



***Medicago sativa*'NIN SAZOVA ÇEŞİDİNDEN
ANTİMİKROBİYAL BİR PEPTİDİN TANIMLANMASI
VE BİTKİ GELİŞİM SÜRECİNDEKİ
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra ALBAYRAK TURGUT

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: İsmail BEZİRGANOĞLU**

2024

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

***Medicago sativa*'NİN SAZOVA ÇEŞİDİNDEN ANTİMİKROBİYAL BİR
PEPTİDİN TANIMLANMASI VE BİTKİ GELİŞİM SÜRECİNDEKİ
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra ALBAYRAK TURGUT

Tez Danışmanı: İsmail BEZİRGANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2024

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.

05 / 02 / 2024

İmzası

Büşra ALBAYRAK TURGUT

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***Medicago sativa*'nın SAZOVA ÇEŞİDİNDEN ANTİMİKROBİYAL BİR PEPTİDİN TANIMLANMASI VE BİTKİ GELİŞİM SÜRECİNDEKİ EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra ALBAYRAK TURGUT

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Son yıllarda antibiyotik direncinin artması, antifungal olarak kullanılan tarım ilaçlarına karşı gelişen zararlı bitki ve fungusit dirençleri ve bu ilaçların insan sağlığına olan etkileri yeni antimikrobiyal ajanların keşfini zorunlu kılmıştır. Yeni antimikrobiyal ajanlar olarak antimikrobiyal peptitler (AMP) stabil yapıları ve memeli hücrelerine toksik özellik göstermemeleriyle ön plana çıkmaktadır. Özellikle bitki tohumlarının birçok AMP içerdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında *M. sativa* Sazova çeşidinden ısıya dayanıklı yeni bir AMP tanımlanarak bu AMP'nin karakterizasyonunu yapmak amaçlanmıştır. Bunun için Sazova tohumlarından peptitler (10 kDa $\geq$) elde edilmiştir. Elde edilen peptitler için disk difüzyon, jel kapama ve mikrodilüsyon testleri yapılarak antimikrobiyal bir peptit içerdiği tespit edilmiştir. Daha sonra jel kapama testinde inhibisyon zonu veren aralıktaki peptit bandı LC-MS/MS ile molekül ağırlığı 5,2048 kDa olan hipotetik peptit olan *M. sativa* Defensin 2.1 olduğu belirlenmiştir. Bu Defensinin Sazova çeşidindeki Defensin 2.1'in gen sekansı Sanger yöntemi ile elde edilerek aminoasit sekansına çevrilmiştir. UniProt Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 sekansları arasında 3 farklı amino asit farklılığı olduğu belirlenmiştir. Sazova Defensin 2.1'in fizyokimyasal özellikleri (Expast ProtParam), sekonder (PROCHECK) ve tersiyer (SwissModel, Phyre2 ve PRISPED) yapısı *in silico* araçlarla tahmin edilerek yeni bir AMP karakterize edilmiştir.

2024, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Medicago sativa*, Antimikrobiyal peptit, Biyoinformatik, LC-MS/MS, Defensin

ABSTRACT

Ph.D

An ANTIMICROBIAL PEPTIDE IDENTIFICATION FROM *Medicago sativa* SAZOVA CULTIVAR AND EVALUATION OF ITS GENE EXPRESSION

Büşra ALBAYRAK TURGUT

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

Supervisor: Assoc. Prof. İsmail BEZİRGANOĞLU

In recent years, it is necessary to discovery of new antimicrobial agents because of the increase in antibiotic resistance, the development of herbicide and fungicide resistance, and the harmful effects of these drugs on human health. As new antimicrobial agents, antimicrobial peptides (AMP) stand out with their stable structure and non-toxicity to mammalian cells. It is known that plant seeds, in particular, contain many AMPs. In this thesis study, it was aimed to identify a new thermostable AMP from the *M. sativa* Sazova cultivar and to characterize this AMP. For this purpose, peptides (10 kDa $\geq$) were obtained from Sazova seeds. Disc diffusion, gel overlay assay and microdilution tests were performed for the resulting peptides and it was determined that they contained an antimicrobial peptide. Then, the peptide band in the range that gave the inhibition zone in the gel overlay assay was determined by LC-MS/MS as *M. sativa* Defensin 2.1, which is a hypothetical peptide with a molecular weight of 5.2048 kDa. Then, to determine the gene and amino acid sequences of the Sazova cultivar Defensin 2.1, the sequences were obtained by cloning into the pGEMT-easy vector and using the Sanger method. It was determined that there are 3 different amino acid differences between the UniProt Defensin 2.1 and Sazova Defensin 2.1 sequences. A new AMP was characterized by predicting the physiochemical properties (Expast ProtParam), secondary (PROCHECK) and tertiary (SwissModel, Phyre2 and PRISPREP) structure of Sazova Defensin 2.1 with *in silico* tools.

2024, 80 page

Keywords: *Medicago sativa*, Antimicrobial peptide, Bioinformatics, LC-MS/MS, Defensin

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca danışmanım olan ve yardımını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU'na ve tez süreci boyunca bilgileriyle yönlendiren Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI ve Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a,

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, sabrı ve anlayışıyla destek olan Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye,

Doktora sürecinde her ihtiyacım olduğunda yanımda olan en büyük motivasyon kaynağım ve hayat arkadaşım Güven TURGUT'a

Her zaman beni destekleyen canım aileme teşekkür ederim.

Büşra ALBAYRAK TURGUT

Şubat, 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Peptitler.....	1
1.2. AMP'lerin Sınıflandırılması.....	1
1.2.1. Bitki AMP'leri.....	2
1.2.1.1. Thioninler	3
1.2.1.2. Bitki defensinleri	4
1.2.1.3. Hevein benzeri peptitler	5
1.2.1.4. α -Hairpin ailesi.....	5
1.2.1.5. Knottin tipi peptitler.....	6
1.2.1.6. Cyclotit ailesi	7
1.2.1.7. Snakinler	7
1.2.1.8. Lipit transfer peptitleri	8
1.3. AMP'lerin Etki Mekanizmaları.....	8
1.3.1. Halı mekanizması.....	9
1.3.2. Toroidal por oluşumu	10
1.3.3. Fıçı por oluşumu	10
1.3.4. Düzensiz toroidal por oluşumu	10
1.3.5. Hücre membran lipitleri dışındaki hedefler	10
1.4. AMP'lerin Bitki Savunmasındaki Görevleri.....	11
1.5. AMP'lerin Potansiyel Uygulama Alanları	12
1.5.1. AMP'lerin biyoteknolojideki uygulamaları	13
1.5.2. Antimikrobiyal ajanlar olarak AMP'lerin uygulamaları.....	14
1.6. <i>Medicago sativa</i>	14
1.6.1. <i>M. sativa</i> 'dan izole edilen AMP'ler	15
1.7. Tez Çalışmasının Önemi	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24

3.1. Materyal	24
3.1.1. Bitki ve patojen mikroorganizmalar.....	24
3.2. Yöntem.....	28
3.2.2. Bradford testi.....	29
3.2.3. SDS-PAGE.....	29
3.2.4. LC-MS/MS.....	30
3.2.5. Disk difüzyon testi	31
3.2.6. Jel kapama testi	31
3.2.7. Mikrodilüsyon testi	32
3.2.8. <i>M. sativa</i> Defensin 2.1 gen ekspresyonu.....	32
3.2.8.1. Bitki doku kültürü	32
3.2.8.2. RNA izolasyonu	32
3.2.8.3. cDNA sentezi	33
3.2.8.4. qPCR	33
3.2.9. Defensin 2.1 geninin klonlanması ve gen analizi.....	34
3.2.9.1. DNA izolasyonu.....	34
3.2.9.2. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu).....	34
3.2.9.3. Gen klonlama	35
3.2.9.4. Plazmit izolasyonu	35
3.2.9.5. Sekans analizi.....	36
3.2.9.5. Biyoinformatik analizler	36
3.2.10. İstatistiksel analizler.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	38
4.1. Antimikrobiyal Peptit İzolasyonu ve Moleküler Kütlesinin Belirlenmesi.....	38
4.2. Antimikrobiyal Özelliklerin Belirlenmesi.....	42
4.2.1. Disk difüzyon testi	42
4.2.2. Jel kapama testi	44
4.2.3. Mikrodilüsyon testi	46
4.3. <i>M. sativa</i> Defensin 2.1 gen ekspresyonu.....	50
4.4. <i>M. sativa</i> Defensin 2.1 Gen Analizi	53
4.5. Biyoinformatik Analizler	56
4.5.1. Fizyokimyasal özellikler	56
4.5.2. Tripsin kesimi karşılaştırma.....	59
4.5.3. Sekonder yapı.....	60

