP'lerin etki mekanizmalarına ait modeller (Huan et al. 2020)

1.6 Yük İçerikleri

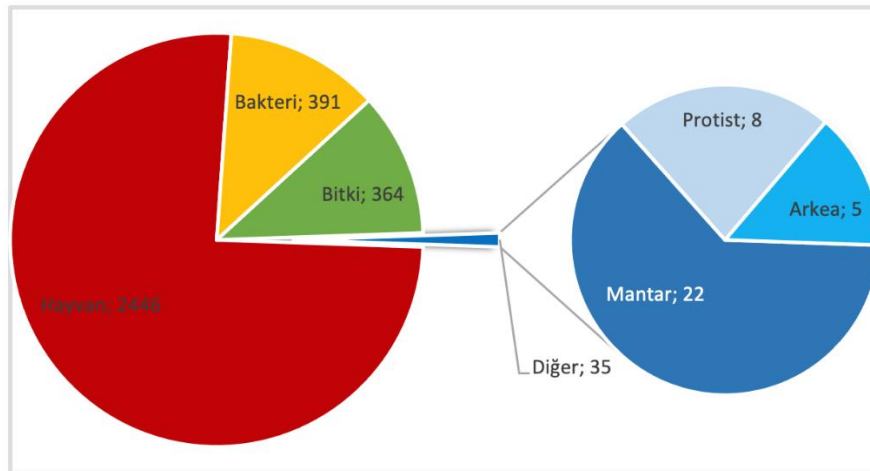
AMP'lerin katyonik özelliği lizin ve arginin gibi pozitif yüklü amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Mikroorganizma zarının negatif yüklü yüzeye sahip olması ve bu negatif yük ile katyonik peptitlerin elektrostatik etkileşime girmesi önemli bir özelliktir. Birçok çalışmada katyoniklik ile peptitlerin konak savunma aktivitesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Bessalle et al. 1992; Matsuzaki et al. 1998).

1.6.1 Amfipatiklik ve hidrofobiklik

Amfipatiklik, bir molekülün yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik grubun bulunmasıdır. Peptidler, hücre membranıyla etkileşime girdiğinde, peptidin hidrofobik kısmı, polar lipid kuyrukları ile etkileşime girerken, hidrofilik kısımlar ise zarların sulu ortamının polar baş grupları ile etkileşime girer (Vidal et al. 2007). Peptit hidrofobikliği ile yapılan araştırmalarda peptit hidrofobikliği arttığında hücre zarına bağlanma ilgisinin arttığını bunun antimikrobiyal aktiviteyi artırabildiğini göstermiştir (Wieprecht et al. 1997; Zelezetsky et al. 2005).

1.7. Kaynaklarına Göre AMP'ler

AMP'ler üretildikleri organizmalara göre bakteri, fungus, protozoa, bitki, amfibi, memeli ve böcek AMP'leri olarak gruplara ayrılır.



Şekil 1.7. AMP kaynak dağılımının grafiksel hali verilmektedir

1.7.1. Memeli AMP'leri

α -defensinler, promyelositler nötrofiller bakteriyel enfeksiyondan sonra bağırsak paneth hücrelerinde üretilen üç kıvrımlı yapıdan oluşan bir antiparalel beta tabakası yapısına sahip katyonik AMP'lerdir. İlk olarak 1966 yılında Gine domuzu nötrofil peptidleri (GPNP) bulunmuştur (Michael and Sylvia 1987). HNP1-4 insanlarda nötrofillerde bulunan ve en çok çalışılan α -defensindir (Date et al. 1994).

β -defensinler , α defensinlere benzer bir üç boyutlu yapıya sahiptir, disülfid bağlarından ötürü farklılık gösterirler (Patil et al. 2005). Hem α hem de β ailelerinin ortak bir atadan gelen β -defensin geninden evrimleşmişlerdir. Bu peptidler nötrofillerden ve diğer lökositlerden üretilirken, β defensinler granüler olmayan mukozal epitel hücreleri olan solunum, gastrointestinal ve genitoüriner sistemler tarafından üretilir (Cunliffe and Mahida 2004). β defensinler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır ve şimdiye kadar incelenen pek çok memeli türünde bulunmuştur (Yang et al. 2004; Sugiarto and Yu 2004).

İlk bildirilen β -defensin, trakeal antimikrobiyal peptit (TAP) ineklerin trakeal mukozasından elde edilmiştir (Diamond et al. 1991). TAP'ın defensin ailesinde tanımlanması daha önce birkaç nötrofil peptidi (α -defensinler olarak adlandırılan NP'ler) ile benzer fonksiyonel ve yapısal özellikler gösterdiği bildirilmiştir. Fakat sistemin içerikleri ile β -defensin ve disülfid bağlarının konumu α -defensinlerle karşılaştırıldığında farklıdır. Sığırlardan başka bir peptid olan lingual antimikrobiyal peptit (LAP) izole edilmiştir (Schonwetter et al. 1995). İnsan epitel hücrelerinde β defensinler bulunur. Deri keratinositler, kornea, meme bezi ve üreme, sindirim, idrar ve solunum yolu epitel hücrelerinde ifade edilir (Garcia et al. 2001; Wang 2014).

1.7.2. İnsan AMP'leri

İnsanda AMP'lerin, cilt, solunum yolları, kulaklar, ağız gibi yüzeylerde ve akciğerler, bağırsaklar gibi de dokularda üretilmektedir (Marchini et al. 2002). İnsan AMP'lerinin bağışıklık sisteminin düzenlemesi, yara iyileşmesi gibi özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Yount and Yeaman 2012). İnsan AMP'lerinin uzunlukları 10 ile

1. GİRİŞ

149 amino asit arasında olup net yükleri -3 ile +20 arasında değişmektedir (Wang 2014). 1922'de, tükürükte keşfedilen insan lizozimi, gözyaşı ve bağırsakta da bulunan ilk antimikrobiyal proteindir (Fleming 1922; Wang 2014). Histatinler, defensinler, katelisinler, dermisidinler ve hepsidin olarak beş gruba ayrılırlar (Wang 2014).

1970 yıllarının başında keşfedilen histadin, histidin aminoasidi (aa) açısından zengin içeriğe sahip, insan tükürüğünden elde edilmiş olan AMP'dir (Holbrook and Molan 1973). Histatinler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli parçasıdır ve ağız sağlığının korunmasında bakterisidal ve fungisidal özellikleri ile önemli bir role sahiptirler (Smet and Contreras 2005). Dermisidin, cilt yüzeyinde insan ter bezleri tarafından salgılanan anyonik bir savunma peptididir. Ayrıca proteoliz indükleyici faktör (PIF) olarak da bilinir. Hedef hücrede bir iyon kanalı oluşturarak veya proteolitik aktivitenin bir sonucu olarak antimikrobiyal aktivite gösterirler (Schitteck et al. 2001). Hepsidinler 2000 yılında insan kanında keşfedilmiştir. Özellikle sistein (%32) açısından zengin, dört disülfid bağı içeren peptididir (Krause et al. 2000).

Katelisinler, prolin ve arginin açısından zengin olan yüksek oranda korunmuş sinyal dizisine sahip bir öncü bölge içeren proteinlerden türetilen sarmal peptidlerdir. İnsanlarda, yalnızca LL-37 olarak adlandırılan bir katelidin varyantı karakterize edilmiştir. LL-37, hCAP18 proteininin C-terminalinden ve oluşan insan CAP18'inden proteoliz ile türetilir (Gudmundsson et al. 1996). Çift lösin ile başlayan ve 37 amino asitten oluşan LL-37, sistein içermediği için lineer bir yapıya sahiptir (Wang 2014). LL-37, T hücreleri, NK ve B hücreleri, nötrofiller, monositler gibi lökositlerde ve ayrıca testislerin, cildin ve gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde eksprese edildiği bilinmektedir (Agerberth et al. 2000). LL-37, hem Gram pozitif hem de negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken aynı zamanda antitümör aktiviteye de sahiptir (Okumura et al. 2004).

1.7.2.1. İnsan defensinleri

İnsanlarda ilk β -defensin (hBD-1) 1995 yılında diyaliz tedavisi alan hastaların hemofiltratlarından izole edilmiştir. hBD-2 ise, ilk kez psoriatik deride tanımlanmıştır. Bugüne kadar, 31 adet beta defensin tanımlanmıştır (Schröder and Harder 1999). İnsan

genomunun kapsamlı araştırmaları, 2002 yılında β -defensinler (*DEFB*'ler) için yaklaşık 40 potansiyel kodlama bölgesi ortaya çıkarmıştır (Schutte et al. 2002; Rodriguez et al. 2003). β -defensin gen kümeleri içindeki yüksek gen duplikasyonu sıklığı nedeniyle, *DEFB* genlerinin sayısının daha da fazla olması mümkündür. Epitel dokulardaki β -defensin genlerinin ekspresyonu enfeksiyon ve inflamasyondan etkilenmektedir. Defensinlerin antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklerin yanı sıra çeşitli organizmalarda doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemlerini modüle etme özelliklerine sahiptir.

1.8. İnsan β -Defensin 2 (hBD-2)

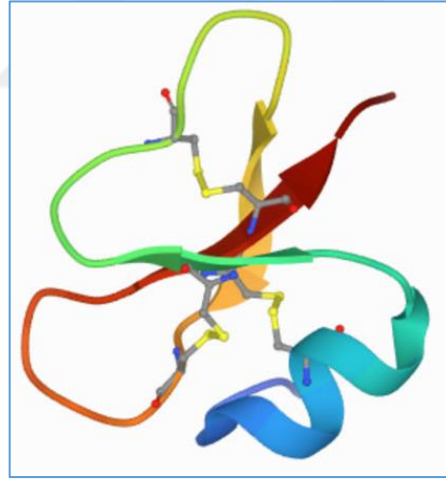
İnsan β -defensin 2 (hBD-2) ilk olarak 1997 psoriatik cilt lezyonlarından izole edilmiştir (Schröder and Harder 1999). İnsanlarda 8. kromozom üzerinde yer alan *DEFB4A* ve *DEFB4B* genleri tarafından kodlanan, cilt antimikrobiyal peptid 1 (SAP1) olarak da bilinen 41 aminoasitten oluşan düşük moleküler ağırlıklı, sistein açısından zengin katyonik bir peptiddir (Schröder and Harder 1999). Nötral pH'da yüksek katyonik özellik gösterirken, teorik pI değeri 9.30 olduğu bilinmektedir. Sedef hastalarının deri lezyonlarında ve kistik fibrozlu hastaların akciğer epitellerinde hBD-2 geninin (*DEFB4*) ifade edildiği bilinmektedir (Schutte et al. 2002).

Defensin genlerinde mevcut olan kopya sayısı varyasyonları, insanlar arasındaki immün sistem cevabının farklılıklarına yol açmaktadır. Defensinler viral enfeksiyonlar sırasında doğuştan gelen ve sonradan kazanılmış immün cevaplarda değişiklikler meydana getirerek immün düzenleyici olarak görev alırlar (Holly et al. 2017). hBD-2 proteini de viral enfeksiyonda immün cevabın başlamasını aktive etmektedir (Kim et al. 2018). Ancak, hBD-2'nin viral enfeksiyonlardaki bu etkinliğinin doğası henüz tam olarak anlaşılabilmış değildir. Fakat hBD-2'nin antiviral özelliğinin olduğu Covid-19 hastalarında hBD-2 ve diğer defensin genlerinin ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Idris et al. 2020).

Koroner epitel hücrelerinin, *P. aeruginosa* (PAO1) kültür filtratı ile indüklendiğinde, hBD-2 gen ekspresyonu upregüle olmaktadır. Ayrıca PAO1'in lipopolisakkarit üretmeyen mutantları ile yapılan indükleme de ise hBD-2 gen

1. GİRİŞ

ekspresyonunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum, hBD-2 gen ekspresyonunun bakteriyel lipopolisakkaritler ile arttığını göstermektedir (Mcnamara et al. 1999). Kistik fibrosis hastalığı, akciğerlerdeki klorit kanallarının (CFTR) bozulması sonucu oluşur ve bu hastalar *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı risk altındadır. CFTR kanallarındaki bozukluk epitel hücrelerinden salgılanan tuz konsantrasyonunda artışa yol açar ve bu durum akciğerlerdeki mukozal savunma sistemini bozmaktadır. Yüksek NaCl seviyesi hBD-2 defensin proteinlerini bakterileri öldürme yeteneğini düşürmektedir. hBD-2'nin ekspresyonu TNF- α , IL1- β ve Gram negatif bakteriler ile indüklenmektedir. Bu durum hBD-2'nin enflamatuvar yanıt üzerine sentezlendiğini göstermektedir. hBD-2'nin ekspresyonunun transkripsiyon seviyesinde düzenlenmesi, edinilmiş antibiyotik dirençliliğine karşı, bu proteini etkili bir terapötik ajan adayı olarak karşımıza çıkarmaktadır (Harder et al. 1997; Schröder and Harder 1999; Peng et al. 2004). Ayrıca, hBD-2'nin enflamasyon dışında da bazal seviyede solunum yolu epitel hücrelerinde ve deri hücrelerinde üretildiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Schröder and Harder 1999).



Şekil 1.8. hBD-2'nin moloküler yapısı

1.9. Klinik Çalışmalarda AMP'ler

İnsan tükürüğünde bulunan histatinin bir türevidir olan P-113, birkaç histidin kalıntısı ile 12 amino asitten oluşur (Paquette et al. 1997). Bu peptidin, diş eti iltihabı ve periodontal hastalıkları önlemek için ağızdan uygulanabilirliği bildirilmiştir (Kavanagh and Dowd 2004). P-113, *Candida albicans* ve yaygın Gram-pozitif ve negatif patojenlere karşı güçlü *in vitro* bakterisit ve ayrıca fungisidal aktivite göstermiştir. HIV hastalarında

1. GİRİŞ

oral kandidiyaz için P-113'ün Faz I ve II klinik denemeleri tamamlanıp, Faz I ve II klinik çalışmaları, P-113'ün gargara veya jel formülasyonu olarak günlük oral kullanım için güvenli olduğunu göstermiştir (Hancock 2000).

Magainin 2'nin analogu olan Pexiganan (Gaenera, ABD), Locilex adlı diyabetik ayak ülserlerinde kullanılan krem formunda ticari olarak geliştirilen ilk antimikrobiyal peptittir. 1999 yılında ise, FDA onayı reddedilmiştir. Çünkü Pexiganan, çoğu ilacın (%60-70) düşük etkinlik nedeniyle başarısız olduğu faz II denemelerinde ilacın performansı yetersiz etkinlik kanıtı gösterilmiştir (Lamb and Wiseman 1998; Lipsky et al. 2008). Demegen, HIV hastalarında oral kandidiyaz için ağız gargarası olarak tedavi için Pacgen firmasına (Kanada) Faz I/II klinik çalışması için onay verilmiştir (Hancock 2000). AM-Pharma firması (Hollanda), hematopoietik kök hücre nakli yapılan hastalarda enfeksiyonların önlenmesi için laktoferrisin bazlı peptitlerin (insan laktoferrisinin N-terminalinden 11-mer peptit, hLF-11) geliştirilmesinde faz I tamamlanmıştır (Costa et al. 2014). İnsan nötrofilpeptidinden türetilen rBPI-21, şiddetli pediatrik meningokoksemi ve Crohn hastalığının tedavisi için faz II/III denemelerindedir (Hancock 2000; Schultz and Weiss 2007).

LL-37 yara iyileştirme tedavisinde çok önemli bir faktör olan ve diyabetik ayak ülseri (DFU) tedavisinde kullanılan dermal hücrelerin anjiyogenezini, göçünü ve proliferasyonunda etkilidir. Kronik orta kulak enfeksiyonunu tedavi etmek için geliştirilmektedir. Ayrıca biyomedikal cihazların üretimi için de çalışılmaktadır ve faz II denemeleri devam etmektedir (Mangoni et al. 2016).