4.5.4. Tersiyer yapı.....	63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	68
EKLER.....	80
EK 1 LC-MS/MS sonucunda elde edilen kromatogram	80



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
Da	Dalton
g	Gram
g	Gram
kDa	Kilodalton
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

AMP	Antimikrobiyal peptit
ADP	Antimicrobiyal Peptit Veritabanı
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
Cys	Sistein
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksirübonükleik asit
ESI/MS	Elektrosprey iyonizasyon/ kütle spektroskopisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
LB	Luria Broth
LBA	Luria Broth Agar
LC	Sıvı Kromatografisi
LTP	Lipit transfer proteini
MS/MS	Ardışık kütle spektroskopisi

NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optik Dansite
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. AMP'lerin izole edildiği kaynağa göre sınıflandırılması	2
Şekil 1.2. Farklı thioninlerin içerdiği amino asit dizileri (Tam et al. 2015)	3
Şekil 1.3. Bitki defansinlerine ait sistein kalıntıları (x=herhangi bir aminoasit, G= glisin, E=glutamik asit) (Kovaleva et al. 2020).....	4
Şekil 1.4. Hevein-benzeri peptitlerin A) ikincil yapıdaki sarmal- β 1- β 2-sarmal- β 3 motifi ve B) <i>Eucommia ulmoides</i> 'ten izole edilmiş bir hevein-benzeri bir AMP olan EAFP2'nin üç boyutlu yapısı (Tam et al. 2015).....	5
Şekil 1.5. α -Hairpin ailesinin ikincil yapısında bulunan A) heliks-ilmek-heliks motifi ve B) <i>Echinochloa crus-gali</i> tohumlarından izole edilen Ec-AMP1 ve <i>Luffa aegyptiaca</i> 'dan izole edilen α -Hairpin ailesinden iki AMP'nin 3 boyutlu yapısı (Tam et al. 2015).....	6
Şekil 1.6. Knottin tipi peptitlerin alttakımların A, B) ikincil yapılarındaki farklılıklar ve sisteinler arasındaki disülfüt köprülerinin gösterimi (Tam et al. 2015)	6
Şekil 1.7. Cyclotit ailesinin A) ikincil yapısı, halkasal yapısını oluşturan N- ve C- uçlarını birleştiren bağın ve B) 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi (Tam et al. 2015)	7
Şekil 1.8. Snakinlerin içerdiği sistein dizileri ve disülfid köprülerinin gösterimi (Tam et al. 2015).....	8
Şekil 1.9. LTP'lerin A) alt sınıflarının ikincil yapıları ve B) bu alt sınıflara ait iki peptidin üç boyutlu yapılarının şematik gösterimi (Tam et al. 2015)	8
Şekil 1.10. AMP'lerin hücre membranına etki mekanizmaları. a) fiçı por mekanizması, b) düzensiz toroidal por oluşum mekanizması, c) halı mekanizması, d) toroidal por mekanizması (Liv et al. 2021)	9
Şekil 1.11. Farklı sinyal molekülleri ile AMP'ler sentezlenebilir veya AMP'ler sinyal molekülü olarak görev yapabilir. (PRR: pattern recognizing receptor, NO: nitrojen oksit, ROS: reaktif oksijen türleri, MAPK: mitojenle etkileşen protein kinaz) (Campos et al. 2018)	12
Şekil 1.12. Alfalfa bitkisinin gövde ve çiçeklerinin görünümü	15
Şekil 1.13. MsDef1 ve MtDef4 peptitlerinin dizi karşılaştırması (Sagaram et al. 2011).....	16
Şekil 1.14. MsDef1'in 3 boyutlu yapısı (pembe→ α -dönüş ve turuncu→ γ -dönüş) (Sagaram et al. 2011).....	17
Şekil 1.15. Uniprot veri tabanından alınan MsSN1'in 3 boyutlu yapısı.....	18

Şekil 4.1. Tohumlardan protein ekstraksiyonu sonrası elde edilen jel görüntüsü (1 diyaliz öncesi, 2 ve 3 diyaliz sonrası elde edilen peptitlerin yüklendiği kuyulardır.)	38
Şekil 4.2. SDS-PAGE jelinden kesilen bant örneği	39
Şekil 4.3. qPCR analiz sonucunda hesaplanan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri	41
Şekil 4.4. Defensin 2.1'in amino asit dizisi (A) ve varsayımsal üç boyutlu yapısı (B)..	41
Şekil 4.5. <i>S. aureus</i> disk difüzyon test sonucu.....	43
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> disk difüzyon test sonucu	43
Şekil 4.8. <i>S. aureus</i> jel kapama testi sonucu	45
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> jel kapama testi sonucu	45
Şekil 4.10. <i>C. albicans</i> jel kapama testi sonucu.....	46
Şekil 4.11. 24 saat sonra mikrodilüsyon testi sonuçları.....	47
Şekil 4.12. 48 saat sonra mikrodilüsyon testi sonuçları.....	48
Şekil 4.13. Pozitif kontrol olan streptomisin ve nystatinin 24 saat sonunda patojenler üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.14. Pozitif kontrol olan streptomisin ve nystatinin 48 saat sonunda patojenler üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.15. <i>M. sativa</i> Sazova çeşidinin 21 günlük gelişimi	51
Şekil 4.17. NCBI veri tabanında bulunan <i>M. sativa</i> Defensin 2.1 kodlanan sekans ve Sazova çeşidindeki sekans karşılaştırması	53
Şekil 4.19. Sazova Defensin 2.1 ile benzer olan AMP'lerin sekans karşılaştırması	54
Şekil 4.20. Sazova Defensin 2.1 ve <i>P. sativum</i> defensin-1 disülfid köprüleri.....	55
Şekil 4.21. Taksonların evrimsel ilişkileri. Evrimsel tarih, Komşu Birleştirme yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır [1]. Evrimsel mesafeler Poisson düzeltme yöntemi [2] kullanılarak hesaplanmıştır ve birimi bölge başına düşen farklı amino asit sayısıdır. Bu analiz 6 amino asit dizisini içeriyordu. Her dizi çifti için tüm belirsiz konumlar kaldırılmıştır (çift yönlü silme seçeneği). Nihai veri setinde toplam 47 pozisyon vardı. Analizler evrimsel MEGA11'de yapılmıştır [3]...	56
Şekil 4.22. Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot defensin 2.1 (B) tripsin kesim noktaları	60
Şekil 4.23. PROCHECK çevrimiçi aracıyla elde edilen Sazova Defensin 2.1'in tahmini sekonder yapısı (A), <i>P. sativum</i> defensin-1 sekonder yapısı (B) ve Uniprot Defensin 2.1 sekonder yapısı.....	61

Şekil 4.24. PROCHECK çevrimiçi aracıyla elde edilen Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot Defensin 2.1 (B) Ramachandran grafiği	62
Şekil 4.25. Sazova Defensin 2.1 AMP'sinin tahmini tersiyer yapısı.....	63
Şekil 4.27. <i>M. sativa</i> Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot Defensin 2.1 (B) arasındaki amino asit farklılıklarının tersiyer yapıdaki gösterimi	65



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	24
Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeler.....	27
Çizelge 3.3. SDS-PAGE (%15) jel içeriği.....	30
Çizelge 4.1. Protein ve peptit konsantrasyonları	39
Çizelge 4.1. LC-MS/MS sonucunda dizi benzerliği gösteren peptitler	40



1. GİRİŞ

Antimikrobiyal peptitler (AMP) ilk defa Alexander Fleming tarafından 1922 tarihinde Lizozim enzimini ve ardından 1928'de Nisin antibakteriyel peptidinin keşfedilmesiyle birlikte enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu tarihten sonra, çeşitli canlılardan birçok AMP keşfedilmiştir. Patojenlerle mücadelede antibiyotiklerin ve tarım ilaçlarının yanlış kullanımı, mutasyonlar ve yatay gen transferi gibi nedenlerle bu ilaçlara dirençlerin oluşmasıyla birlikte günümüzde yeni AMP'lerin keşfedilmesi patojenlerle mücadelede önem kazanmıştır.

1.1. Antimikrobiyal Peptitler

AMP'ler mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda üretilen, doğuştan gelen bağışıklığın parçası olan bir biyomolekül grubudur (Somma et al. 2020). AMP'ler 5 ila 100 arasında aminoasit içeren oligopeptitlerdir. Bu peptitler, patojenlere (virüs, bakteri ve fungi) karşı savunmanın ilk hattını oluştururlar. Bazı AMP'ler belirli hücrelerde sürekli olarak üretilirken, bazıları ise bir uyarana cevap olarak üretilirler (Bahar and Ren 2013). AMP'ler çoğunlukla patojenlere karşı etkili olsalar da kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösteren AMP'ler de bulunmaktadır. AMP'ler büyük oranda katyonik özelliktedirler ancak omurgalılarda, omurgasızlarda ve bitkilerde anyonik AMP'ler keşfedilmiştir (Somma et al. 2020).

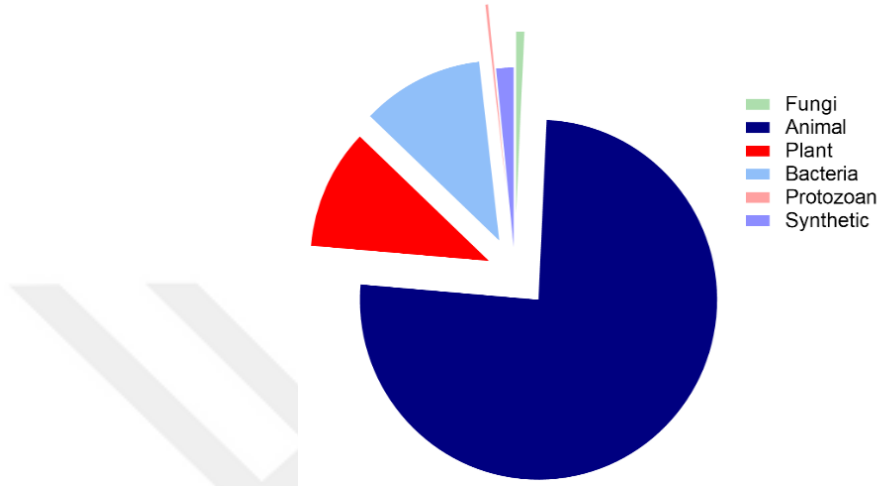
1.2. AMP'lerin Sınıflandırılması

Antimikrobiyal Peptit Veritabanında (ADP, <https://aps.unmc.edu/>), AMP'ler hedefledikleri canlılara, etki mekanizmalarına, içerdikleri amino asit özelliklerine ve üretildikleri canlı kaynaklarına göre sınıflandırılabilirler.

AMP'ler hedefledikleri canlılara göre antibakteriyel, antifungal, antiviral, insektisidal ve antiparazital olarak isimlendirilirler. Etki mekanizmalarına göre hücre yüzeyini hedefleyen ve hücre içi hedefleri olan peptitler olarak ikiye ayrılırlar. AMP'lerin içerdikleri amino asit kompozisyonu temel alındığında ise amino asit kompozisyonuna, peptidin yüküne, hidrofobisitesine ve uzunluğuna göre alt sınıflara ayrılabilir. Peptidin

1. GİRİŞ

yüküne göre katyonik (%88), anyonik (%6) veya nötral (%6) olabilirler; hidrofobisitelerine göre ise hidrofilik, hidrofobik veya amfipatik olarak ayrılırlar. Ayrıca, AMP'ler amino asit kompozisyonuna göre glisince zengin, histidince zengin, sisteince zengin ve prolince zengin vb. olarak tanımlanırlar (Decker et al. 2022).



Şekil 1.1. AMP'lerin izole edildiği kaynağa göre sınıflandırılması

Diğer yandan, izole edildikleri canlılara göre de isimlendirilirler. Bunlar; bakteriyel AMP'ler (bakteriosinler), fungal AMP'ler, bitki AMP'leri ve hayvan AMP'leridir (Şekil 1).

1.2.1. Bitki AMP'leri

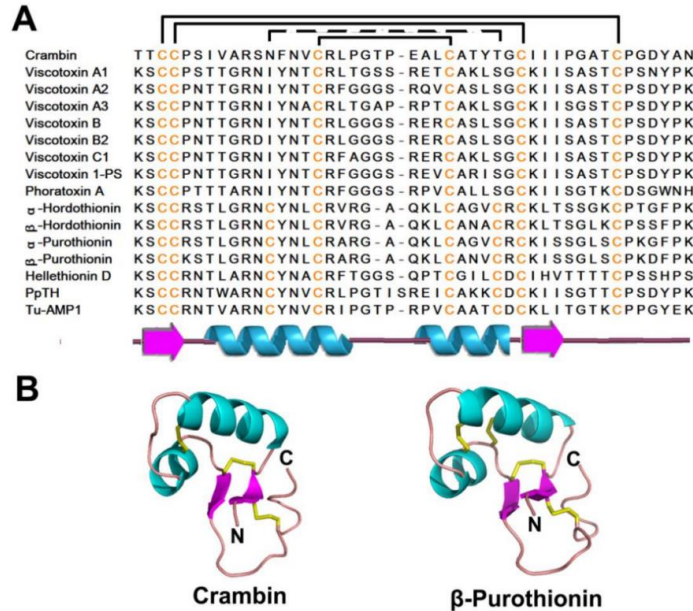
Bitki AMP'lerinin çoğu disülfid bağları oluşturan 4-12 arasında sistein amino asidine sahip olup sisteince zengin proteinler olarak da adlandırılırlar. Bitki savunma sistemine dahil olan bu peptitler farklı yapısal organizasyonlara sahip olup bu sayede antimikrobiyal, antiviral, antitümör, antiproleratif, mitojenik veya insektisidal olmak üzere geniş biyolojik aktiviteler gösterirler. Bitki AMP'leri içerdikleri sisteinler ve sisteinlerin oluşturduğu korunmuş dizi örüntüleri ile defensinler, thioninler, cyclotitler, knottinler hevein-benzeri peptitler ve snakinler olmak üzere sınıflandırılırlar. Sisteince zengin bu moleküller tohum çimlenmesinden başlayarak yenilenen organların korunmasına kadar bitki gelişiminin her aşamasında üretilirler ve hücre içi hedeflere etki edebilir veya katyonik yapılarından dolayı hücre membranını hedef alabilirler (Goyal et al. 2014; Dubovski et al. 2011).

1. GİRİŞ

Bitki AMP'leri sistein aminoasitleri arasında disülfid bağları oluşturmaları sayesinde oldukça kararlı moleküller olup içerdikleri disülfid bağ sayıları bu kararlılığın seviyesini belirler; sonuçta onlara termal, kimyasal, enzimatik ve yapısal değişikliklere karşı dayanıklılık kazandırır (Gao et al. 2001; Tang et al. 2018). Bitki AMP'lerinin en önemli özellikleri ise moleküllere spesifik olmalarından dolayı çoğu defensin ve bitki AMP'sinin memeli hücrelerine ve bitkilerin kendilerine toksik özellik göstermemeleridir (Finkina et al. 2018).