1.10. Rekombinant Protein Üretimi

Farklı biyolojik canlı türlerinden elde edilen DNA'nın genetik mühendisliği teknolojisi aracılığıyla kesilmesine veya elde edilen DNA parçalarının birleştirilmesi işlemine Rekombinant (heterolog) DNA teknolojisi denir. Bu teknoloji ile elde edilen DNA molekülü rDNA olarak adlandırılır. İlk olarak 1972 yılında Paul Berg'in rekombinant DNA elde etmesiyle beraber bilim dünyasında ilerlemeler başlamıştır (Pavlou and Reichert 2004). Rekombinant DNA teknolojisi ile pek çok konakçıda bakteri, maya, böcek hücreleri, memeli hücreleri ve bitki ekspresyon sistemleri kullanılarak

üretilen proteine ise rekombinant protein denilmektedir (Assenberg et al. 2013). Günümüzde farmasötik olarak üretilen ilaçlar aşular veya endüstriyel olarak gıda, deterjan, kozmetik gibi pek çok ürün rekombinant olarak üretilmektedir (Porro et al. 2005). Rekombinant protein üretiminde prokaryotik ve ökaryotik konaklar kullanılmaktadır.

1.10.1. Prokaryotik ekspresyon sistemleri

E. coli rekombinant DNA teknolojisinde en çok kullanılan konak organizmadır. Ucuz olması, hızlı gelişimi, kültür sürelerinin kısa olması, fazla oranda biyokütle elde edilmesi ve yüksek verimlilikle üretimi sağlama açısından pek çok avantaj sağlarken genetik manipülasyonlara yatkın olmaması, inklüzyon cisimciği oluşturmaması, posttranslasyonel modifikasyonların sınırlı olması, bazı memeli proteinlerini ifade etme zorluğu gibi dezavantajları bulundurmaktadır (Brondyk 2009; Assenberg et al. 2013).

1.10.2. Ökaryotik ekspresyon sistemleri

Mayalar, rekombinant proteinlerin üretimi için sıklıkla kullanılan konakçılardır. Günümüze kadar çok sayıda proteini ifade etmek için başarıyla kullanılmıştır. Mayalar metilotrofik ve metilotrofik olmayan mayalar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Metilotrofik mayalar; bir karbon bileşimini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta*, *Candida boidinii* bu gruba ait mayalardır (Porro et al. 2005; Wittmann 2017). Metilotrofik olmayan mayalar ise içeceklerin üretimi, etanol, enzimler, vitaminler, organik asitler gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu mayalar ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*'dır.

S. cerevisiae rekombinant protein üretiminde kullanılan ilk mayadır. Fakat son zamanlarda *P. pastoris*, *S. cerevisiae*'dan daha yüksek oranlarda rekombinant protein ekspresyonu sağlamasından dolayı tercih edilen maya ekspresyon sistemi haline gelmiştir (Brondyk 2009). Rekombinant protein üretiminde, *P. pastoris*'in *S. cerevisiae*'ya karşı birçok üstünlüğü bulunmaktadır. Bunlar, yüksek yoğunluklu hücre büyümesi, salgılanan proteinlerin yüksek verimlilikte olması ve immünojenik glikanların daha az olmasıdır

1. GİRİŞ

(Tran et al. 2017). Özellikle *P. pastoris*, insan kaynaklı proteinlerin rekombinant üretiminde tercih edilmektedir.

2009 yılına kadar kullanılan *P. pastoris* 1000' den fazla endüstriyel enzim ve 500 kadar biyofarmasötik ürünün üretimi için başarıyla kullanılmıştır (Fickers 2014; Yang and Zhang 2018). Genomunun manipüle edilmesinin kolay olması, gelişmiş protein katlama ve posttranslasyonel modifikasyonları yapılabilmesi gibi avantajlara sahiptir.

1.10.3. Diğer ekspresyon sistemleri

Bitki konakları, biyoaktif peptidler ve ilaçlar gibi karmaşık translasyon sonrası modifikasyonlar gerektiren proteinlerin ifadesi için uygun sistemlerdir (Yin et al. 2007).

Memeli ekspresyon sistemlerinin kullanımı genellikle en az verimde elde edilen rekombinant proteinler için kullanılır. Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinin ve murin miyelom hücre ekspresyon sistemleri, protein ekspresyonu için tercih edilen memeli ekspresyon sistemleridir (Heffner et al. 2018).

1.11. *Pichia pastoris*

P. pastoris (*Komagataella phaffii*) metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen 1-5 µm çapında ve 5-30 µm uzunluğunda olan oval şekilli ökaryotik organizmadır (Cregg 1999). 3-7 pH'da ve 25-35°C sıcaklıkta yaşayabilirler (Cereghino and Cregg 2000). Son yıllarda, rekombinant protein üretimi için en çok kullanılan ekspresyon sistemlerinden biri haline gelmiştir (Vogl et al. 2018). Yüksek verimlilik, üretim kapasitesinin yüksek olması, geniş ölçekli ve sürekli üretimlerde olumsuz şartlara dayanıklı olması, post-translasyonel modifikasyon yapması, patojen özelliğinin bulunmaması ve GRAS statüsünde güvenilir olarak kabul edilmesi gibi pek çok avantaja sahiptir (Yang and Zhang 2018). İfade edilecek olan proteini intrasellüler ve ekstrasellüler olarak üretebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan ve ticari olarak alınabilen *P. pastoris* türleri, her ikisi de *P. pastoris* NRRL Y-11430'dan türetilen GS115 ve prototrofik tür olan X-33' tür (Stroman et al. 1989).

1. GİRİŞ

P. pastoris'te heterolog protein üretimi için kullanılan indüklenebilir ve yapısal promotörler bulunmaktadır. *P. pastoris*, AOX1 ve AOX2 olarak adlandırılan iki alkoloksidaz genine sahiptir. Alkol oksidaz (EC 1.1.3.13) metanol kullanım yolundaki ilk enzimdir ve metanolün formaldehite oksidasyonunu katalize eder (Anthony 1982; Veenhuis et al. 1983). Genlerin protein kodlayan bölgeleri, nükleotid ve amino asit dizi seviyelerinde sırasıyla %92 ve %97 oranında homologken, promotör bölgelerinin DNA dizileri homolog değildir (Ellis et al. 1985; Cregg and Madden 1987; Koutz et al. 1989). *P. pastoris*'de metanol ile indüklenebilir alkol oksidaz promotörü pAOX1 veya konstitütif gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz promotörü pGAP en yaygın olarak kullanılan promotörlerdir (Xuan et al. 2009; Portela et al. 2017). Metanol yanıcı ve toksik olduğundan, pAOX1 uygulaması büyük ölçekli uygulamalar için her zaman uygun değildir. Fakat gliserol veya glikoz ile indüksiyona izin veren sentetik promotörler, nitrojen kaynağına bağlı promotörler, pFLD1, metionin veya inorganik fosfat tarafından bastırılabilen güçlü promotörler kullanılmaktadır (Shen et al. 1998; Ruth et al. 2010; Delic et al. 2013).

1.11.1. *P. pastoris*'te protein salgılanması

Protein salgılanması, öncül proteini hücre dışına salgılamak için olgun ve aktif proteine dönüştürmek için çok fazla süreç gerektiren bir mekanizmadır. Salgı yoluna bir proteinin girmesi için, yeni oluşan proteinde N-terminal sinyal dizisi gereklidir. Sitozolda, etiketlenen öncül protein, sinyal tanıma bölgesi (SRP) tarafından tanınır. SRP önce öncül proteine, sonra da endoplazmik retikulumda ayrılmaz bir membran proteini olan Sec61p kompleksinin reseptörüne bağlanır. İletken bir kanal oluşur ve yeni oluşan protein, kanaldan aktarılır. Bu işlem sırasında sinyal peptidi, zara bağlı bir peptidaz olan Ste13p tarafından çıkarılır (Hegde and Bernstein 2006).

ER'de protein katlanması ve glikolizasyon ve peptit bölünmesi gibi translasyon sonrası modifikasyonlar meydana gelir. Moleküler bir şaperon olan ısı şok proteini Hsp70, protein yıkımına, protein-protein etkileşimlerine ve protein translokasyonuna ek olarak protein katlanmasında yardımcıdır. Protein eğer gerekli tanıma bölgelerine sahipse N-glikolizasyon meydana gelir. N-glikolizasyon, proteinlerin gerekli tanıma bölgelerinden (amino asit dizisi asparagin-X-serin / treonin, X prolin hariç herhangi bir

amino asit olan) oluşur. Asparajin rezidülerine bir oligosakarit öncüsü (GLC3MAN9GLCNAC2) eklenir ve sakarit ünitelerinin çıkarılması ve yeniden eklenmesiyle değiştirilir. O-glikosilasyonlar için, proteinin serin veya treonin kalıntılarına dolıcil fosfattan mannoz ilave edilir ve N-glikosiller gibi işlenir (Delic et al. 2013). Daha sonra, protein daha ileri işlendiği Golgi cisimciğine taşınır. Doğru katlandığında ve protein kalitesi kontrolünü geçtikten sonra, olgun protein ortama salınır (Shuster 1991; Puxbaum et al. 2015).

1.12. Tez Çalışmasının Amacı

Antibiyotik dirençliliği, bir antibiyotiğin belirlenen tedavi dozunda bakteriyi öldürme veya inhibe etme yeteneğindeki düşüş olarak ifade edilir. Günümüzde antibiyotik direnci insan sağlığına yönelik en büyük ve önemli tehditlerden biri haline gelmiştir. Çünkü antibiyotiğin aşırı ve yanlış kullanımı, yatay gen transferleri, mutasyonların etkileriyle beraber mikroorganizmalar antibiyotiklere direnç geliştirmektedir. Ayrıca dünya genelinde bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların 2050 yılına kadar 10 milyon insan ölümüne ulaşacağı öngörülmüştür (Taglie and Rappuoli 2018). Bu sorunlara karşı umut verici moleküller olarak bilenen AMP'lerin antibiyotik direncine karşı etki gösterme potansiyelinde olduğu bilinmektedir.

Yeni nesil antibiyotikler olarak adlandırılan AMP moleküllerinin üretimi günümüzde kimyasal sentez yolu ile yapılmaktadır. Kimyasal sentez oldukça pahalı bir yöntem olup, uzun zincirli AMP molekülleri içinse elverişli olmamaktadır. Bu nedenle, AMP moleküllerinin rekombinant üretimleri önem kazanmış durumdadır.

Bu tez çalışmasında, terapötik amaçlı kullanılma potansiyeli olan hBD-2'nin ilk kez tasarlanacak ekspresyon vektörü ile *P. pastoris* X-33'de üretimi ve üretiminin optimizasyonu hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Fang ve arkadaşları (2002) hBD-2 proteininin rekombinant üretimi, sedef hastalarının deri lezyonlarında keşfedilmesinden sonra rekombinant üretim ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. İlk üretim çalışmaları *E. coli* bakterisinde denenmiştir. Füzyon proteini şeklinde pET28 vektörüne hBD-2 proteini klonlayarak, western blot yöntemi ile BL21 (DE3) hücre lizatlarında hBD-2 üretimini gözlemlemişlerdir (Fang et al. 2002).

Peng ve arkadaşları (2004) hBD-2'nin *E. coli*'de üretimi için farklı bir tasarım gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, hBD-2 geni pET-32a (+) vektörüne, önceki çalışmadan farklı olarak kodon optimizasyonunu gerçekleştirerek klonlanmıştır. Ayrıca üretimin sıcaklık, IPTG konsantrasyonunu ve besiyeri içeriğini optimize etmişlerdir (Peng et al. 2004).

Cai ve arkadaşları (2004) Baculovirüs ekspresyonu vektör sistemi (BEV) ile hBD-2 üretimi için fizibilite ve ilgili teknik güzergahını belirlemek için çalışma yapılmışlardır. Sonuçlar, BEV sisteminin, Rekombinant hBD-2'yi üretmek için yüksek verimli bir biyolojik reaktör olarak kullanılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Cai et al. 2004).

Peng ve arkadaşları (2004) *E. coli*'de kodon kullanımının hBD-2 ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırmışlardır. hBD-2 öncüsünü kodlayan iki kodlama dizisinin her ikisi de *E. coli* BL21'de (DE3) tioredoksin ile füzyon proteini olarak ifade edildi. Sonuç, konağın kodon yanlılığının, rekombinant hBD-2'nin yüksek düzeyde ifadesinde büyük bir engel olduğunu göstermiştir (Peng et al. 2004).

Chen ve arkadaşları (2005) hBD-2'yi verimli bir şekilde üretmek için alternatif bir yöntem olarak *E. coli*'de hücresi olmadan biyosentez sistemi geliştirilmişlerdir. Hücre sistemi olmadan özel bir pIVEX2.4c-trxA-shBD-2 plazmidi oluşturularak üretimi sağlamışlardır (Chen et al. 2005).

Chen ve arkadaşları (2006) 14 nadir kodonlu hBD-2 geni kullanılarak hBD-2 füzyon proteinini eksprese etmek için bir *E. coli* hücre içermeyen sistem kullanmışlardır. Bu da insan hBD-2 geninin, kodonların optimizasyonu olmadan bir *E. coli* hücresiz

2. KAYNAK ÖZETLERİ

sistemde verimli bir şekilde hBD-2 füzyon proteinini eksprese etmek için doğrudan kullanılabileceğini göstermiştir (Haiqin et al. 2006).

Zhong ve arkadaşları (2006) *E. coli* 'de hBD-2'nin ekspresyon seviyesini artırmak için, olgun hBD-2 geninin çoklu kopyalama yöntemi ile pET32-nsmhBD-2 vektörleri oluşturularak füzyon proteinleri (TrxA-nmhBD-2, n = 1, 2, 4, 8) olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar, hBD-2 geninin çoklu kopyalama ile yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir (Zhong et al. 2006).

hBD-2'nin rekombinant üretimi ile ilgili başka bir yaklaşım Aerts ve arkadaşları tarafından 2007 yılında ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada, konak organizma olarak *Arabidopsis thaliana* kullanılmıştır (Aerts et al. 2007). hBD-2 proteini bitki defansin proteinleri ile homoloji göstermektedir. Araştırmacılar çalışmalarında, *A. thaliana*'da hBD-2 üretimini gerçekleştirerek fungal bitki patojenlerine daha dirençli bitkiler elde etmeyi hedeflemişlerdir. Bitki ekspresyon vektörü pFAJ3184'ne klonladıkları hBD-2 ile modüler bir sistem olan pCMPG7057 vektörünü oluşturmuşlardır. Elektroporasyon tekniği ile bu vektörü *A. thaliana*'ya transforme etmişlerdir (Aerts et al. 2007).

Garcia ve arkadaşları (2013) İnsan β -defensinlerinin (hBD'ler) beş varyantı (hBD3, hBD3-M, hBD-2, hBD-2-KLK, HBD3-M-hBD-2) IPTG ile indüklenebilir ekspresyon ile iki vektör sistemi pET28a(+) ve pQE30 kullanılarak *E. coli*'de eksprese etmişlerdir. pQE30 vektörü, daha önce hBD'ler için bir ekspresyon sistemi olarak bildirilmemiştir. Ayrıca bu çalışmada, hBD-2'nin *Mycobacterium tuberculosis* suşu H37Rv'ye karşı etkisi olduğu belirlenmiştir (Garcia et al. 2013).