1.2.1.1. Thioninler

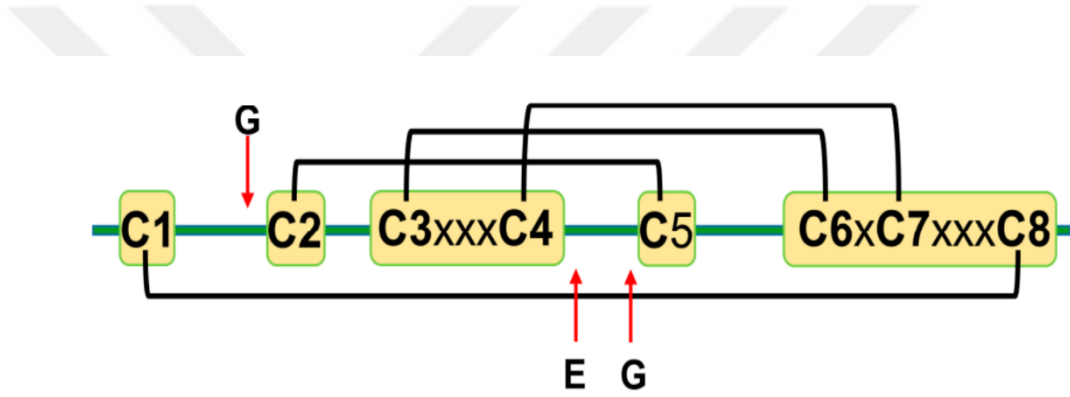
Thioninler buğday tohumlarından izole edilen ilk sistein içeren bitki AMP sınıfıdır (Hughes et al. 2000). Purothionin ise buğday ve arpa tohumlarından ekstrakte edilen ilk thionindir (Redman and Fisher 1969). Thioninler 45-48 amino asit (~5 kDa) ve 6 veya 8 sistein içeren AMP'lerdir (Iqbal et al. 2019). Thioninler bakteri, fungi ve böceklerle karşı inhibisyon etkisi gösterirler. İçerdikleri sistein sayısına göre 3 veya 4 disülfid köprüsü kurulur. Thioninler amino asit dizilerini diğer AMP'lere göre daha çok korumuşlardır (Şekil 1.2) (Tam et al. 2015). Ayrıca ikincil yapılarında gamma (Γ) katlanmasını oluşturan β 1- α 1- α 2- β 2-koil korunmuş motifi de ortaktır.



Şekil 1.2. Farklı thioninlerin içerdikleri amino asit dizileri (Tam et al. 2015)

1.2.1.2. Bitki defensinleri

Bitki defensinleri, farklı biyolojik aktivitelere (antifungal, antibakteriyel ve α -amilaz inhibitörü) sahip, 45 ila 54 arasında amino asit içeren peptitlerdir (Iqbal et al. 2019). Bitki defensinleri, korunmuş olarak 8 sistein içerirler; bu sisteinler arasında ise dört disülfid köprüsü kurulur. Sistein amino asitleri kalıntısı bitki defensinlerinde korunmuştur (Şekil 1.3). Bitki defensinleri üç boyutlu yapılarında 3 antiparalel β -tabaka ve bu β -tabakalara paralel olan 1 tane α -heliks içerirler ve ikincil yapılarında karakteristik olarak sisteinlerin stabilize ettiği $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) motifine sahiptirler (Li et al. 2021). Bundan dolayı bitki defensinleri yüksek sıcaklıkta (~85 °C), düşük pH'da ve oksidatif ortamda stabildir.

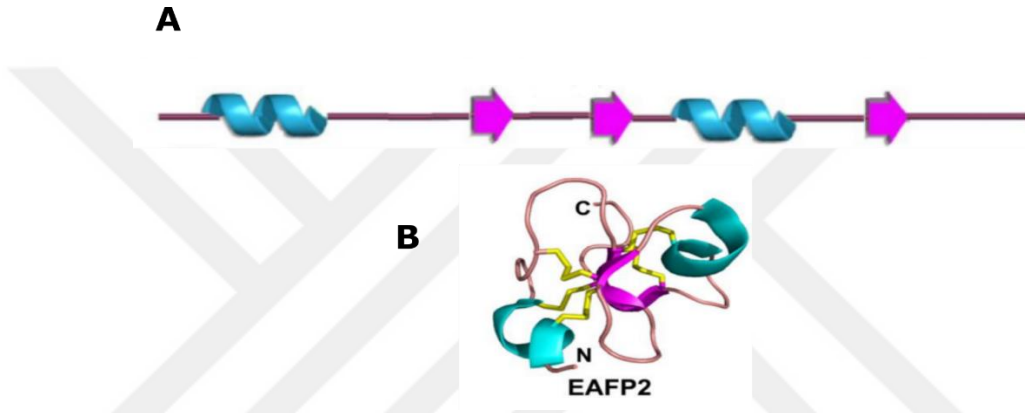


Şekil 1.3. Bitki defensinlerine ait sistein kalıntıları (x=herhangi bir aminoasit, G= glisin, E=glutamik asit) (Kovaleva et al. 2020).

Defensinler bitkilerin yaprak, kök, gövde ve tohum gibi farklı doku ve organlarında sentezlenirler ama en çok tohumlarda bulunurlar ve böylece patojenlere karşı savunmalarını artırmış olurlar (Iqbal et al. 2019; Kovaleva et al. 2020). Aynı zamanda tohumlar, ksilem ve yaprakların stomata hücrelerinin hücreler arası boşluğunda ve hücre duvarlarında bulunurlar; köklerin, çiçek ve meyvelerin dış yüzeylerinde devamlı olarak bulunurlar. (Kovaleva et al. 2020). Aynı zamanda defensinlerinin bitkilerin kuraklık, soğuk ve tuzluluk gibi abiyotik stres faktörlerine maruz kaldıklarında ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Lay and Anderson 2005; Carvalho and Gomes 2011; Kerenga et al. 2019; Turgut and Bezirganoğlu 2022).

1.2.1.3. Hevein benzeri peptitler

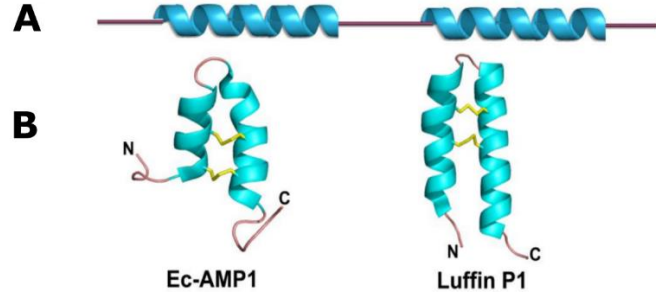
Hevein benzeri peptitler 29 ila 45 amino aside sahip, 6, 8 veya 10 sistein içeren ve sisteinler arasında 3-5 arasında disülfid bağı oluşturabilen bazik peptitlerdir (Li et al. 2021). Bu peptitler, hevein domainlerinde korunmuş sırada çok sayıda glisin ve bazı aromatik grup içeren amino asitler barındırırlar (Tam et al. 2015). Hevein domainleri ise spesifik olarak kitine bağlanır. İkincil yapılarında, $\beta 3$ ve iki uzun sarmalda bulunan kısa dönüşlerin varlığına bağlı olarak değişiklik gösteren sarmal- $\beta 1$ - $\beta 2$ -sarmal- $\beta 3$ motifleri vardır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Hevein-benzeri peptitlerin **A)** ikincil yapıdaki sarmal- $\beta 1$ - $\beta 2$ -sarmal- $\beta 3$ motifi ve **B)** *Eucommia ulmoides*'ten izole edilmiş bir hevein-benzeri bir AMP olan EAFF2'nin üç boyutlu yapısı (Tam et al. 2015).

1.2.1.4. α -Hairpin ailesi

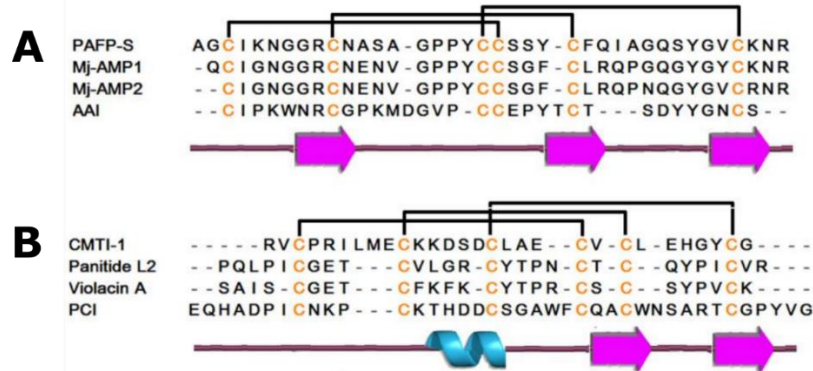
α -Hairpin ailesi korunmuş sisteinler dışında lizin/arjinin yönünden zengin savunma peptitleridir. İçerdikleri sistein motifinde helikslerin antiparalel olduğu, edilmiş karakteristik bir heliks-ilmek-heliks ikincil yapı oluşturur (Şekil 1.5); tersiyer yapıda ise bu motif iki disülfid köprüsü tarafından stabilize edilmiş haldedir (Sousa et al. 2016; Slavokhotova and Rogozhin 2020). Bu AMP ailesi, antimikrobiyal, tripsin inaktive edici ve ribozom inaktive edici aktivitelere sahiptir (Tam et al. 2015).