Patro ve arkadaşları (2015) tütün bitkilerinde biyoaktif rekombinant insan β -defensinlerinin (phBD-1 ve phBD-2) başarılı üretimini pKMUAS35SCP vektörünü kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bitkilerin daha az toksisitesi ile maliyet etkin bir şekilde nispeten yüksek bir üretim verimi sağlama potansiyelinden ötürü hBD-1 ve hBD-2, tütün bitkilerinde güçlü promotörlerin kontrolü altında eksprese edilmiş ve biyoaktif β -defensinler başarıyla ekstre edilmiştir (Patro et al. 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Møller ve arkadaşları (2017)'de hBD-2'nin *S. cerevisiae*'da MET17 promotörü ile üretimini gerçekleştirmişlerdir. Met17 geni o-asetilhomoserin sülhidrolaz enzimini kodlamaktadır. Bu genin promotörü metionin veya S-Adenosil metionin varlığında genin transkripsiyonunun baskılanmaktadır. Araştırmacılar çalışmalarında, MET17 ve PRB1 promotörlerinin altına yerleştirilen hBD-2 üretiminde, MET17'nin daha fazla hBD-2 üretimini sağladığını göstermişlerdir (Møller et al. 2017). Promotör seçimi özellikle konak hücreye toksik olabilecek proteinlerin üretiminde önem arz etmektedir (Møller et al. 2017).

Ligia ve arkadaşları (2020) yaptığı çalışmada hBD-2, *E. coli* BL21(DE3)'te düşük ekspresyon verimleriyle elde edilmesinden ötürü hBD-2'nin ekspresyon verimliliğini artırmak için, hücre yoğunluğu, sıcaklık ve indüksiyon uzunluğu gibi bazı değişkenler ve ayrıca indükleyici konsantrasyonu, 24 faktörlü bir deney tasarımı (DoE) kullanmışlardır. Bu yaklaşımla, hBD-2'yi ekspresyonunda için en iyi koşulları sağlayan parametreler belirlenmiştir (Ligia et al. 2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (YUTAM), Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunmaktadır. Kullanılan cihazların listesi, Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Tez hazırlama sürecinde kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.2’ de kitler ise Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazların adı ve modelleri

Cihaz adı	Modelleri
-20 °C Buzdolabı	Templo
+4 °C Buzdolabı	Edesa
Çalkalayıcı İnkübatör	Zheicheng ZHWY
Elektroforez Sistemi	Bio-rad
Elektroporasyon Sistemi	Bio-rad Gene Pulser X-cell
Homojenizatör	TissueLyser LT Qiagen
İnkübatör	Memmert IN-55
Jel Görüntüleme	Bio-rad Chemidoc MP İmaging
Mikrobiyoloji Steril Kabin.	Esco Class II
Mikroplaka Spektrometrisi	Biotech Epoch
Mini Santrifüj	WiseSpin
Otoklav	Hiramaya Hv 50-L
PCR Cihazı	SensoQuest Labcycler
Realtime PCR	Rotor Gene
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q3W

Çizelge 3.2. Sarf malzemeler

Sarf malzemeler	Marka
İzopropanol	Isolab
Besiyerleri	Oxoid
TRIZol	Ambion, Life Science
Ampisilin	Sigma
Zeosin	İnvivogen
Fenol	Merck
Kloroform	Merck
Restriksiyon enzimleri	Thermofisher
Protein markerı	Bio-rad
DNA Markerı	Thermofisher
YNB	Sigma
pGEM-T easy	Promega
Antikorlar	Protech
Biotin	Sigma

Çizelge 3.3. Kitler

Kitler	Marka
cDNA Sentez Kiti	Ambion (Life Science, ABD)
Real time PCR kiti	EvaGreen (Tartu, Estonia)
Jel ekstraksiyon kiti	Ecotech (Türkiye, Erzurum)
Plazmit izolasyon kiti	Ecotech (Türkiye, Erzurum)

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları

3.1.2.1. Luria-Bertani ve ampisilinli Luria-Bertani besiyeri

1 L'inde, 10 g tripton, 15 g agar, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl olan besiyeridir. Ticari olarak alınan toz besiyerinden 40 g tartılarak 1 L'de çözülmüştür. Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilerek yaklaşık 55°C'ye geldiğinde petrilere dökülmüştür. Seleksiyon amacıyla ise 55°C'de 100 µg/ml olacak şekilde besiyerine ampisilin eklenmiştir.

3.1.2.2.YPD agar besiyeri

1 L içerisine 20 gr maya özütü, 10 gr pepton, 10 gr glukoz eklenerek otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril hale getirilmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.

3.1.2.3. Düşük tuz içerikli LB zeosin (LsLB) besiyeri

1 L'si için 950 ml deiyonize su içerisine 10 gr tripton, 5 gr maya özütü, 5 gr tartılarak çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,5'e ayarlanarak hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika steril hale getirilerek yaklaşık 55°C'ye soğumaya bırakılmıştır ve 25 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde zeosin eklenerek 4°C' de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.1.2.4. Düşük tuz içerikli zeosin agar besiyeri

1 L için 950 ml deiyonize su içerisine 10 gr tripton, 5 gr maya özü, 5 gr NaCl ve %1,5 g agar tartılarak çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,5'e ayarlanarak ve hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. 121°C 15 dakika steril hale getirilerek yaklaşık 55°C'ye soğumaya bırakılmış ve 25 µg/ml konsantrasyonda zeosin eklenerek 4°C' de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.1.2.5. Maya zütü, pepton, dekstroz ve sorbitol (YPDS) agar ve broth besiyeri

10 gr maya özü, 182.2 gr sorbitol, 20 gr pepton ve 900 ml su otoklavlanmıştır. Ardından 100 ml dekstroz, %1,5 agar eklenmiştir. Besiyeri yaklaşık 60°C'ye kadar soğumaya bırakılıp 50 mg/ml zeosin eklenmiştir. Petriker kullanılıncaya kadar karanlıkta 4°C'de saklanmıştır. YPDS broth ise agar kullanılmadan hazırlanmıştır.

3.1.2.6. BMGY ve BMMY besiyeri

700 ml su içerisine 10 gr maya özü ve 20 gr pepton eklenerek otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra 100 ml 1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6, 100 ml YNB, 2 ml biotin

3. MATERYAL ve YÖNTEM

ve 100 ml gliserol eklenmiştir. BMMY besiyerinde ise gliserol yerine 100 ml metanol eklenerek 4°C'de saklanmıştır.

3.1.3. %20 TCA çözeltisi

40 ml distile su içerisine 8 gr triklorasetik asit katılarak çözünmesi sağlanmıştır.

3.1.4. SDS-PAGE malzemeleri

%15'lik ayırma jeli sırasıyla: 2,8 ml, dH₂O, 1,95 ml 2 M Tris (pH:8.8), 5 ml %30 akrilamid karışımı, 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS ve 10 µl TEMED eklenerek karıştırılmıştır.

%15'lik yükleme jeli sırasıyla: dH₂O 3,6 ml, 625 µl 1 M Tris (pH:6.8), 670 µl %30 Akrilamid karışımı, 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 APS ve 5 µl TEMED eklenerek karıştırılmıştır.

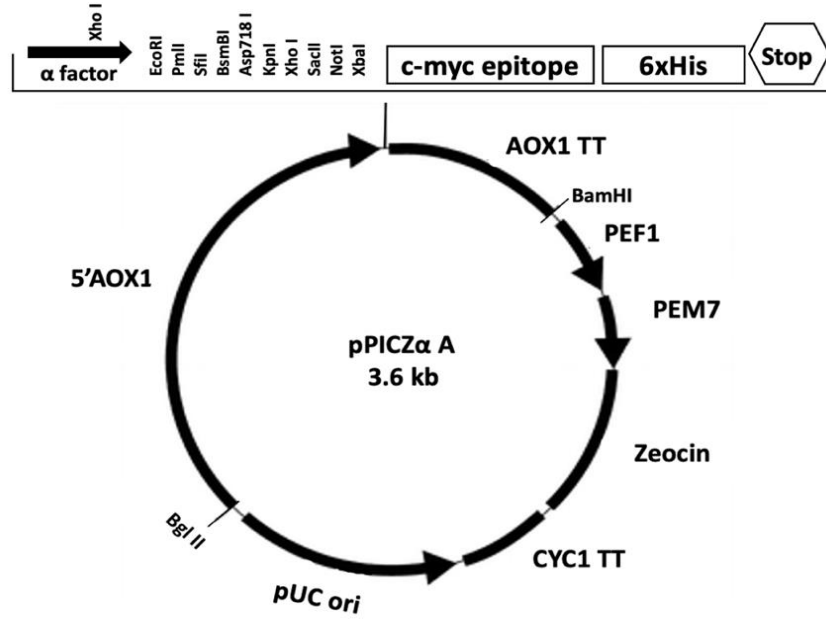
SDS yürütme tamponu, 3 g tris, 14,4 g glisin 1 g SDS eklenerek 1L suda çözülmüştür. Boyama tamponu, 1 g Coomasie brilliant blue R, 100 ml asetik asit, 300 ml etanol ve 600 ml dH₂O eklenerek karıştırılmıştır. Yıkama tamponu, 100 ml asetik asit, 300 ml etanol ve 600 ml dH₂O eklenerek karıştırılmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve hücre hattı

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* (ATCC 10145), *P. aeruginosa* (PAO1), *Klebsiella* klinik izolat oxa 48+, *A. baumannii* (ATCC baa-1605), *S. aureus* (ATCC 43300), *S. aureus* (ATCC 25923), bakterileri, Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. FaDu (ATCC® HTB-43™) Erzurum Teknik Üniversitesi, Kanser Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. *P. pastoris* X-33 mayası ise Atatürk Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

3.1.6. pPICZ α A vektörü

Çalışmada kullanılan Şekil 1’de ki pPICZ α A vektörü, Atatürk Üniversitesi’den temin edilmiştir.



Şekil 3.1. pPICZ α A vektörü (Li et al. 2007)

- AOX1 promotörü; metanolle indüklenebilen ve rekombinant genin ekspresyonunu sağlayan bölgedir.
- α faktör; çoğaldığı besiyeri ortamına rekombinant proteinin salgılanmasını sağlar.
- Zeosin; *E. coli* ve *P. pastoris*'te transformantların seçilimini sağlayan antibiyotik direnç genidir.
- PUC ori; *E. coli* 'de replikasyonunu sağlayan bölgedir.
- Çoklu klonlama bölgesi; kesim enzimlerinin bulunduğu yerdir.
- AOX1 terminatör bölgesi; transkripsiyonun sonlanması sağlayan yerdir.
- C-terminal peptid ve C-myc epitop bölgesi; Polihistidin (6xHis) kuyruğu bulunduran rekombinant gen ürününün kültür ortamından kolay bir şekilde saflaştırılmasında gerekli olan bölgedir.

3.1.7. Primerler

P. pastoris X-33 suşu ve pPICZ α A vektörü kullanılarak, hBD-2 üretimi gerçekleştirilmiştir. Vektör tasarımında ilk olarak hBD-2 genini kesmeyen restriksiyon enzimleri, biyoinformatik program (<http://www.restrictionmapper.org/>) kullanılarak tespit edilmiştir, Çizelge 3.4 'de gösterildiği gibi, EcoRI (Kesim bölgesi: GAATTC) ve XbaI (Kesim bölgesi: TCTAGA) primerlere eklenmiştir. Erime sıcaklığı (Tm derecesi) ise yine biyoinformatik program (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>) ile ayarlanmıştır. Belirlenen bu primerler, Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. firmasında sentezletirilmiştir ve Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler (altı çizili diziler enzim kesim bölgelerini göstermektedir).

Primerler	Primer dizisi	Referans
hBD-2 forward	5' <u>GGAATTC</u> GGTATAGGCGATCCTGTTACCT3'	Bu çalışma
hBD-2 reverse	5' <u>GTCTAGAT</u> GGCTTTTTGCAGCATTG3'	
5'AOX1	5' GACTGGTCCAATTGACAAGC3'	İnvitrogen
3'AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC3'	
α -faktör	5'TACTATTGCCAGCATTGCTGC3'	
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAG3'	İnvitrogen
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG3'	
GAPDH forward (maya)	5' AATGTTTCGTTGTCCGGTGTC3'	Bu çalışma
GAPDH reverse (maya)	5' GTCTTTTGAGTGGCGGTCAT3'	
GAPDH forward (insan)	5'CCATCTTCCAAGGAGCGAGATC3'	Capik et al. (2021)
GAPDH reverse (insan)	5'GGCATTGCTGATGATCTTGAGG3'	

3.2. Yöntem

3.2.1. FaDu hücre hattının kültüre edilmesi ve *P. aeruginosa* ile indüklenmesi

hBD-2 geninin elde edilmesi için kullanılan FaDu hipofarenks kanser hücre hattı %10 FBS (Fötal Bovin Serum), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde T-25 kültür flasklarında %70-80 yoğunluğa ulaşıncaya kadar kültüre edilmiştir.

P. aeruginosa (ATCC10145) bakterisi çizgi ekim ile LB agara ekilerek 16 saat boyunca 37°C de geliştirilmiştir. Gelişen bakteri hücrelerinden tek koloni alınarak LB broth besiyerinde 16 saat 37°C 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından gelişen bakteri kültürü OD₆₀₀=1,00 ayarlanarak 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır ve 9000 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 5 ml steril PBS'de çözülmüştür. *P. aeruginosa* bakterilerinin FaDu hücrelerinde hBD-2 geninin ekspresyonunu mRNA düzeyinde indüklemek için *P. aeruginosa* bakterileri ile 24 saat bekletildikten sonra hücreler gen ekspresyon analizi için kullanılmıştır.

3.2.2. FaDu hücrelerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

FaDu hücreleri, *P. aeruginosa* bakterileri ile muamele edildikten 24 saat sonra herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ve uygulama yapılan gruplardan RNA izolasyonu yapılmıştır. Öncelikle, hücrelerin çoğaldığı T-25 kültür flasklarından besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1x PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kültür flasklarına belirli oranda Tripsin eklenerek hücreler 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 3-5 dk bekletilerek kaldırılmıştır. Tripsinin toksik etkisini inaktive etmek için RPMI-1640 besiyeri kullanılarak hücreler falcona alınmış ve 1.200 rpm'de 3 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından besiyeri uzaklaştırılmış ve hücre pelletinden RNA izolasyonu, standart TRIzol® metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle, elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 ml trizol eklenip hücreler iyice homojenize edilmiştir. Homojenize hücreler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından hücrelerin üzerine 200 µl kloroform eklenmiş ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

Faz ayrışmasının ardından üstte RNA içeren organik faz steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Organik fazlara 500 µl izopropanol eklenerek örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C’de 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. RNA’lar %75 etil alkol ile yıkanarak 4 °C’ de 7500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. RNA lar iyice kuruduktan sonra moleküler grade su içerisinde çözülmüştür. Ardından, RNA konsantrasyon ve saflıkları Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) yardımıyla ölçülmüştür ve deneylerde kullanılıncaya kadar -80 °C’ de saklanmıştır.

RNA örneklerinden total konsantrasyonu 1 µg olacak şekilde alınarak, cDNA sentez reaksiyonu kuruldu. cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA master mix içerik miktarı 10X-RT Buffer 2 µl, 100 mM 25X dNTP Mix 0,8 µl, 10X-RT Random Primer 2 µl, 1 µl Revers transkriptaz, 1 µl RNase inhibitörü olacak şekilde toplam hacim 10 µl şeklinde hazırlanmıştır. Reaksiyon şartları 25°C 10 dk, 37°C’de 120 dk ve 85°C 5 dk olacak şekildedir. Reaksiyon sonucu oluşan cDNA’lar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.3. Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile indüklemenin kontrolü

Elde edilen cDNA’lar 1:3 oranında dilüe edildi. qRT-PCR reaksiyonu ticari satın alınan kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR master mix içerik miktarı qRT-PCR master mix 4 µl, primerler 0,5 µl, cDNA 2 µl, dH₂O 3 µl toplam hacim 10 µl şeklinde reaksiyon hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, 95°C, 2 dk; 60°C, 1 dk; 72°C, 30 sn ve 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. İnsan GAPDH geni referans kontrol geni olarak kullanılmıştır ve deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile analiz edilmiştir. Sonuçların anlamlı olup olmadığı one-way ANOVA analizi ile GraphPad (Prism 8.2) programında değerlendirilmiştir.

3.2.4. hBD-2 genin PCR ile çoğaltılması

hBD-2 genine özgü forward ve reverse primerleri kullanılarak çoğaltılması amacıyla geleneksel PCR metodu kullanılmıştır. Hazırlanan cDNA’lardan 5 µM primerler, 10 µM dNTP’ler, 2 mM MgCl₂, 10x taq buffer, 0,5 unite taq polimeraz ile

reaksiyon kurulmuştur. PCR reaksiyon koşulları; 95°C'de 2 dakika, 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 45 sn, 60°C'da 30 sn ve 72°C'de 45 sn; son uzama 72°C'de 10 dakika olarak belirlenmiştir.

3.2.5. pGEM-T easy vektörüne klonlama (Sub-cloning) ve DNA dizileme

PCR ile çoğaltılan hBD-2 geni, doğrulama amacıyla pGEM-T easy vektörüne klonlanmıştır. Öncelikle, hBD-2 PCR ürünü, pGEM-T vektörü ile kit protokolleri göre ligasyona (4 °C, 16 saat) tabi tutulmuştur. Ligasyon ürünleri ısı şoku uygulaması ile *E. coli* (One Shot™ TOP10) hücrelerine transforme edilmiştir. Elde edilen beyaz kolonilerden 5 tane seçilip ve plazmid izolasyonu (EcoSpin Plasmid Isolation Kit) gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.1'de verilen vektör dizileme primerleri verilmiştir. Dizileme öncesi kontroller SP6 ve T7 primerleri ile PCR yapılarak gerçekleştirildi. Olumlu sonuç alınan koloniler Sanger dizilemesine tabi tutulmuştur.

3.2.6. pGEM-T-hBD-2 vektöründen hBD-2'in elde edilmesi

pGEM-T easy vektörüne alt klonlaması (subcloning) yapılmış olan hBD-2 geninin geri alınması için pGEM-T-hBD-2 plazmidini EcoRI ve XbaI enzimleri ile ikili kesim (Double Digestion) reaksiyonu oluşturulmuştur. Kesim reaksiyonu; 0,5 µg plazmid, 1'er µl EcoRI ve XbaI (200 unite/ µl) ve total hacim 20 µl'ye dH₂O ile tamamlanarak, 37 °C'de 16 saat'lik inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzimlerin inaktivasyonu için 65°C'de 20 dakika inkübasyon yapılmıştır. Kesim reaksiyonunun kontrolü için, %1'lik agaroz jel hazırlanarak, örnekler 90V'da 40 dakika elektroforez yapılmıştır. Kesimin kontrolünün ardından, kesilmiş hBD-2 geni (Yaklaşık 140 bp'lik bölge) jelden, geri kazanılması için EcoTech Gel Extraction Kit ile ekstraksiyonu protokollerine göre kesilen jelin ağırlığına göre 100 mg agaroz için 300 µl ecospin binding buffer eklenmiştir. 55°C'de jel çözülünceye kadar bekletilmiştir. Ardından 150 µl izopropanol eklendi ve karıştırılmıştır. Kolona örnekler yüklenmiştir. 30 sn maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı ve elüsyon tamponu eklenmiştir.

3.2.7. pPICZ α A vektörüne ligasyon ve *E. coli*'ye klonlama

Jelden saflaştırılan hBD-2 geninin, aynı enzimlerle kesilmiş ve saflaştırılmış olan pPICZ α A vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonu, vektör: insert oranı (1:3) olacak şekilde ayarlanıp, T4 ligaz (100 unite/ μ l) ve 2 μ l 10X T4 buffer eklenerek total hacim 20 μ l şeklinde reaksiyon kurulmuştur. 4 °C'de bir gece inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünü *E. coli* (One Shot™ TOP10) hücrelerine ısı şoku uygulaması ile transforme edilmiştir. Ardından bu hücreler zeocin içeren LB agar petrilere yayma ekim yöntemi ile yayılmıştır.

3.2.8. *E. coli* hücrelerinden elde edilen rekombinant vektörlerin doğrulanması

Rekombinant vektörlerin analizi için 2, 4, 7 ve 9 nolu koloniler lsbl-zeo (50 μ g/mL) sıvı besiyerlerinde 37 °C'de 16 saat çoğaltılmıştır. Plazmit izolasyonu kit protokollerine göre, gelişen hücreler ependorflara alınarak santrifüj edildi ve besiyerleri uzaklaştırılmıştır. 250 μ l resüspanse tamponu, 20 μ l RNaz A enzimi ve 250 μ l liziz tamponu eklenerek 3 dk bekletilmiştir. 350 μ l plazmit bağlama tamponu eklenip alt üst yapılmıştır. 5 dk 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve kolonlara aktarım yapılmıştır. 30 sn 13.500 rpm'de santrifüj edildi ve yıkama tamponları ile yıkanmıştır. 30 sn 13.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elüsyon tamponu ile elüe edilmiştir. pPICZ α A-hBD-2 vektörünü alıp almadığı vektöre ait AOX ve gene ait hBD-2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde 90 V'de 40 dakika yürütülerek görüntülenmiştir. Olumlu sonuç gösteren koloniler, çift yönlü okuma ile Sanger sekans analizine tabi tutulmuştur.

3.2.9. Rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi

pPICZ α A-hBD-2 vektörünü alan hücreler SacI enzimi ile lineer hale getirilmiştir. Kesim reaksiyonu, 12 μ l su, 2 μ l buffer, 5 μ l DNA, 1 μ l enzim olacak şekilde toplam hacim 20 μ l olarak oluşturulmuştur. Reaksiyon koşulları, 37°C'de 14 saat ardından 65 °C'de 20 dk olacak şekilde belirlenmiştir. İnkübasyon sonrası vektör fenol-kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, inkübe edilen ürünler 600 μ l su ile tamamlanmıştır. 600 μ l fenol kloroform izopropil alkol eklenerek karıştırılmıştır. 10.000

g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst kısım alınarak 600 µl kloroform eklenmiştir. 10.000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Alınan hacimin 1/10'u kadar sodyum asetat eklendi. Üzerine %100 alkol eklenerek -80 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında, 20 dk 20.000 g'de santrifüj edilmiştir ve ardından %70 lik alkol ile yıkanıp, santrifüjlenip kurutulmaya bırakılmıştır ve su ile çözülmüştür.

3.2.10. Elektrokompotent *P. pastoris*'lerin hazırlanması

Ön geliştirme kültürü olan 5 ml YPDS besiyerinde 30 °C'de gelişen X-33 kolonileri, 250 ml YPDS besiyerine 100 µl kadar koyulmuştur. Hücreler OD₆₀₀'de 1,3-1,5 olana kadar gelişim sağlanmıştır. Gelişen hücreler 50 ml falkona alınıp 4 °C'de 1500 g'de 2 kez santrifüj edilmiştir. Ardından 50 ml steril soğuk su ile muamale edilip, santrifüjlenmiştir. Su uzaklaştırılmıştır. Hücreler 25 ml soğuk ile tekrar muamale edilmiştir ve santrifüjlenmiştir. Ardından, 20 ml soğuk 1 M sorbitol ile resüspense edilmiştir ve santrifüjlenmiştir. Hücreler 1 ml 1M sorbitol ile tekrar resüspense edilip buza alınmıştır. Elde edilen bu hücreler elektrokompotent olarak kullanılmıştır.

3.2.11.pPICZαA-hBD-2 vektörünün *P. pastoris* X-33 suşuna aktarımı

pPICZαA-hBD-2 vektörü, SacI restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilen *P. pastoris* X-33 hücrelerine 1-5 µg olacak şekilde eklenmiştir. 5 dakika buz üzerinde inkübasyonun ardından, 2 mm elektroporasyon küvetine alınmıştır ve 2.000 volt, 200 Ω ile aktarım gerçekleştirilmiştir. 1 ml sorbitol eklenip 15 ml steril falkona elektroporasyon küvetindeki hücreler tip yardımıyla alınıp 30 °C'de statik olarak 1 saat inkübe edilmiştir. YPDS zeosin içeren petrilere yayılıp 30 °C'de 2-3 gün geliştirilmiştir.

3.2.12. Rekombinant *P. pastoris*'lerden genomik DNA izolasyonu

Vektörü olan X-33 suşları, zeosin içeren YPDS agar petrilere geliştirdikten sonra, gelişen kolonilerden bir öze dolusu alınıp, 2 ml'lik ependorfa konulup üzerine 600 µl liziz buffer eklenerek 50h/30 dk homojenize edilmiştir. Ardından 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjün edilmiştir ve üst kısım yeni tüpe alınıp üzerine 2 µl, RNase A

eklenmiştir. Ardından, 15 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Üzerine 1:1 oranında fenol:kloroform:izoamil (25:24:1) alkol ilave edilmiştir. Vorteks yapılarak, 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım yeni tüpe alınarak eşit hacimde %100 etanol eklenerek -20 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile üç kez yıkanarak kurutulmuş ve 50 µl dH₂O tamponunda çözülmüştür.

3.2.13. Rekombinant hBD-2’nin üretimi

Geni alan *P. pastoris* kolonileri belirlendikten sonra hBD-2 üretimi için ön geliştirme besiyeri olan BMGY besiyerinde 30°C’de 150 rpm’de 18 saat inkübe edilmiştir. 25°C’de 35000 g’de 10 dk santrifüj edilerek 3 kez BMMY besiyeri ile yıkanmıştır. 100 ml BMMY besiyeri içeren girintili erlenlerde 30°C’de 150 rpm’de 96 saat inkübe edilmiştir. Her 24 saatte bir besiyerine indüklemeye için toplam hacimde %1-3 olacak şekilde %100 saf metanol ile indüklemeye yapılmıştır. Her 24 saatlik inkübasyon sonrası alınan örnekler, 4°C’de, 3500 g’de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Her 24 saate bir kültür filtratı örneği alınmıştır. Sıvı azot muamale sonrası -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.14. TCA ile protein örneklerini çöktürme

%20 TCA çözeltisi çözeltisi 20 ml’lik kültür filtratları üzerine 1:1 oranında yavaşça eklenmiştir. Elde edilen karışım -20 °C’de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra 13.500 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. 3 kez %70 EtOH ile 13.500 rpm’de 5 dk yıkamanın ardından pelet üzerine 1ml soğuk aseton ilave edilerek yıkama yapılmıştır. 13.500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Asetonla yıkama işleminden pelet, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan pelet PBS tamponunda çözülmüştür.

3.2.15. SDS-PAGE

Elektroforez plakaları su ile temizlendikten sonra camlar jel hazırlama aparatına yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. %15’lik yükleme jeli hazırlanarak dökülüp jel yüzeyinin düzgün olması için izopropanol ile hava teması engellenmiştir. Polimerleşme ardından

alkol uzaklaştırılmıştır ve donan jel üzerine %15'lik ayırma jeli dökülüp üzerine tarak yerleştirilmiştir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra tarak çıkarılarak, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Protein örnekleri, yükleme boyası ile muamele edilip pipetaj yapılarak 95°C'de 5 dakika kaynatılan örnekler, sekonder yapıların oluşmasını engellemek amacıyla buza alınmıştır. Jele yüklenen örnekler, 80 V'da 3 saat sabit hızda yürütülmüştür. Ardından, 2 saat boyunca fikse edilip, Coommasie R-250 boyası ile 20 dakika boyanmıştır ve proteinlerin görüntülenmesi amacıyla yıkama solüsyonunda 15'er dakika 3 kez yıkanmıştır ve görüntülenmiştir.

3.2.16. Western blotlama

SDS-PAGE jeli PVDF membrana western blot sisteminde aktarım yapılmıştır. Sonrasında, TBST (Tris Buffered Saline with Tween-20) ile yıkanmıştır. Membranı oda sıcaklığında 1 saat bloklama tamponu ile bloke edilmiştir. Primer antikor, üretici firmanın protokolünde önerilen seyreltme faktörüne göre bloklama tamponu ile seyreltilmiştir. Bloklama tamponunu uzaklaştırılacak ve membranı kaplayacak kadar seyreltilen His tag primer antikor eklenmiştir. Membran 4 °C'de 1 gün boyunca primer antikorla inkübe edilmiştir. Ardından primer antikoru uzaklaştırmak için membran 1xTBST ile üç kez 15 dakika boyunca yıkanmıştır. HRP-konjuge sekonder antikor bloklama tamponu ile seyreltilmiştir. Membran sekonder antikorla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membran 1xTBST ile 3 kez 15'er dk yıkanmıştır. Kemilüminesans ışına için solüsyon 1 ve 2 substrat karışımı eşit miktarda kullanılmıştır. Membran düz bir yüzeye yerleştirilmiştir ve üzerine bir membran için 1 ml substrat karışımını dağıtılmıştır. 3 dk sonra BioRad ChemiDoc cihazın içerisine yerleştirilip, görüntü alınmıştır.

3.2.17. hBD-2'nin antimikrobiyal aktivitesinin kontrolü

3.2.17.1. Agar difüzyon testi

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için agar difüzyon testi kullanılmıştır. LA besiyerine steril swap yardımıyla bakteriler yayılmıştır. Bu petriyerler içleri, 6 mm mantar delici ile kuyular açılıp 200 µl kültür filtratı eklenerek, petriyerler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Wiegand et al. 2008).