Şekil 1.5. α-Hairpin ailesinin ikincil yapısında bulunan A) heliks-ilmek-heliks motifi ve B) *Echinochloa crus-gali* tohumlarından izole edilen Ec-AMP1 ve *Luffa aegyptiaca*'dan izole edilen α-Hairpin ailesinden iki AMP'nin 3 boyutlu yapısı (Tam et al. 2015).

1.2.1.5. Knottin tipi peptitler

Knottin tipi peptitler, yaklaşık 30 amino asit içeren en kısa bitki AMP'leridir. Bu AMP'ler enzim inhibitörü (α-amilaz, tripsin ve carboksi-peptidaz), insektisidal, anti-HIV, sitotoksik etki ve antimikrobiyal aktivite gibi farklı biyolojik aktivite gösterirler (Le Nguyen et al. 1990; Pallagy et al. 1994; Aboye et al. 2015). Biyolojik aktivite dışında, bitki gelişiminde, abiyotik strese karşı veya sinyal molekülü olarak da aktivite gösterirler (Li et al. 2021).

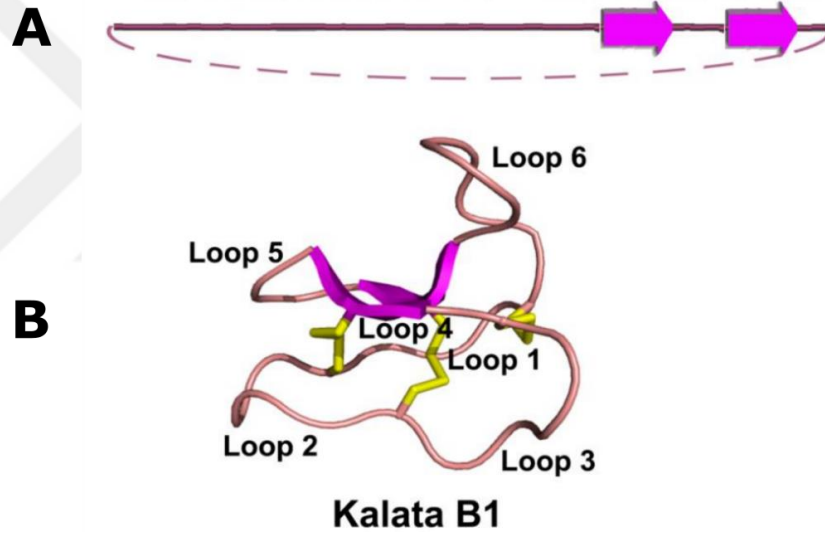


Şekil 1.6. Knottin tipi peptitlerin alttakımların A, B) ikincil yapılarındaki farklılıklar ve sisteinler arasındaki disülfüt köprülerinin gösterimi (Tam et al. 2015).

Bu AMP'ler, tipik olarak 6 sistein aminoasit kalıntısı ve bu sisteinler arasında oluşan korunmuş disülfüt köprüleri (CysI-CysIV, CysII-CysV ve CysIII-CysVI) oluştururlar (Şekil 1.6A) (Tam et al. 2015). Bu disülfüt köprülerinin varlığı bir sistein ilmeği oluşmasına neden olur ve sistein motifleri farklı alttakımlarda değişiklik gösterir (Şekil 1.6).

1.2.1.6. Cyclotit ailesi

Cyclotitler halkasal omurgaya sahip olan ve 28-37 aminoasit içeren AMP'lerdir. Bu AMP'ler düğümlü bir yapı halinde düzenlenmiş 6 sistein kalıntısı ve çapraz bağlı 3 disülfid köprüsüyle stabilize edilmiş halkasal bir omurga oluştururlar (Şekil 1.7A) (Craik 2009; Pranting et al. 2010). Aynı zamanda, sistein içeren bu ilmek siklik sistein ilmeği olarak da bilinir. Siklik sistein ilmeği bu AMP ailesine sıcaklığa, kimyasallara ve proteolitik degradasyona karşı direnç kazandırır (Metha et al. 2020). Cyclotitler üç boyutlu yapılarında 6 farklı döngü bölgesi içerirler (Şekil 1.7B), peptid omurgasının 5. döngü bölgesinde cis-prolin varlığına göre iki alt sınıfa ayrılır: Möbius ve kelepçe (bracelet) (Tam et al. 2015; Pinto et al. 2012). Cyclotitler antibakteriyel, anti-HIV, insektisidal veya anti-tümör özellikte olabilirler (Iqbal et al. 2019).



Şekil 1.7. Cyclotit ailesinin A) ikincil yapısı, halkasal yapısını oluşturan N- ve C- uçlarını birleştiren bağın ve B) 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi (Tam et al. 2015).

1.2.1.7. Snakinler

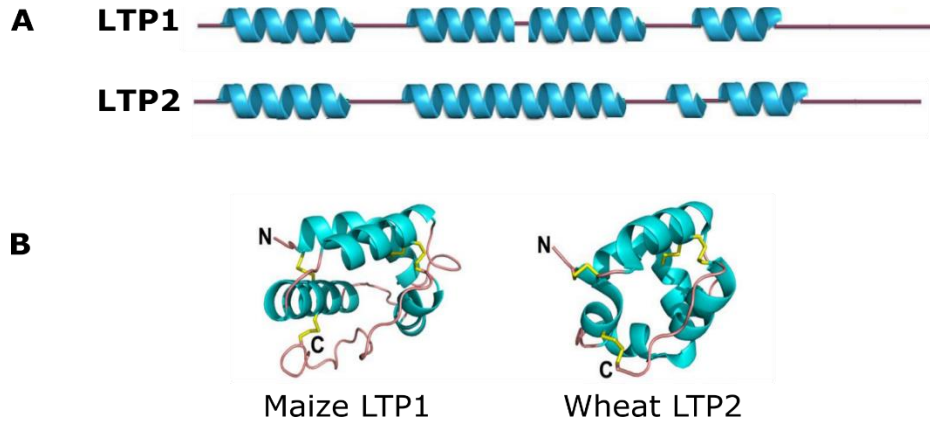
Snakinler 12 sistein amino asidi içeren bitki AMP'leri içerisinde en çok disülfid köprüsüne sahip AMP sınıfıdır (Şekil 1.8). İlk snakin peptidi patates yumrularından (*Solanum tuberosum*) elde edilen snakin-1 (StSN1) (Segura et al. 1999). Bu AMP'ler yaklaşık olarak 66 amino aside sahiptirler ve çeşitli bitki dokularında biyotik veya abiyotik stres faktörlerine karşı eksprese edilirler (Li et al. 2021; Turgut and Bezirganoğlu 2022).



Şekil 1.8. Snakinlerin içerdiği sistein dizileri ve disülfid köprülerinin gösterimi (Tam et al. 2015).