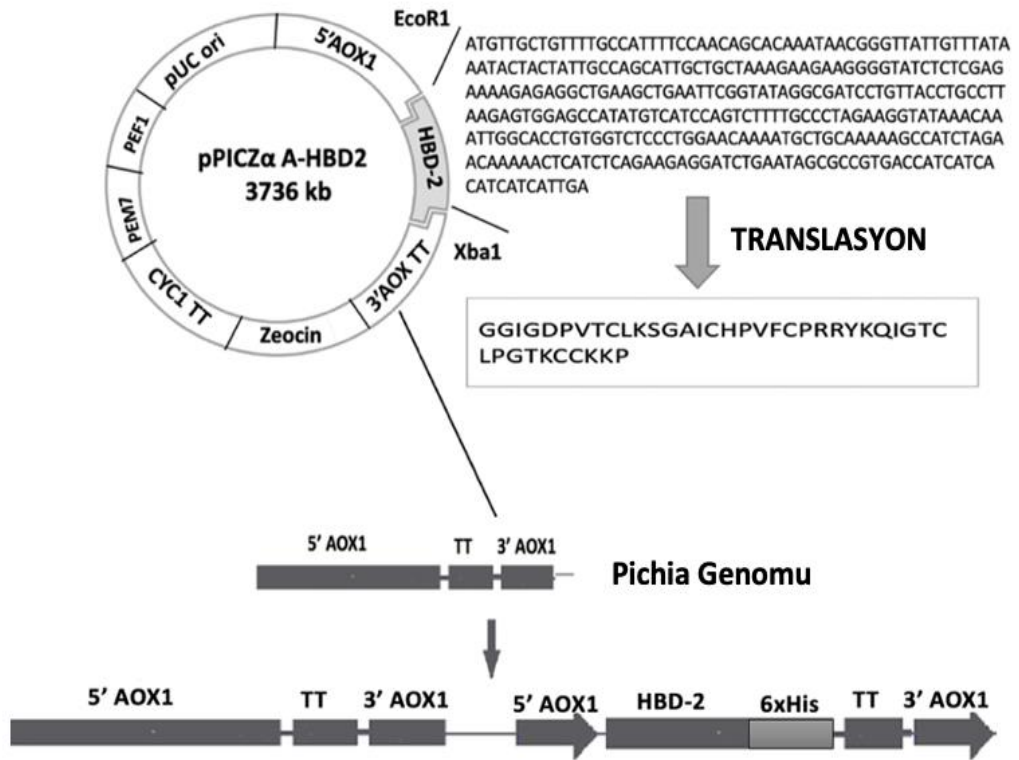
3.2.17.2. Mikro sıvı-bakteriyel koloni gösterimi

Bakteriler LB agar besiyerinde 37°C’de 16 saat gelişimi sağlanmıştır. Bu bakterilerden tek koloni alınarak 7 ml LB broth besiyerinde 37°C’de 16 saat geliştirilmiştir. Kültürlerden OD₆₀₀=1,00 olacak şekilde hücre konsantrasyonları ayarlanmıştır. Bu hücrelerden 2 µl alındı. 100 µl 24-48-72-96 saat rekombinant hücre kültür filtratları 96’lık well plate eklenmiştir. Negatif kontrol olarak BMMY besiyeri kullanılmıştır. 4 saat 37°C’de statik inkübasyona bırakılmıştır. 30 µl alınarak LB agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 24. saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından petri görüntüleri üretim saatlerine göre analiz edilmiştir (Li et al. 2021).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

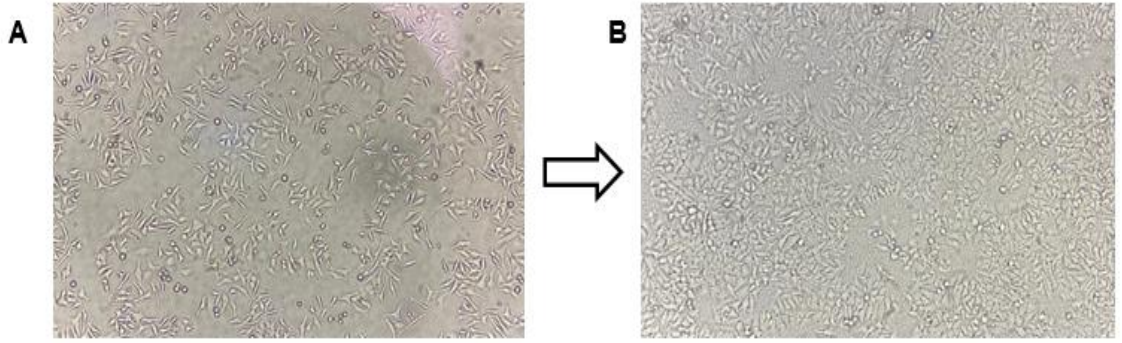
Bu tez çalışmasında, insan kaynaklı hBD-2 peptidine ait dizinin FaDu hücre hattında indüklenme sistemi kullanılarak PCR ile alınması, *E. coli* Top 10 hücrelerine alt klonlamasının yapılması ve *P. pastoris* X-33 hücrelerine transforme edilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konstrüksiyon şeması Şekil 4.1’de verilmiştir. Rekombinant olarak üretilen hBD-2 peptidinin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Araştırma bulguları aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.



Şekil 4.1. pPICZαA'dan türetilen hBD-2 *P. pastoris* X-33 mayasına gerçekleştirdiği homolog rekombinasyonun konstrüksiyon görüntüsü.

4.1. FaDu Hücre Hattında hBD-2 İfadesinin İndüklenmesi

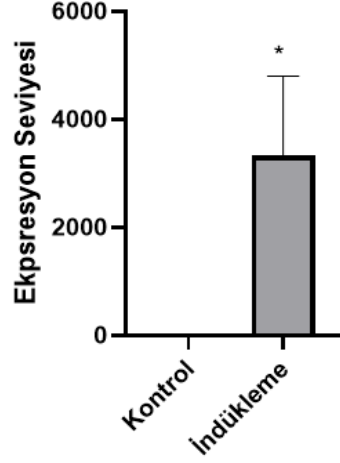
%70 tutunma gözlenen FaDu (ATCC® HTB-43™) hücre hattına, 1 ml olacak şekilde hazırlanan otoklav ile öldürülmüş *P. aeruginosa* bakterilerinden eklenerek indüklemeye işlemi tamamlanmıştır. Şekil 4.2’de FaDu hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir. İndüklemenin 24 saat sonrasında kontrol ve indüklemeye gruplarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. A. FaDu hücre hattının 400 kat büyütme ile alınan indüklemeye öncesi görüntüsü **B.** İndüklemeye sonrası 400 kat büyütme ile 24. saatte alınan görüntü.

4.1.1. qRT-PCR ile indüksiyonun kontrolü

İndüklenme öncesi ve sonrası hücrelerden elde edilen RNA’lar kontrol grubundan 2115 ng/µl; indüklemeye grubundan ise 2578 ng/µl konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Ardından RNA örneklerinden 1 µg alınmış ve cDNA sentezi için kullanılmıştır. Elde edilen cDNA’lar 1:3 oranında dilüe edilerek, qRT-PCR reaksiyonu kurulmuştur. İnsan GAPDH geni referans kontrol geni olarak kullanılmış ve Şekil 4.3’de gösterildiği gibi, sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile analiz edilmiştir. Ayrıca sonuçların anlamlı olup olmadığı one-way ANOVA analizi ile GraphPad (Prism 8.2) programında değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, indüklemenin başarılı bir şekilde uygulandığı görülmektedir.



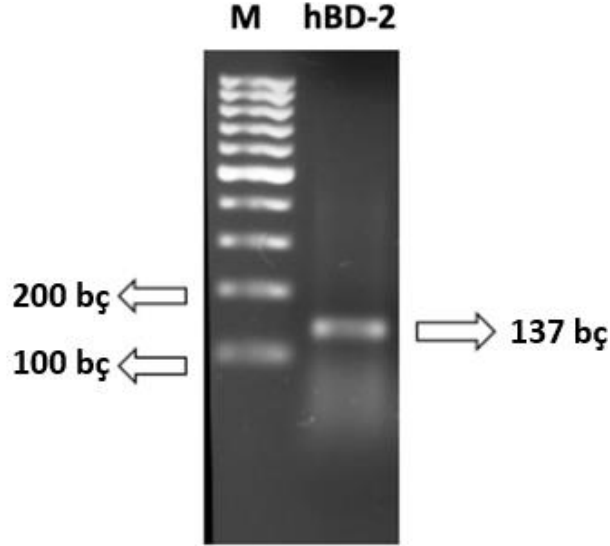
Şekil 4.3. qRT-PCR analizi sonuçları verilmiştir. *P. aeruginosa* ile yapılan indüklemelerde hBD-2 gen ekspresyonunun seviyesi kontrole göre 3335 kat artış göstermiştir.

Krisanaprakornkit ve arkadaşları, 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, bu tez çalışmasına benzer şekilde hBD-2 proteininin üretimini *Fusobacterium nucleatum* bakterisi ile indüklemişlerdir (Krisanaprakornkit et al. 2000). Bir başka çalışmada ise, *S. aureus*'un insan derisi keratinosit hücrelerinde hBD-2 üretimini tetiklediği tespit edilmiştir (Midorikawa et al. 2003). Bu çalışmada, hBD-2 mRNA miktarının kademeli olarak arttığı ve indüklemenin sekizinci saati sonunda hBD-2 mRNA'sının 25 kat artış gösterdiği belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, hBD-2 proteininin beyin kılcal endotel hücrelerinde *Chlamydomphila pneumoniae* bakterileri tarafından indüklendiği ve indüklemenin 24 saat sonrasında üretimin maksimum seviyeye çıktığı qRT-PCR yöntemi ile ortaya koyulmuştur (Tiszlavicz et al. 2010).

4.1.2. hBD-2'nin PCR ile çoğaltımı

Elde edilen cDNA'lardan hBD-2 geninin primerleriyle gradient PCR yapılmış ve bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. PCR sonucu %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü şekil 4.4'de gösterilmiştir. hBD-2 geni 123 bp uzunluğundadır. Primer dizilerinde bulunan restriksiyon bölgeleri ve diğer ek nükleotidler eklendiğinde 137 bp uzunluğunda bir bölge çoğaltılmıştır.



Şekil 4.4. hBD-2 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1 lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

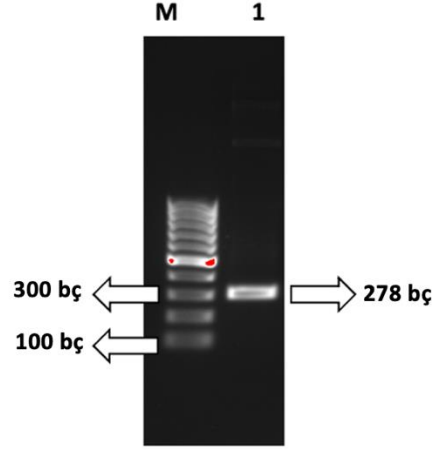
4.2. pGEM-T Easy Vektörüne Alt Klonlama

4.2.1. Ligasyon ve transformasyon

hBD-2 genine ait PCR ürünü pGEM-T easy vektörüne transforme edilmiştir. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant plazmitler kompetent *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerine ısı şoku uygulaması transforme edilmiştir. Mavi beyaz seçim sağlayan bu vektör, geni alan transformantları beyaz renkte görünmesini sağlamaktadır. Ampiline dirençli olan transformantlar Luria Bertani (LB) amp agar besiyerinde gelişmiştir.

4.2.2. Pozitif transformantların belirlenmesi

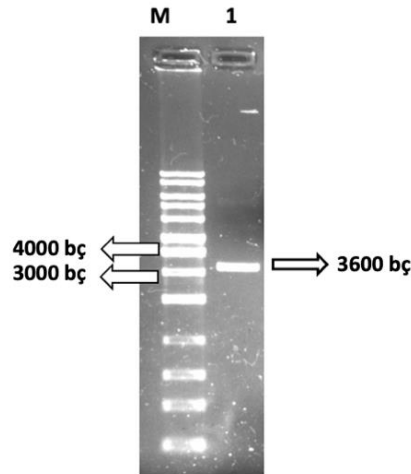
Amp LB agar besiyerinde gelişen kolonilerin hedef geni içerip içermediklerini kontrol etmek için beyaz kolonilerden rastgele seçim yapılarak pGEM-T-hBD-2 olarak adlandırdığımız plazmid DNA'larının izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmid DNA'ları vektöre spesifik SP6 ve T7 primerleri ile amplifiye edilip, dizileme analizine gönderilmiştir. Şekil 4.5'de SP6 ve T7 primerleriyle yapılan PCR sonuçları gösterilmiştir.



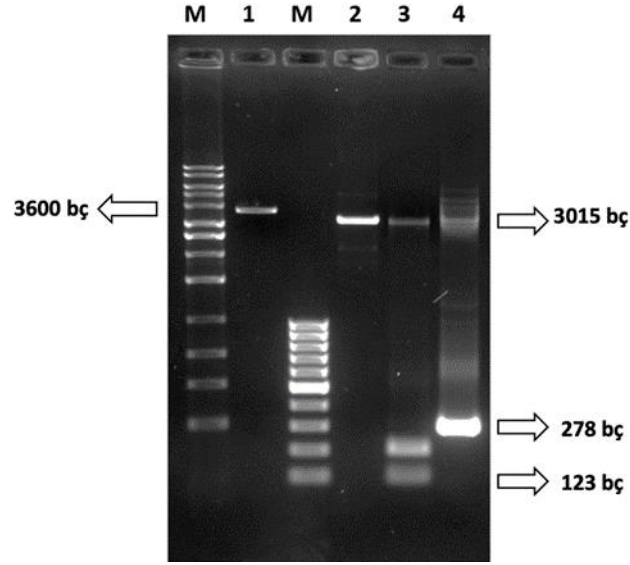
Şekil 4.5. pGEM-T-hBD-2 vektörünün SP6 ve T7 primerleri kullanılarak yapılan PCR PCR ürünlerinin %1 lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: marker; 1: 278 bç uzunluğundaki PCR ürünü).

4.3. pPICZ α A Vektörüne Klonlama

pPICZ α A vektörünün görüntüsü Şekil 4.6’da verilmiştir. Şekil 4.7’de ise restriksiyon enzimi kesim görüntüleri bulunmaktadır. pPICZ α A vektörü, EcoRI ve XbaI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve jelden saflaştırılmıştır. hBD-2 geni ise pGEM-T easy vektöründen EcoRI ve XbaI restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkarılmıştır. Böylece hBD-2 geni ve pPICZ α A vektörü, ligasyona hazır hale getirilmiş ve 4 °C’de 16 saat ligasyona tabi tutulmuşlardır.



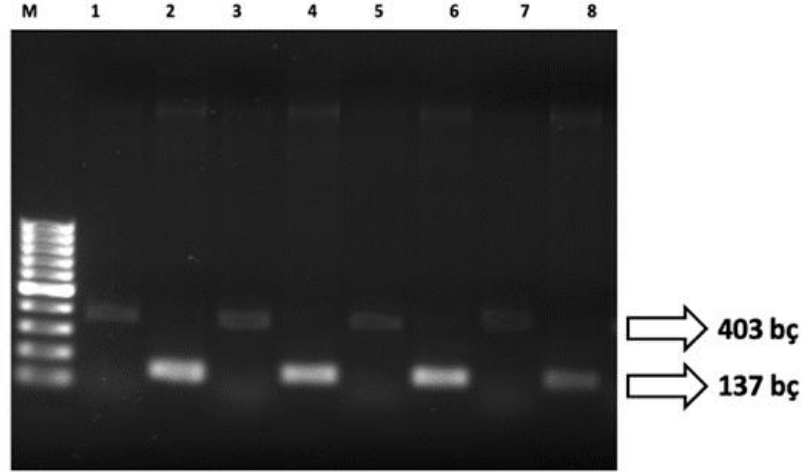
Şekil 4.6. pPICZ α A vektörünün %1’lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. pPICZ α A vektörü 3593 bç uzunluğundadır.



Şekil 4.7. Restriksiyon enzim kesimi sonuçlarının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker 1: pPICZ alpha ikili kesimi 2: pGEM-T-hBD-2 vektör 3: pGEM-T-hBD-2 ikili kesim 4: pGEM-T-hBD-2 SP6 ve T7 primerleri ile yapılan PCR'ı).

4.3.1. pPICZ α A-hBD-2 Konstrüksiyonunun elde edilmesi

Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant plazmitler kompetent *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerine ısıl şok ile transforme edilmiştir. Bakteri hücreleri içerisine pPICZ α A vektörünü alan ile zeosine direnç kazanan transformantların zeosinli Ls-LB agar besiyerinde gelişmesi mümkün olmuştur. Zeosinli Ls-LB agar besiyerinde gelişen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Vektöre özgül 5' ve 3' AOX ve hBD-2 geni primerler ile pozitif koloniler seçilmiştir ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Bu pozitif kolonilerden elde edilen plazmid izolasyonu yapılmış ve Sanger dizileme analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen pozitif sonuçları taşıyan vektör pPICZ α A-hBD-2 vektörü olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.8. 1, 3, 5 ve 7. Numaralı kuyular: Pozitif sonucu olan toplam 4 koloninin 5'α faktör ve 3' AOX primerleri ile yapılan PCR sonuçlarının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 2, 4, 6 ve 8 numaralı kuyular ise hBD-2 gen primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

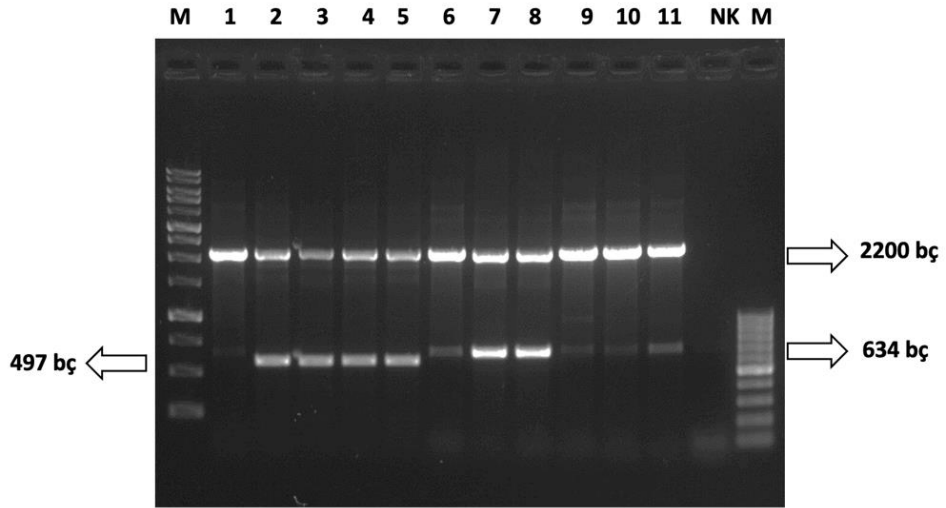
Literatürde bulunan farklı çalışmalarda, hBD-2'nin rekombinant üretimi için pET28 ve pET-32a vektörlerine konstrüksiyon tasarımı gerçekleştirilmiş *E. coli* ekspresyon sisteminde üretimleri gerçekleştirilmiştir (Fang et al. 2002; Peng et al. 2004). Bir başka konstrüksiyon ise, MET17 promotörü altına hBD-2 geninin yerleştirildiği *S. cerevisiae* ekspresyon sistemi olmuştur (Møller et al. 2017). Bu tez çalışmasında, literatürdeki konstrüksiyonlardan farklı olarak AOX promotörü altına hBD-2 geni yerleştirilmiş ve *P. pastoris* suşunda ekspresyonunun yapılması sağlanmıştır.

4.3.2. *P. pastoris*'e elektroporasyonu

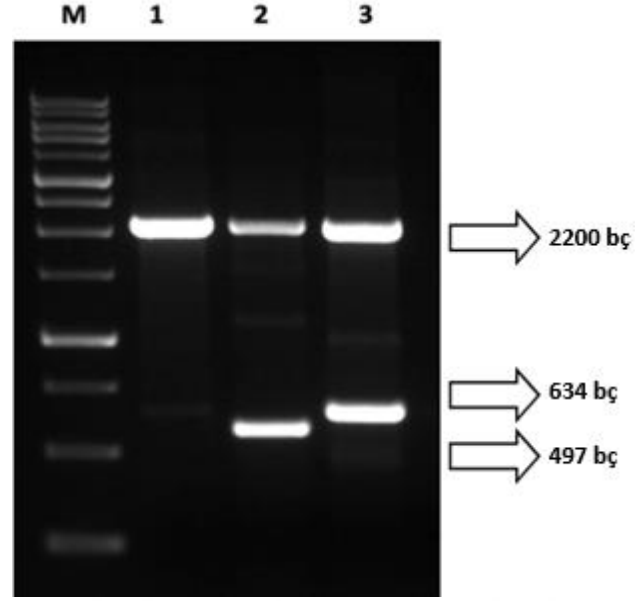
Hedef DNA dizilerini taşıyan *E. coli* One Shot TOP10 transformantlarından izole edilen pPICZαA-hBD-2 plazmidleri ve pPICZαA vektörü kompetent *P. pastoris* X-33 hücrelerine transforme edilmeden önce SacI restriksiyon endonükleaz enzimi ile lineer hale getirilmiş fenol klorofom ile saflaştırılmıştır. Linerize edilen rekombinant plazmitler elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* X-33 hücrelerine transforme edilmiştir. 100 µg/ml zeosin içeren YPDS agar plaklarına yayma yöntemi ile ekilerek 30°C'de koloniler görülene kadar inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.3. Rekombinant suşların belirlenmesi

Elektroporasyon sonrası petrilerde gelişen pPICZ α A vektörünü ve pPICZ α A-hBD-2 içerdiği tahmin edilen kolonilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA dizilerine spesifik primerler ile amplifiye edilmiştir. Pozitif kontrol olarak X-33 suşu kullanılmıştır. DNA'lar, 5'AOX1 ve 3'AOX1 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. pPICZ α A vektörü içeren transformantların 2200 bç'lik ve 497 bç'lik iki ayrı bantın, pPICZ α A-hBD-2 2200 bç'lik ve 634 bç *P. pastoris* X-33 suşu ise sadece doğal AOX1 genine 2200 bç ait tek bir bant gözlenmiştir. Böylelikle, pozitif *P. pastoris* transformantları tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Elektroporasyon sonrası seçilen kolonilerin 5'AOX ve 3'AOX primerleri ile kontrollerinin yapılması. (M: Marker; 1:X-33 suşunun genomik DNA'sından yapılan PCR sonucu 2-5: pPICZ α -A'nın transforme edildiği rekombinant suşların PCR sonucu, 6-11: pPICZ α A-hBD-2 vektörünün transforme edildiği rekombinant suşların PCR sonucu NK: Negatif kontrol).



Şekil 4.10. Rekombinant üretim için seçilen koloninin kontrollerinin yapılması, karşılaştırması ve 5'AOX ve 3'AOX primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (**M:** Marker **1:** X-33 suşu **2:** pPICZαA **3:** hBD-2 genini içeren rekombinant koloni).

4.4. hBD-2 Peptidinin Üretiminin Analizi

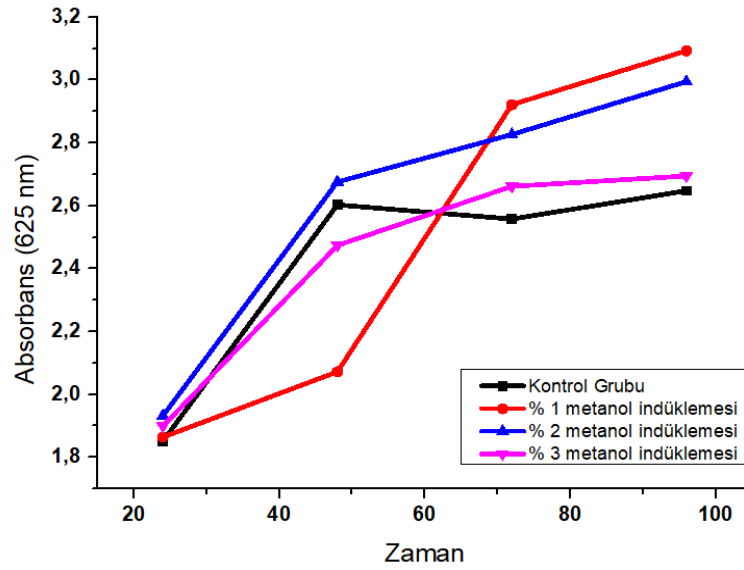
Seçilen rekombinant pPICZαA-hBD-2 hücreleri, ön kültür besiyeri olan BMGY besiyerinde 24 saat boyunca 30°C'de 225 rpm'de inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler santrifüj edilerek protein üretimi için hazırlanan BMMY besiyerine aktarılmıştır. 96 saat boyunca 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatte saf metanole ile indüklemeye yapılmıştır. Alınan örnekler sıvı azotla muamele sonrası -80 °C'de saklanmıştır.

4.4.1. Üretim sürecince metanol oranlarının belirlenmesi

İndüklemeye metanol oranı üretim üzerinde olumlu veya olumsuz olarak etki edebilmektedir. Metanolün fazla eklenmesi rekombinant *P. pastoris* üzerine toksik etki yapacağından üretimde metanol oranının belirlenmesi için farklı oranlar denenmiştir. Bu nedenle, BMMY besiyerinde gelişen koloniler her 24 saatte bir %1, %2 ve %3 metanol içerecek şekilde indüklemeye tabi tutulmuştur. Farklı oranlarda indüklenen hücrelerin gelişim durumlarını belirlemek için spektrofotometrede OD_{600 nm}'de absorbanları, qRT-PCR analizleri ve agar difüzyon testi yapılmıştır.

Metanol, rekombinant protein ekspresyonu artırılmasının yanı sıra tek karbon kaynağı olarak da kullanılır. Fakat hücre gelişimini, metanol konsantrasyonların yüksek oranları inhibe edebilmektedir (Zhang et al. 2000). Bu yüzden genellikle kesikli beslemeli işlem kullanılır. Yetersiz metanol oranı, protein verimliliğini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle toksik etkiyi önlemek için kültür içindeki metanol konsantrasyonunun %0,5' in altında tutulması gerektiğidir ama bu oran tüm rekombinant proteinler için uygun bir oran olmamaktadır (Guarna et al. 1997). Birçok rekombinant protein için tüketilen metanol miktarı ile üretilen protein miktarı arasında doğrudan bir ilişki gözlemlenmiştir. Fazla metanol 1-4%'den fazla kullanımı toksik olabilmektedir.

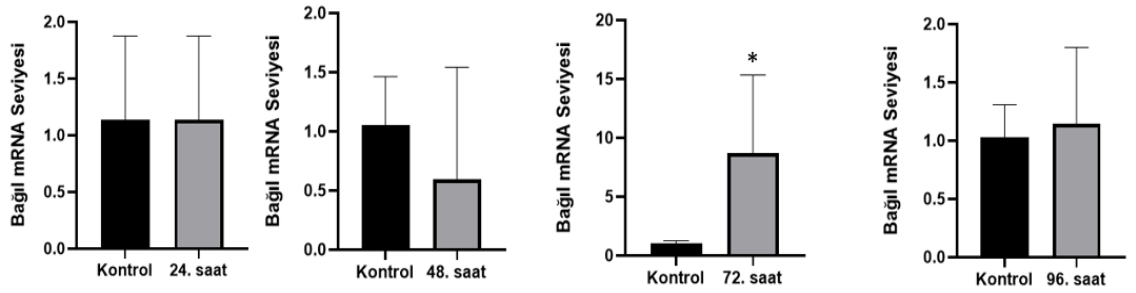
Tez çalışmasında, metanol %1, 2 ve 3 oranlarında uygulanmıştır. Sonuçlarımıza göre, BMMY besiyerinde metanol eklemesinin hücre büyümesi üzerine olumsuz bir etkisi olmamıştır.



Şekil 4.11. Farklı oranlarda metanol indüklemesinin *P. pastoris* hücre büyümesi üzerine etkisi.

4.4.2. qRT-PCR ile hBD-2 üretiminin doğrulanması

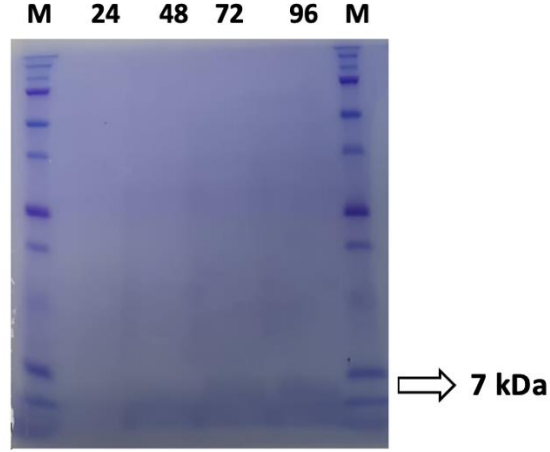
BMMY üretim besiyerinde her 24 saatte farklı metanol oranları kullanılarak %1, %2 ve %3 indüklemeye gerçekleştirilmiştir. 24 saate bir toplanan örneklerle yapılan qRT-PCR sonucunda gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, indüklemenin en iyi oranın %2 metanol oranı olduğu 72. saatte hücredeki mRNA miktarının en fazla olduğu gen ekspresyonu analizlerine göre belirlenmiştir. Gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. %2 metanol indüklemesi yapılan kültürlerde hBD-2 mRNA seviyesinin incelenmesi. Sonuçlar maya GAPDH genine göre normalize edilmiştir.

4.4.3. SDS-PAGE ile hBD-2 üretiminin kontrolü

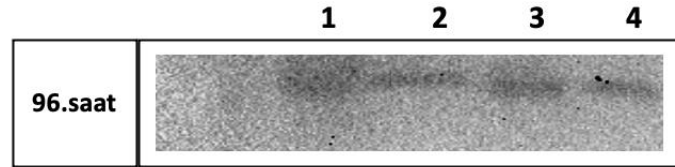
pPICZ α A-hBD-2 içeren rekombinant BMMY besiyerinde 96 saat boyunca %2’lik metanol ile indüklenerek rekombinant peptidin üretimi gerçekleştirilmiş ve daha sonra TCA ile çöktürülen peptid, %15’lik SDS-PAGE jel elektroforezinde 3 saat 80 V’da yürütülerek ayrılmıştır. Elektroforez sonrası jele Commasie boyama yapılmıştır. Elektroforez sonuçlarına göre rekombinant peptid yaklaşık 7 kDa boyutunda bant vermiştir. 96. saate üretimin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Rekombinant peptidlerin 24-48-72-96 saatlik SDS-PAGE analizi

4.4.4. Western Blotlama

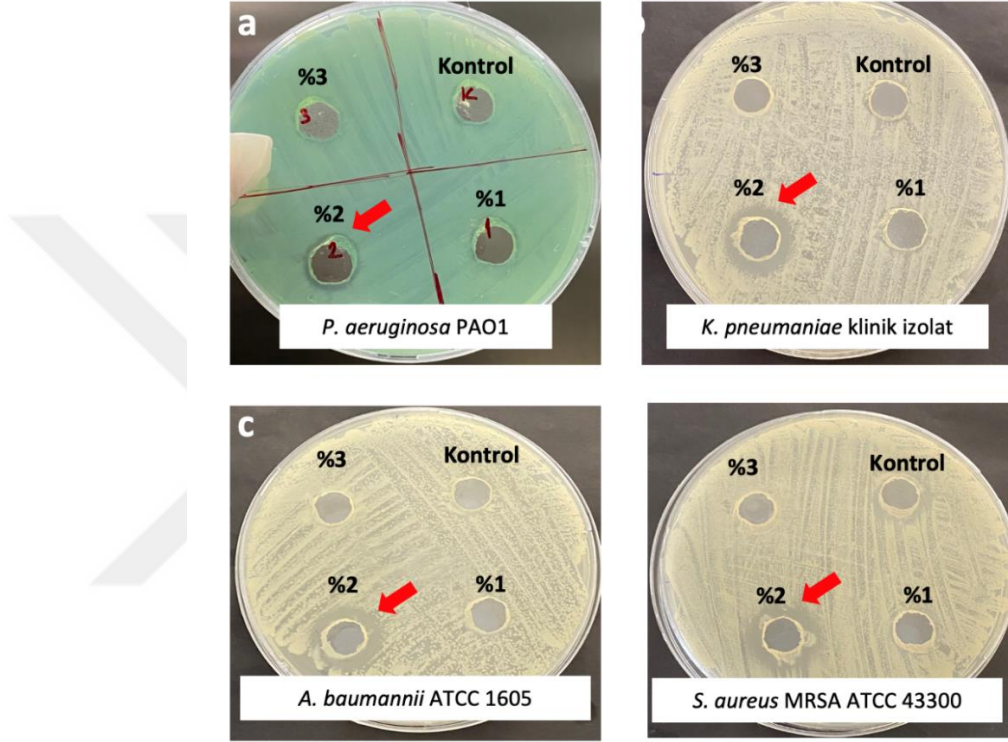
hBD- 2 proteini fonksiyonel olarak incelemek için farklı çözücülerde (Su, RIPA, PBS) çözülmüş ve her örnek farklı kuyulara yüklenerek, SDS-PAGE' e yüklenmiştir. SDS-PAGE jelinin yürütülmesinin ardından Jel PVDF membrana aktarılmış, His tag primer antikör (6x-His Tag Monoclonal Antibody (3D5), HRP ile 16 saat muamele edilmiştir. Ardından HRP-konjuge sekonder antikör ile 1 saat muamele edilip, kemilüminesans görüntü alınmıştır. Şekil 4.14'de western blotlama sonucu görülmektedir.