1.2.1.8. Lipit transfer peptitleri

Lipit transfer proteinleri (LTP'ler) sekiz sistein amino asidi içeren katyonik AMP'lerdir. Bu AMP'ler lipit transfer aktivitelerinden dolayı diğer AMP sınıflarından ayrılırlar ve yağ asitleri, fosfolipitler, açıl-koenzim A ve prostaglandin B2 gibi lipitlere bağlanabilirler (Yeats and Rose 2008). Bu özelliklerinden dolayı spesifik olmayan LTP'ler olarak adlandırılırlar. Fungi ve bakterilerin gelişimlerini inhibe ederler. Moleküler kütlelerine göre LTP1 (MW = 9 kDa) ve LTP2 (MW = 7 kDa) olarak iki alt gruba ayrılırlar (Tam et al. 2015). LTP1 ve LTP2 tersiyer yapılarında aynı şekilde kurulmuş 4 disülfid köprüsiyle stabilize edilmiş 4 α -heliks içerirler ancak amino asit dizileri farklılık gösterir (Şekil 1.9A) (Douliez et al. 2001; Pons et al. 2003). Bu iki alt grubun da sahip olduğu α -heliksler lipitlere bağlanabilmelerini sağlayan hidrofobik bir oyuk oluşturlar (Şekil 1.9B) (Gomar et al. 1998; Han et al. 2001).



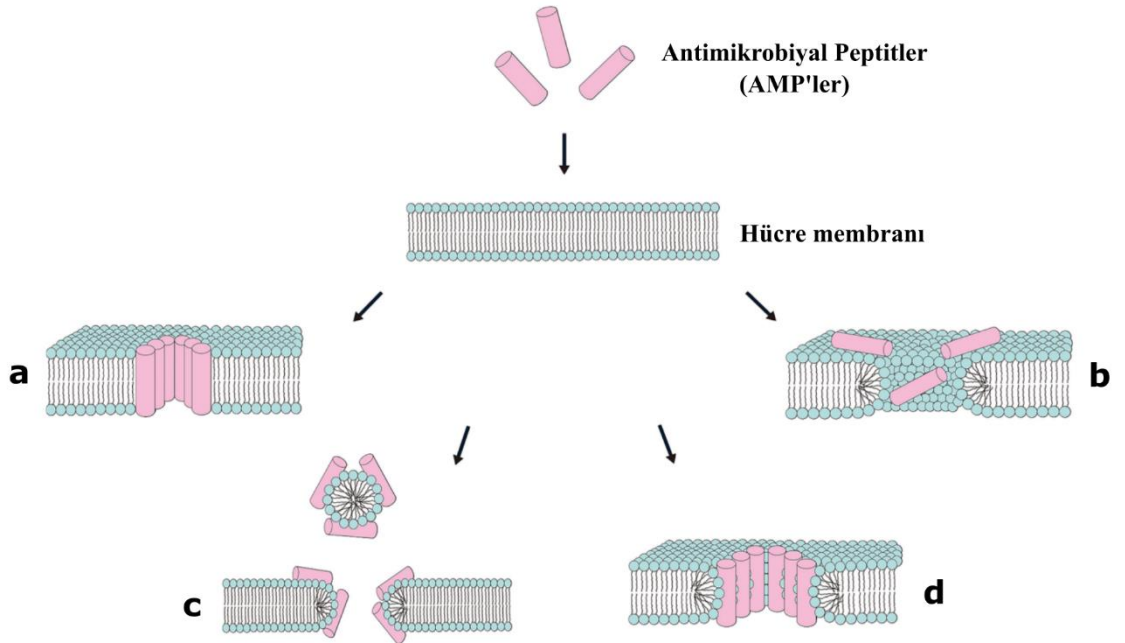
Şekil 1.9. LTP'lerin **A)** alt sınıflarının ikincil yapıları ve **B)** bu alt sınıflara ait iki peptidin üç boyutlu yapılarının şematik gösterimi (Tam et al. 2015).

1.3.AMP'lerin Etki Mekanizmaları

AMP'lerin antimikrobiyal etkileri genellikle hücre membranı ile olan etkileşim yeteneğine göre belirlenir. AMP'lerin etki mekanizmaları amino asit dizisi, büyüklük, net yük, hidrofobisite ve afinitesine bağlı olarak değişiklik gösterir (Bhattacharjya and

1. GİRİŞ

Ramamoorthy 2009). AMP'ler tripsin veya amilaz enzimlerinin inhibitörü olarak, hücre duvarında bulunan kitin gibi moleküllerle etkileşime girerek veya Ca^{2+} iyon kanallarına bağlanarak antimikrobiyal etki gösterebilirler (Koo et al. 2004; Sagaram et al. 2011; Iqbal et al. 2019); ancak çoğu AMP mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan fosfotidilserin ve kardiolipin gibi anyonik lipitlerle etkileşebilmek için katyonik özelliktedir (Chen et al. 2017). AMP'lerin hücre membranıyla olan etkileşimleri dört farklı model ile açıklanmaktadır. Bu modeller, halı mekanizması, toroidal por oluşumu, fiçî oluşum mekanizması ve düzensiz toroidal por oluşum mekanizmasıdır (Şekil 1.10) (Brogden 2005; Nguyen et al. 2011).



Şekil 1.10. AMP'lerin hücre membranına etki mekanizmaları. **a)** fiçî por mekanizması, **b)** düzensiz toroidal por oluşum mekanizması, **c)** halı mekanizması, **d)** toroidal por mekanizması (Liv et al. 2021).

1.3.1. Halı mekanizması

Bu modelde, peptitler hücre membranındaki fosfolipid tabakasının yüzeyinde paralel olacak şekilde toplanırlar. Yeterli miktarda peptit biriktikten sonra amfipatik peptitler membran lipitleri halkasal olarak sararlar ve bu da membranda çatlak oluşmasına neden olur (Järvå et al. 2018). Daha sonra, AMP'ler hücre içine doğru geçip lipit moleküllerinin etrafını çevreleyerek küçük parçalar halinde membrandan uzaklaştırılır

1. GİRİŞ

(Şekil 1.10c). Sonuçta halı mekanizmasında AMP'ler hücre içerisine girmeden hücre bütünlüğünü bozarlar (Li et al. 2021).

1.3.2. Toroidal por oluşumu

Toroidal por oluşumunda AMP'ler önce fosfolipit tabakasına tutunurlar ve sonrasında yapısal olarak dönüşerek membran içine nüfuz ederler. Bu mekanizmada AMP'lerle kaplı bir por oluşumu gerçekleşir (Şekil 1.10d) (Nguyen et al. 2011).

1.3.3. Fıçı por oluşumu

Fıçı por oluşum modelinde, peptitler öncelikle membrana tutunurlar ve bir bölgede yığınlar halinde birikirler. Membrana tutunan peptitlerin hidrofobik kısımları membran lipidlerinin hidrofobik bölgeleri ile etkileşip çift tabakalı membranın içinde dik ve fosfolipit tabakasına ise paralel bir şekilde yerleşerek gözenek oluştururlar (Şekil 1.10a) (Brogden 2005). Bazı AMP'ler por oluşumundan sonra hücre içine girerek hücre içi hedeflere bağlanabilirler (Travkova et al. 2017).

1.3.4. Düzensiz toroidal por oluşumu

Bu modelde ise, plazma zarı üzerinde rastgele bir gözenek oluştuktan sonra, lipidler içe doğru bükülür ve fosfolipit baş grupları tarafından düzenlenen gözenek boşlukları oluşur. Derine gömülmüş halde bulunan peptitler düz dairesel gözenekleri stabilize ederken geri kalan peptitler gözeneklerin dış kısımlarına tutunurlar ve zarın eğriliğini stabil hale getirirler (Şekil 1.10b) (Li et al. 2021).

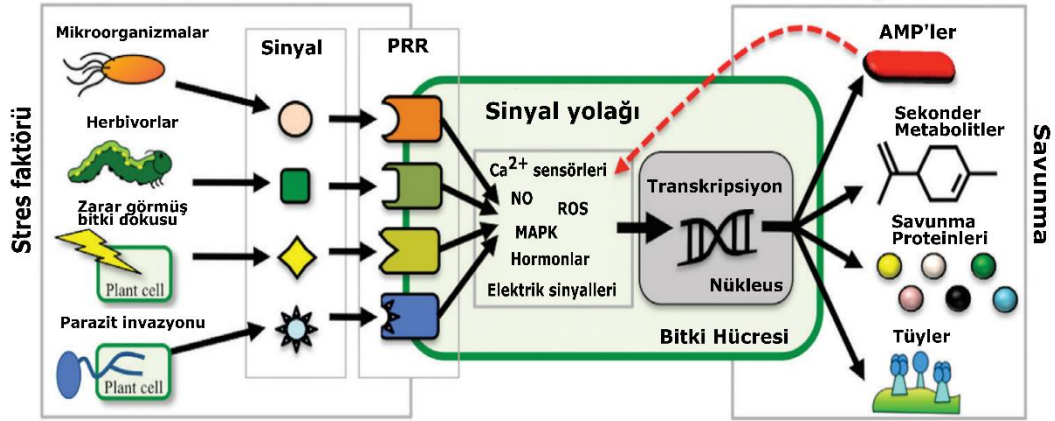
1.3.5. Hücre membran lipidleri dışındaki hedefler

AMP'ler hücre membranındaki lipidlerden başka hedeflere de bağlanarak inhibisyon veya öldürücü etki gösterebilirler. Hedef mikroorganizmadaki membran proteinlerine, nükleik asitlere, hücre duvarında bulunan kitin vb. moleküllere ve hücre içi proteinlere bağlanabilirler (Nguyen et al. 2011; Tam et al. 2015). Ayrıca, defensin grubu

AMP'ler hücre dışına salgılanan α -amilaz veya tripsin gibi proteolitik enzimleri inhibe ederek dolaylı yoldan mikroorganizma ve bitki zararlılarının ölümüne yol açabildikleri gibi iyon kanallarını etkileyebilir veya protein sentezini inhibe edebilirler (Finkina et al. 2018). Örneğin, *Medicago sativa* tohumundan izole edilen *MsDef1* defensini L-tipi Ca^{2+} kanallarını inhibe eder ve hif ucu oluşumunu engelleyerek hifsel dallanmayı teşvik eder (Sagaram et al. 2011). *Sorghum bicolor*'dan izole edilen SI α 1-3 defensini ise böceklerin salgıladığı α -amilaz enzimini inhibe ederken börülce bitkisinden izole edilen Cp-thionin tripsin enzimini inhibe eder (Bloch and Richardson 1991; Melo et al. 2002).

1.4. AMP'lerin Bitki Savunmasındaki Görevleri

Bitkiler de tüm canlılar gibi yaşam döngüleri süresince kuraklık, tuzluluk, düşük veya yüksek sıcaklık, böcekler ve patojen mikroorganizmalar gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kalırlar. Bu stres faktörlerine karşı bitkiler indüklenebilir veya sürekli aktif olan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Hücre duvarının kalınlaşması, hücre membranında lipid kompozisyonunun değişmesi, fitohormonların (jasmonik asit, salisilik asit, etilen, absisik asit, vb.) konsantrasyon artışı, sekonder metabolitlerin üretimi, oksijen ve nitrojenin aktif formlarının üretimi, savunma proteinlerinin ifadesi, hipersensitif tepki ve sistemik kazanılmış dayanıklılığın geliştirilmesi bitki savunma mekanizmasının parçalarıdır (Nürnberg et al. 2004). Patojenlerle enfekte olan bitkiler, çeşitli peptitlerin de içinde olduğu birçok protein sentezler ve bunlara patojenez ile ilgili (PR) proteinler denir. PR proteinleri patojenlerden gelen uyarıları alan veya bu uyarılara cevap olarak üretilen proteinlerdir. Bitkilerde patojenlere karşı üretilen savunma proteinleri farklı alt gruplara ayrılırlar: proteaz inhibitörleri, kitinazlar, glukanaazlar ve AMP'lerdir (Kazan ve Gürel 2001; Finkina et al. 2018). Bitki savunma sistemine dahil olan AMP'ler farklı yapısal organizasyonlara sahip olup bu sayede antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal), antiviral, antitümör, antiproleratif, mitojenik veya insektisidal olmak üzere geniş biyolojik aktiviteler gösterirler (Goyal et al. 2014).



Şekil 1.11. Farklı sinyal molekülleri ile AMP'ler sentezlenebilir veya AMP'ler sinyal molekülü olarak görev yapabilir. (PRR: patojen ilişkili reseptör, NO: nitrojen oksit, ROS: reaktif oksijen türleri, MAPK: mitojenle etkileşen protein kinaz) (Campos et al. 2018).

Bitki AMP'leri sürekli veya patojenlerden gelen sinyallere yanıt olarak üretilen küçük moleküler kütleli savunma proteinleridir (Sels et al. 2008). Sisteince zengin bu moleküller tohum çimlenmesinden başlayarak yenilenen organların korunmasına kadar bitki gelişiminin her aşamasında üretilirler, hücre içi hedeflere etki edebilir veya katyonik yapılarından dolayı hücre membranını hedef alabilirler (Goyal et al. 2014; Campos et al. 2018). Bitki hücreleri mikrobiyal atak, yaralanma veya parazitlerin invazyonu sonrasında çeşitli sinyal molekülleriyle (ROS, Ca^{2+} , hormones, vb.) AMP'lerin sentezini uyarılabilir (Şekil 1.11) (Lee et al. 2000; Tesfaye et al. 2013; Bolouri et al. 2016; Herbel et al. 2017; Turgut and Bezirganoğlu 2022). Ayrıca AMP'ler ROS ve NO birikimini önleyerek veya artırarak redoks mekanizmalarının düzenleyicileri olarak da görev yapabilirler (Aerts et al. 2007; Huang et al. 2008; Mello et al. 2011).

1.5. AMP'lerin Potansiyel Uygulama Alanları

Tüm canlılarda olduğu gibi bitkilerin de doğuştan gelen bağışıklıklarının bir parçası olarak ürettikleri, zararlılara karşı savunmanın ilk hattında bulunan ve geniş spektrumda zararlıya etki etmelerinden ve çoğunun sistin içeriğinden kaynaklanan farklı koşullara karşı dayanıklı olmalarından dolayı AMP'ler, çeşitli uygulama alanlarında kullanılma potansiyellerine sahiptirler. AMP'ler biyoteknolojik uygulamalarda, tıpta ve tarımda antimikrobiyal ajan olarak kullanılması antibiyotiklere veya tarım ilaçlarına

dirençli hale gelen mikroorganizmalara karşı savaşımızda yeni adaylar olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.5.1. AMP'lerin biyoteknolojideki uygulamaları

Bakterilerin antibiyotik direncine paralel bir şekilde tarım ilaçlarının yanlış kullanımı sonucunda da bitki patojenleri kullanılan ilaçlara veya antibiyotiklere karşı direnç kazanmışlardır (Birişik et al. 2018). AMP genlerinin ifade edildiği transgenik bitkiler AMP'lerin geniş biyotik aktiviteye sahip olmalarından dolayı farklı mikroorganizmalara karşı dirençli hale gelmişlerdir (Goyal et al. 2014). Örneğin, MsSN1 AMP'sini overexprese eden transgenik *Medicago sativa* hatlarında *Phytophthora medicaginis* CT1 ve *Colletotrichum trifolii* CT2 zararlı funguslarına karşı hastalık semptomlarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Garcia et al. 2014). Ayrıca, MsDef1 geni aktarılan transgenik tütün bitkilerinde *Pseudomonas syringe* pv *tabaci* ve *Ralstonia solanacearum* ve *Xanthomonas campestris* bakterilerine ve *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* ve *Pyricularia oryzae* funguslarına karşı etkiyi artırdığı belirlenmiştir (Deb et al. 2020). Benzer olarak, *Macademia integrifolia* tohumlarından izole edilmiş MiAMP1 geninin kanola bitkisinde ifade edilmesi sonucunda fungal patojen türü *Leptosphaeria maculans*'ın neden olduğu hastalığın etkilerini azaltmıştır (Kazan et al. 2002). Diğer bir örnek olarak, pirinç bitkisine aktarılan *Hyalophora cecropia*'dan izole edilmiş bir AMP geninin aktarılması ile *Magnaporthe grisea* fungal patojenine karşı direnç geliştirmiştir (Peters 2006).