Şekil 4.14. Western blotlama sonucu, 96. saat sonunda elde edilen proteinlerin farklı çözücülerde çözünmesi ile yapılan analiz sonucu.

4.5. Rekombinant hBD-2'nin Antimikrobiyal Aktivitesinin belirlenmesi

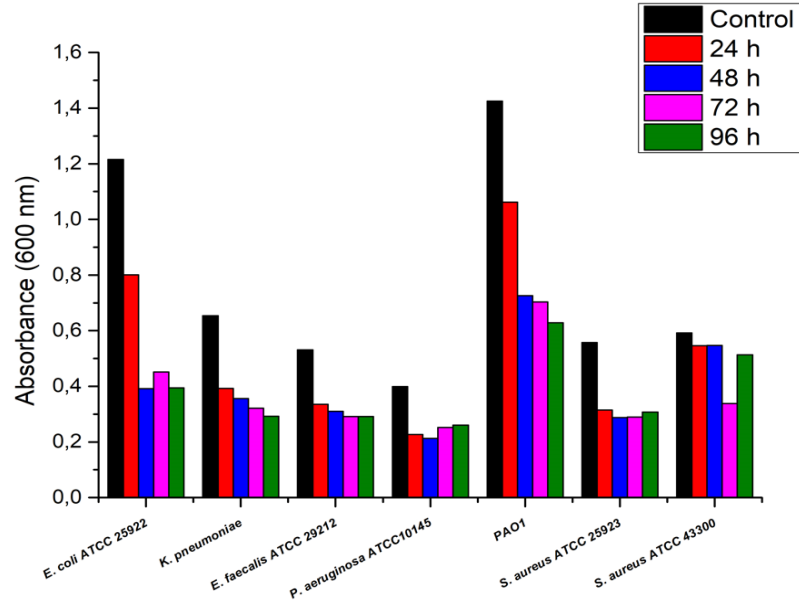
Tez çalışmasında üretilen hBD-2 peptidinin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon ve mikrolıquid testi ile belirlenmiştir. Test edilen rekombinant peptidler test edilen Gram-pozitif ve negatif bakterilerinde zon oluşturmuştur. Agar difüzyon sonuçları Şekil 4.15'de verilmiştir.



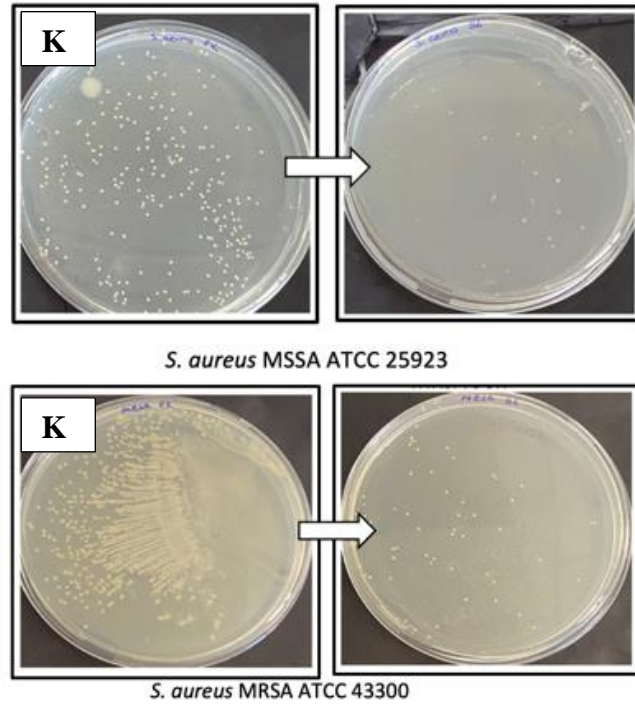
Şekil 4.15. Agar difüzyon testi ile metanol oranının belirlenmesi. (a) *P. aeruginosa*, (b) Klinik *K. pneumoniae* Oxa-48 pozitif izolat, c. *A. baumannii* (d) *S. aureus* MRSA. Oklar zonları göstermektedir.

Sonuçlarımızda %2'lik metanol indüklemesinde zon oluşumu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, fonksiyonel olarak aktif hBD-2 üretimi olduğu desteklenmektedir.

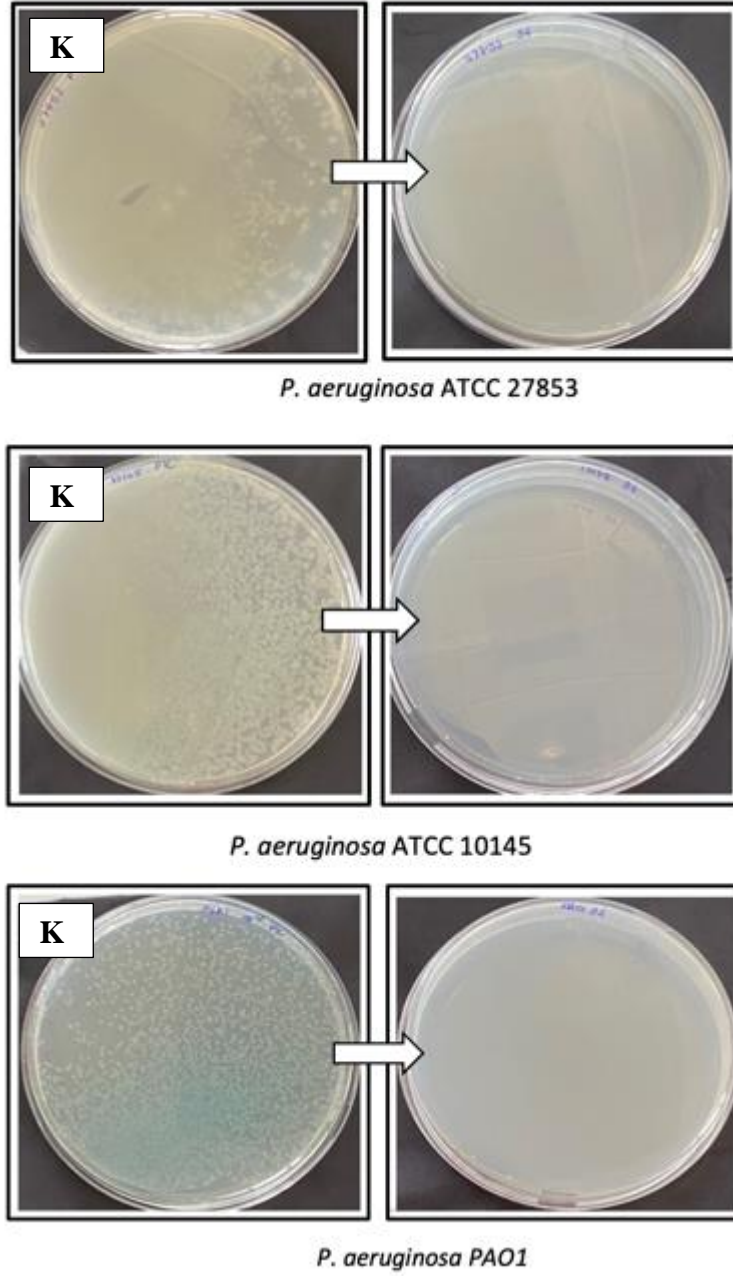
Mikro-sıvı bakteri koloni belirleme testine göre, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde toplanan %2 metanol uygulamasına ait rekombinant kültür filtratları çeşitli patojen suşlarla muamele edilmiş ve 24. saat sonra bakterilerin gelişimlerine ait sonuçlar OD₆₀₀ nm'de ölçüm alınarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. Mikro-sıvı bakteri koloni belirleme testinde rekombinant hBD-2'nin 24 saat sonra bakteri gelişimi üzerine etkileri. OD_{600 nm}'de ölçüm alınmıştır. Kontrol olarak BMMY besiyeri kullanılmıştır.



Şekil 4.17. hBD-2 genini içeren rekombinant *P. pastoris* kültür filtratının Mikro-sıvı bakteri koloni belirleme testinde *S. aureus* ATCC 25923 ve ATCC 43300 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivenin belirlenmesi (**K**: Kontrol).



Şekil 4.18. hBD-2 genini içeren rekombinant *P. pastoris* kültür filtratının *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesi (**K**: Kontrol).

Sonuç olarak, %2 metanol uygulanmış rekombinant *P. pastoris* hücrelerinin 96. saatlik kültür filtratları antibakteriyel aktivite göstermiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

AMP'lerin doğal kaynaklardan büyük ölçekte üretilmesi endüstriyel açıdan elverişli değildir. Ayrıca, doğal proteinlerin üretimi çevresel şartlarda meydana gelen küçük değişimlerden dahi etkilenmektedir. Günümüzde, kısa zincirli AMP moleküllerinin üretimi kimyasal sentez yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Ancak, kimyasal sentez yöntemi terapötik kullanım için maliyetli bir yöntemdir. 1 mg AMP' nin aminoasit çeşidine ve modifikasyonuna göre 100-1.000 \$ arasında maliyeti bulunmaktadır (Cao et al. 2018). Bununla birlikte, kimyasal sentez, bir veya daha fazla disülfid köprüsü ve 10'dan fazla amino asit uzunluğuna sahip peptitler için elverişli değildir (Cao et al. 2018). Öte yandan, rekombinant DNA teknolojisi, genetik mühendisliği tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte, endüstriyel ve tıbbi ürünlerin üretilmesinde sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Bu tez çalışmasında, *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak insan kaynaklı hBD-2 antimikrobiyal peptidinin fonksiyonel olarak aktif bir şekilde rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında,

- FaDu hücrelerinden indükleme yöntemi ile hBD-2 peptidinin PCR yöntemi ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.
- hBD-2 geninin pGEM-T Easy vektörüne alt klonlaması yapılmış ve dizi doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından, pPICZ α A vektörüne klonlanması tamamlanmış ve tasarlanan konstrüksiyon elde edilmiştir.
- Elde edilen konstrüksiyon *P. pastoris* X-33 hücrelerine elektroporasyon yolu ile aktarılmış ve pozitif koloniler tespit edilmiştir.
- Seçilen pozitif örnekten, farklı konsantrasyonlarda metanol indüklemesi yapılarak, en iyi metanol konsantrasyonu tespit edilmiştir.
- hBD-2'nin üretiminin doğruluğu, qRT-PCR, SDS-PAGE ve Western Blotlama yöntemleri ile kontrol edilmiştir.
- Üretilen hBD-2'nin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon ve mikrosivri bakteriyel koloni gösterimi yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İleriki çalışmalar için önerilerimiz ise şu şekildedir. hBD-2'nin fermentör yardımıyla büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilebilir, his-tag afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılıp stabilite testleri yapılabilir, sinerjik etki gösterebilen AMP molekülleri ile füzyon protein şeklinde üretilmesi gerçekleştirilebilir, diğer AMP ve antibiyotiklerle sinerjistik etkileşimleri incelenebilir ve kombinasyonel tedavi yaklaşımlarına kullanılabilir.

Sonuç olarak, rekombinant olarak üretilen hBD-2'nin fonksiyonel olduğu ve *P. aeruginosa* (PAO1, ATCC10145, ATCC27853), *S. aureus* (MRSA ATCC43300, MSSA ATCC25923), *K. pneumoniae* (klinik Oxa-48 pozitif izolat) ve *A. baumannie* (ATCC1605) suşlarına karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., Gudmundsson, G. H. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9), 3086-3093.
- Albrethsen, J., Bøgebo, R., Gammeltoft, S., Olsen, J., Winther, B., Raskov, H. 2005. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer*, 5(1), 1-10.
- Albrethsen, J., Møller, C. H., Olsen, J., Raskov, H., Gammeltoft, S. 2006. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 42(17), 3057-3064.
- Andersen, J. H., Jenssen, H., Sandvik, K. Gutteberg, T. J. 2004. Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *Journal of Medical Virology*, 74(2), 262-271.
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S. Mayr, L. M. 2013. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 393-402.
- Balls, A., Hale, W., Harris, T. 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 19(19), 279-288.
- Bechinger, B. 2005. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: a ³¹P solid-state NMR spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1712(1), 101-108.
- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I., Fridkin, M. 1990. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Letters*, 274(1-2), 151-155.
- Bolintineanu, D. S., Vivcharuk, V., Kaznessis, Y. N. 2012. Multiscale models of the antimicrobial peptide protegrin-1 on gram-negative bacteria membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11000-11011.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray P. B., Tack, J. B. F. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 465-478.
- Brondyk, W. H. 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in Enzymology*, 463, 131-147.

- Cabiaux, V., Agerberths, B., Johansson, J., Homblé, F., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M. 1994. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro⁺ Arg-rich antibacterial peptide. *European Journal of Biochemistry*, 224(3), 1019-1027.
- Capik, O., Sanli, F., Kurt, A., Ceylan, O., Suer, I., Kaya, M., Ittmann, M., Karatas, O F. 2021. CASC11 promotes aggressiveness of prostate cancer cells through mir-145/IGF1R axis prostate cancer. *Prostatic Disaeses*, 24(3), 891-902.
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.
- Cerovsky, V., Zdarek, J., Fucik, V., Monincova, L., Voburka, Z., Bem, R. 2010. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 455-466.
- Chen, F. Y., Lee, M T., Huang, H W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophysical Journal*, 84(6), 3751-3758.
- Chen, H., Zhinan, X., Peilin, C. 2005. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *Journal of Biotechnology*, 115(3), 307-315.
- Chen, H., Zhinan, X., Peilin, C. 2006. High-level expression of human beta-defensin-2 gene with rare codons in *E. coli* cell-free system. *Protein and Peptide Letters*, (2), 155-629.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L, Shi, J., Higgins, D. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23–52.
- Cunliffe, R., Mahida, Y. 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(1), 49-58.
- Date, Y., Nakazato, M., Shiomi, K., Toshimori, H., Kangawa, K., Matsuo, H., Matsukura, S. 1994. Localization of human neutrophil peptide (HNP) and its messenger RNA in neutrophil series. *Annals of Hematology*, 69(2), 73-77.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., Gasser, B. 2013. The secretory pathway: exploring yeast diversity. *Fems Microbiology Reviews*, 37, 872–914.
- Dubos, J., Cattaneo, C. 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus III. preeparation and activity of a protein-free fraction by ren. *Products From The Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research*, 70(3), 249-256.
- Dubos, R. J., Hotchkiss, R. D. 1941. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. *Journal of Experimental Medicine*, 73, 629–640.

- Ehrenstein, G., Lecar, H. 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10, 1–34.
- Fickers, P. 2014. *Pichia pastoris*: A workhorse for recombinant protein production, *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2, 354–363
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226.
- Fleming, A., Allison, V. D. 1922. Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. *British Journal of Experimental Pathology*, 3, 252–260.
- Fleming, A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap A Biology Character*, 93(653), 306–317.
- Fox, R. O., Richards, F. M. 1982. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å Resolution. *Nature*, 300, 325–330.
- Garcia, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F. J., Kluver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong, B. A., Bals, R., Forssmann, W. G. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB Journal*, 15, 1819–1821.
- García, L. B., Lee, P. H., Yamasaki, K., Gallo, R. L. 2005. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 108–115.
- Garcia, L. C., Ortiz, E., Castañeda, D. J., R S., Bruno, Corzo, G. 2013. Corzobacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 89(1), 33-43.
- Groves, M. L., Peterson, R. F., Kiddy, C. A. 1965. Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature*, 207(5000), 1007-1008.
- Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., Salcedo, R. 1996. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry*, 238(2), 325–332.
- Hancock, R. E. W. 2000. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(8), 1723-1729.
- Hancock, R. E. W., Sahl, H. 2006. Antimicrobial and host-defence peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24, 1551–1557.
- Harder, J., Bartels, J. Christophers, E., Schröder, J M. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861.

- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M. 1999. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 5707–5713
- Heffner, K. M., Wang, Q., Hizal, D. B., Can, Ö., Betenbaugh, M. J. 2018. Glyco engineering of mammalian expression systems on a cellular level. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 175, 37-69.
- Hegde, R. S., Bernstein, H. D. 2006. The surprising complexity of signal sequences, *Trends in Biochemical Sciences*, 31, 563–571.
- Hirsch, J. G. 2004. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 103, 585-589.
- Holbrook, I. B., Molan, P. C. 1973. A further study of the factors enhancing glycolysis in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 18(10), 1275–1282.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H. 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*, 2559.
- Idris, M., Banu, S., Siva, A. B., Nagaraj, R. 2020. Downregulation of defensin genes in Sars-cov-2 infection. *Medrxiv*.
- Jago, W., Jago, W. 1926. Toxic action of wheat flour to brewer's yeast, in industrial fermentations. *The Chemical Catering Company*, 128 –167.
- Jenssen, H., Andersen, J. H., Uhlin-Hansen, L., Gutteberg, T.J., Rekdal, Ø. 2004. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Research*, 61, 101–109.
- Kavanagh, K., Dowd, S. 2004. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *Journal of Pharmacology*, 56, 3, 285-289.
- Kim, J., Yang, Y., Lin, J., Jang, S. H., Jang, Y. S. 2018. Human β -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity. *Journal of Virology*, 15, 124.
- Kołodziejek, M., Joniec, J., Bartoszcze, M., Mirski, T., Gryko, R. 2011. Peptides a new strategy for combating viral infections. *Przegląd Epidemiologiczny*, 477–482.
- Krause, A., Neitz, S., MaGert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K. 2000. LEAP-1, A novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480(2–3), 147–50.
- Lai, Y., Gallo, R. L. 2009. Amped up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30, 131–141.
- Lamb, H. M., Wiseman, L. R. 1998. Pexiganan acetate. *Drugs*, 56, 1047–1052.

- Lee, D. G., Kim, P. I., Park, Y. K., Woo, E. R., Choi, J. S., Choi, C. H., Hahm, K. S. 2002. Design of novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on pmap-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 231–238.
- Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., VagvöLgyi, C., Kredics, L. 2007. The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 1027–1051.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F, Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., Chen, C., Lewis, K. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-459.
- Lipsky, B. A., Holroyd, K. J., Zasloff, M. 2008. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 1537–1545.
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., Huang, H. W. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35, 13723–13728.
- Mangoni, M. L., McDermott, A. M., Zasloff, M. 2016. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology*, 25(3), 167-173.
- Marchini, G., Lindow, S., Brismar, H., Ståbi, B., Berggren, V., Ulfgren, A., Lonne-Rahm, S., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H. 2002. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *British Journal of Dermatology*, 147(6), 1127–1234.
- Matsuzaki, K., Mitani, Y., Akada, K Y., Murase, O., Yoneyama, S., Zasloff, M., Miyajima, K. 1998. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLA. *Biochemistry*, 37, 15144–15153.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35(35), 11361-11368.
- Mcnamara, N. A., Van, R., Tuchin, O. S., Fleiszig, S. M. 1999. Ocular surface epithelia express mRNA for human beta defensin-2. *Experimental Eye Research*, 69(5), 483-490.
- Mecke, A., Lee, D. K., Ramamoorthy, A., Orr, B. G., Holl, M. M. B. 2005. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 89(6), 4043-4050.

- Melle, C., Ernst, G., Schimmel, B., Bleul, A., Thieme, H., Kaufmann, R., Mothes, H., Settmacher, U., Claussen, U., Halbhuber, K. J., Eggeling, F. V. 2005. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 129, 66–73.
- Mihajlovic, M., Lazaridis, T. 2010. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(8), 1485–1493.
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., And Davidson, D., J. 2020. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332.
- Mulder, K., Lima, L. A., Miranda, V., Dias, S. C., Franco, O. L. 2013. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontier Microbiology*, 4, 321.
- Nittayananta, W., Kemapunmanus, M., Amornthatree, K., Talungchit, S., Sriplung, H. 2013. Oral human β -defensin 2 in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 42, 53–60.
- Okumura, K., Itoh, A., Isogai, E., Hirose, K., Hosokawa, Y., Abiko, Y., Shibata, T., Hirata, M., Isogai, H. 2004. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS- H1 cells. *Cancer Letters*, 212(2), 185–94.
- Oudhoff, M. J., Blaauboer, M. E., Nazmi, K., Scheres, N., Bolscher, J. G., Veerman, E. C. 2010. The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 391, 541–548.
- Paquette, D. W., Waters, G. S., Stefanidou, V. L., Lawrence, H. P., Friden, P. M., O'Connor, S. M, Sperati, J. D., Oppenheim, F. G., Hutchens, L. H., Williams, R. C. 1997. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical salivary histatins. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(4), 216-22.
- Park, Y., Jang, S. H., Lee, D. G., Hahm, K. S. 2004. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Peptide Science*, 10, 304–311.
- Patil, A., Cai, Y., Sang, Y., Blecha, F., Zhang, G. 2005. Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiological Genomics*, 23, 5–17.
- Patil, A., Hughes, A., Zhang, G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiological Genomics*, 20, 1–11.

- Patro, S., Maiti, S., Panda, S. K., Dey, N. 2015. Utilization of plant-derived recombinant human β -defensins (hbd-1 and hbd-2) for averting Salmonellosis. *Transgenic Research*, 24(2), 353-364.
- Pavlou, A. K., Reichert, J. M. 2004. Recombinant protein therapeutics success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1513–1519.
- Pena S. V., Krensky A. M. 1997. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Seminars in Immunopathology*, 9, 117–25.
- Peng, L., Zhinan, X., Xiangming, F., Fang, W., Sheng, Y., Peilin, C. 2004. Preferential codons enhancing the expression level of human beta defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein & Peptide Letters*, 11(4), 339-344.
- Peng, L. A., Zhinan, X. A., Xiangming, F. B., Fang, W. A., Peilin, C. 2004. High-level expression of soluble human beta-defensin-2 in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, (39), 2199–2205.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., Mattanovich, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31(3), 245-260.
- Portela, R. M. T., Vogl, C., Kniely, J. E., Fischer, R. O., Glieder, A. 2017. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synthetic Biology*, 6, 471–484.
- Pouny, Y., Shai, Y. 1992. Interaction of d-amino acid incorporated analogues of pardaxin with membranes. *Biochemistry*, 31, 9482–9490.
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., Gasser, B., Vadis, Q. 2015. The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2925–2938.
- Radek, K., Gallo, R. 2007. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Seminars in Immunopathology*, 29, 27–43.
- Rodriguez J. F. J., Krause, A., Schulz, S., Forssmann, W. G., Conejo-Garcia, J. R., Schreeb, R., Motzkus, D. 2003. Distribution of new human β -defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, 81(2), 175-183.
- Ruth, C., Zuellig, T., Mellitzer, A., Weis, R., Looser, V., Kovar, K., Glieder, A. 2010. Variable production windows for porcine trypsinogen employing synthetic inducible promoter variants in *Pichia pastoris*. *Systems and Synthetic Biology*, 4, 181–191.
- Schauber, J., Gallo, R. L. 2008. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, 261–266.

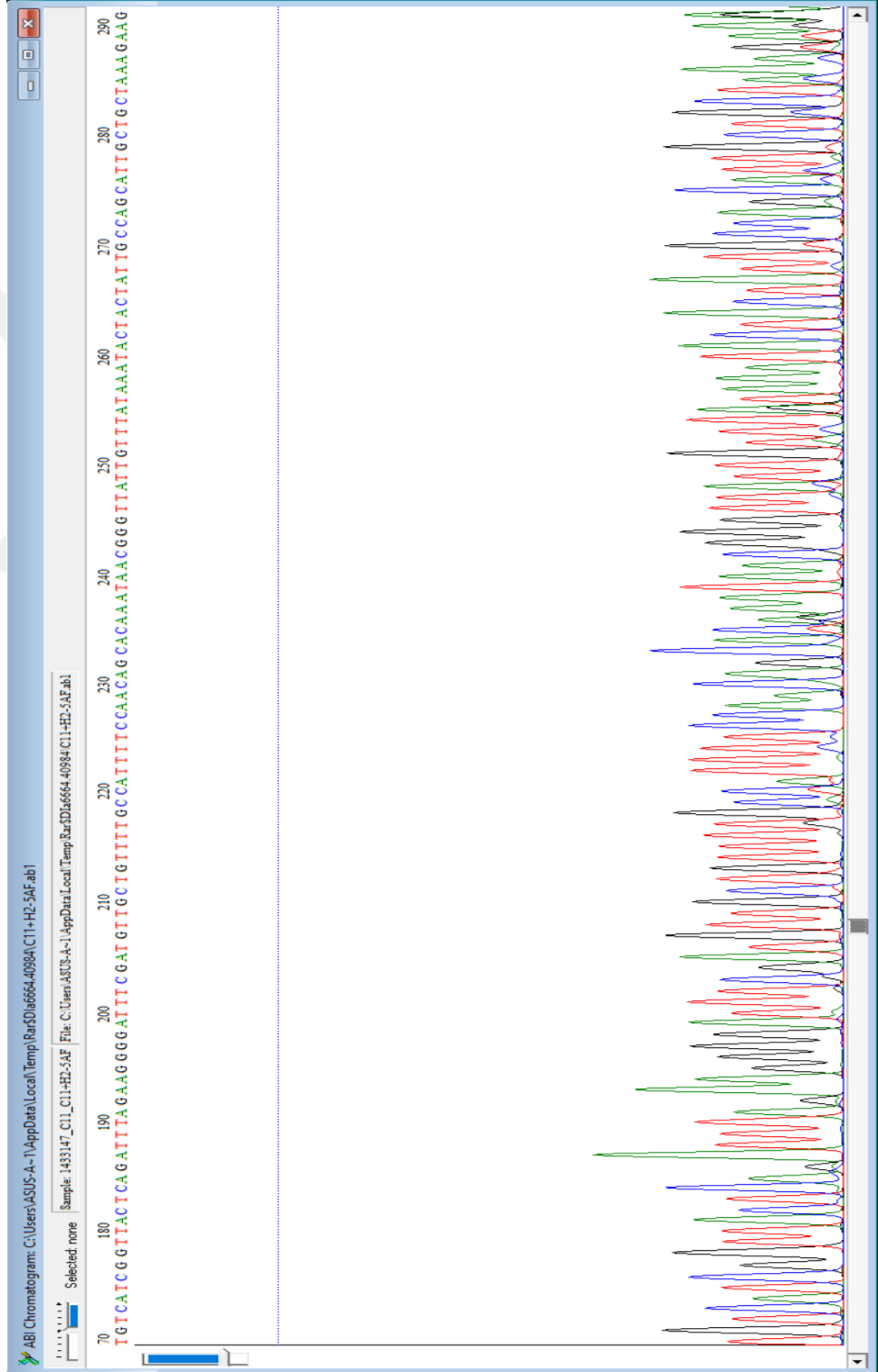
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C. 2001. Dermcidin: novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12), 1133–1137.
- Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D., Zasloff, M. A. 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science*, 267, 1645-1648.
- Schröder, J. M., Harder, J. 1999. Human beta-defensin-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(6), 645-651.
- Schultz, H., Weiss, J. P. 2007. The Bactericidal permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica Chimica Acta*, 384(1-2), 12-23.
- Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L., McCray, P. B. 2002. Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 99(4), 2129-2133.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T., W., Cregg, J. M. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 216, 93–102.
- Shuster, J. R. 1991. Gene expression in yeast: protein secretion, current opinion in Biotechnology, specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246–248.
- Smet, K. D., Contreras, R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, 27(18), 1337-1347.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Boman, H. G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292 (5820), 246-248.
- Sugiarto, H., Yu, P. L. 2004. Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, 721–727.
- Tagliabue, A., Rappuoli, R. 2018. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top. *Frontiers in Immunology*, 9, 1068.
- Tran, A. M., Nguyen, T. T., Nguyen, C. T., Huynh-Thi, X. M., Nguyen, C. T., Trinh, M. T., Tran, L. T., Cartwright, S. P., Bill, R. M., Tran-Van, H. 2017. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Research Notes*, 10(1), 1-8.
- Vidal, M. F., Jayasinghe, S., Ladokhin, A. S., White, H. S. 2007. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *Journal of Molecular Biology*, 370(3), 459-470.

- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W., Speight, R. 2018. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1,84(6).
- Wang, G. 2017. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7, 545–594.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z. 2009. The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37, 933–937.
- Wang, H., Dong, B., Zhou, Y. 2009. Antimicrobial activities of the culture supernatant of 293 cells transfected with recombinant hbd-2 gene eukaryotic expressive plasmid. *Medical Journal of Medicine*, 26(2), 371-373.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Seelig, J. 2000. Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. *Biophysical Chemistry*, 85(2-3), 187-198.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., Macdonald, D. L., Bienert, M. 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, 36, 6124–6132.
- Wittmann, C. 2017. Industrial microorganisms: *Pichia pastoris*. *Industrial Biotechnology*, 1, 687–714.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R E. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38, 7235–7242.
- Xuan, Y., Zhou, X., Zhang, W., Zhang, X., Song, Z., Zhang, Y. 2009. An upstream activation sequence controls the expression of AOX1 gene in *Pichia pastoris*. *Fems Yeast Research*, 9 ,1271–1282.
- Yang, D., Biragyn A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., Penheim, J. J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology*, 22, 181–215.
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J, Chertov, O. 2000. LL-37, The neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 192, 1069–1074.
- Yang, Z., Zhang, Z. 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A Review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 182–195.

- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347.
- Yount, N. Y., Yeaman, M. R. 2012. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), 337–360.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin isolation, characterization of 2 active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 84, 5449–5453.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389–395.
- Zelezetsky, I., Pacor, S., Pag, U., Papo, N., Shai, Y., Sahl, H. G., Tossi, A. 2005. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. *Biochemical Journal*, 390, 177–188.
- Zeya, H. I., Spitznagel, J. K. 1963. Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science*, 142(3595), 1085–1087.
- Zhang, Y. M., Rock, C. O. 2009. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50, 115–119.
- Zhong, Z., Zhinan X., Li, P., Lei, H., Fang, X., Centandem, P. 2006. Repeat mhBD2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 661-667.

EKLER

EK-1 hBD-2'nin Sekans Sonuçlarına ait Bioedit programı Analiz Görüntüsü



EK-2 hBD-2'nin Sekans Sonuçlarına ait Bioedit programı Analiz Görüntüsü

Rekombinant Suşun Sekans Sonuçları

>1433147_C11_C11+H2-5AF

TTTGACTTTTACGAAACCACTTGGGAAAGGAACAAAAACAACCTAATTATT
CGAAACGATGAGATTTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCT
CCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGTCACAA
ATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAA
TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAA
AAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGGTATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAA
GAGTGGAGCCATATGTCATCCAGTCTTTTGCCCTAGAAGGTATAAACAATT
GGCACCTGTGGTCTCCCTGGAACAAAATGCTGCAAAAAGCCATCTAGAACA
AAAATCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCA
TCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGG
CACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAA
TGCCCATTTGCAATTG