Fitopatojenlere karşı daha dayanıklı ve bu patojenlerin direnç kazanmasını engellemek için tek bir AMP geninden ziyade iki farklı AMP geni bitkiye transforme edilebilir. *Rhapanus sativus*'tan (turp) elde edilen RsAFP2 ve *Dahlia merckii*'den elde edilen Dm-AMP1 genlerinin pirinç bitkisine aktarılması sonucunda tek bir genin aktarıldığı bitkilere göre çoklu gen aktarımı ile fungal patojenlere daha dayanıklı pirinç bitkileri elde edilmiştir (Jha and Chattoo 2009). Benzer olarak, dermaseptin (*Phyllomedusa sauvagii*'den), lizozim (*Gallus gallus*'tan) ve AP24 osmotin (*Nicotiana tabacum*'dan) aktarılan transgenik patates bitkisinin hatlarında *Erwinia carotovora* bakterisine ve *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* ve *Phytophthora infestans* funguslarına karşı yüksek direnç kazandırmıştır (Rivero et al. 2012).

1.5.2. Antimikrobiyal ajanlar olarak AMP'lerin uygulamaları

AMP'ler antiviral, antifungal, anti-mitojenik, anti-kanser ve anti-inflamatör gibi çeşitli terapötik aktiviteler gösterme potansiyeline sahip bağışıklık düzenleyicileridirler (Bakare et al. 2022). Konvansiyonel antibiyotiklerin bilinçsiz ve sık uygulamaları sonucunda bakterilerde gelişen direnç mekanizmaları ile başa çıkabilmek amacıyla AMP'ler yeni antimikrobiyal ajanlar olarak da öne çıkmaktadır. İlk tanımlanan AMP'lerden olan Nisin, belirli insan enfeksiyon hastalıklarında kullanılmaktadır. Methicillin antibiyotiğine dirençli olan *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vancomycin dirençli *enterococci* (VRE) klinik olarak tedavi edilmesinde Nisin kullanılarak tedavi edilebilmektedir (Shin et al. 2016). Nisin'den farklı olarak bazı AMP'lerin insan patojenlerine olan etkisi araştırılmaktadır. Örneğin, *Moringa oleifera*'dan izole edilen Mo-CBP₃ AMP'sinin sentetik varyasyonlarından Mo-CBP₃-PepIII memeli hücrelerine hiçbir toksik etki göstermeden *Staphylococcus aureas* bakterisine karşı etkili olmuştur (Olivera et al. 2019). Yine, *Lucillia sericata* ve *L. cuprina* larvalarından izole edilen lucifensin ve lucifensin II defensinleri sağlıklı veya diyabet ve kardiyovasküler bozuklukları olan hastalarda yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir (Li et al. 2016).

Yiyecek endüstrisinde gıda koruyucuları olarak da antibiyotikler veya farklı koruyucu maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin yerine biyoyumlu olan yeni antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç vardır ve bunun için en önemli adaylar ise AMP'lerdir. Çeşitli çalışmalar AMP'lerin gıda koruyucusu olarak kullanılma potansiyeli farklı AMP'ler (Nisin, Pleurocidin ve Cp-thioninII) ile denenmiş ve farklı mikroorganizmalara karşı etkili inhibisyon etkileri bildirilmiştir (Broughton et al. 1996; Wang et al. 2015; Shmidt et al. 2019).

1.6. *Medicago sativa*

Medicago sativa (alfalfa) “yemlerin kraliçesi” olarak da bilinen çok yıllık bir yem bitkisidir (Şekil 1.12). İlk olarak Asya kıtasında var olan bu bitki daha sonra Avrupa, Afrika ve dünyanın diğer bölgelerine yayılmıştır. Günümüzde ekim alanları hızla artmaktadır. *Alfalfa* Arapça'da “tüm bitkilerin babası” anlamına gelmektedir.



Şekil 1.12. Alfalfa bitkisinin gövde ve çiçeklerinin görünümü

Alfalfa içerdği yüksek protein miktarı, çeşitli sekonder metabolitler ve minerallerden dolayı dünyadaki en çok besleyici yemdir. Ayrıca klorofil, Ca^{+2} karoten ve vitamin K miktarı da yüksektir (Griffiths 1949; Suwignyo et al. 2020). Sekonder metabolit içeriğine bakıldığında ise as saponinler, steroller, flavonoidler, kumarinler, alkaloidler, vitaminler, amino asitler, şekerler gibi farklı biyoaktif moleküller üretirler. *Alfalfa* sekonder metabolitleri içerisinde saponinler kolesterol seviyesini düşürürler, özellikle LDL (low-density lipoproteins) düşürürler ama HDL (high-density lipoprotein) seviyesini artırır (Suwignyo et al. 2022). *Alfalfa* ile beslenen hayvanların etlerinde ve yumurtalarındaki kolesterolü düşürdükleri de bilinmektedir (Ponte et al. 2004; Suwignyo et al. 2022). Polifenol ve flavonoid içerikleri ise antioksidan özelliktedir ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) zararlarından bitkiyi korurlar.

Yüksek besin içerdği ve hem geniş getiren hem de diğer hayvanların et, süt ve yumurta içeriklerindeki besin değerini artırdığı için *alfalfa*, en besleyici ve en çok kullanılan yem bitkisidir. *Alfalfa* sıcak ve soğuk iklim koşullarına adapte olabilme özelliğinden dolayı da dünyada farklı tarım alanlarına ekilebilmektedir; tek bir sezonda birden fazla hasat alınabilmesi de diğer bir avantajıdır (Suwignyo et al. 2022).

1.6.1. *M. sativa*'dan izole edilen AMP'ler

Fabaceae (baklagiller) ailesine dahil olan ve insan diyetinin dışında kalan ancak yem bitkisi olarak yüksek besin değerinden dolayı en çok kullanılan yonca türlerinden de

1. GİRİŞ

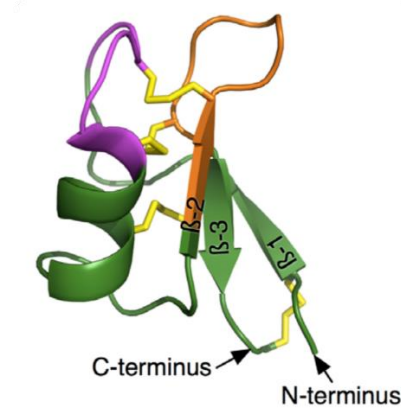
AMP'ler tanımlanmıştır. Özellikle model organizma olan ve genomlarının *alfalfa* ile büyük oranda benzer olan *Medicago truncatula*'dan MtDef2, MtDef4.2, MtDef5 ve MtDefMd1 defensinleri karakterize edilmiştir (Spelbrink et al. 2004; Kaur et al. 2012; İslam et al. 2017; Uhe et al. 2018). MtDef4.2 farklı *Fusarium* türlerine karşı 0,5-1,8 μM IC_{50} değerinde inhibisyon etkisi göstermiştir (Kaur et al. 2012).

Arabidopsis thaliana, pirinç, yonca (*M. sativa*) genomlarının yaklaşık olarak %3'ünün AMP kodladığı da bilinmektedir (Mergaert et al. 2003, Silverstein et al. 2005; Silverstein et al. 2007). Bu oran *M. sativa*'nın çok sayıda AMP içerdiğini göstermektedir ancak *Medicago sativa*'dan bugüne kadar sadece iki AMP tanımlanmıştır. Bu AMP'ler MsDef1 ve MsSN1 (*Medicago sativa* snakin-1) peptitleridir (Gao et al. 2000; Garcia et al. 2014). MsDef1 defensini *M. sativa*'dan karakterize edilmiş ilk AMP'dir ve bu defensin ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Gao et al. (2000) yaptığı çalışmada MsDef1 peptidi *M. sativa* tohumlarından ekstrakte edilmiştir.

MsDef1 45 amino asit içeren, molekül ağırlığı 5,483 kDa molekül ağırlığına sahip defensin grubunda bir peptittir (Gao et al. 2000). Bu peptit dizisinde 8 sistein amino asidi içermekte ve bu sisteinler arasında 4 disülfid bağı oluşturmaktadır (Sagaram et al. 2011). Peptidin ikincil yapısında α -sarmal ve β -tabakalar bulunur (Şekil 1.13 ve 1.14). Net yükü ise +3 olarak belirlenmiştir. Bu defensin 3 boyutlu yapısında α -dönüş ve γ -dönüş yapıları barındırır (Şekil 1.14).



Şekil 1.13. MsDef1 ve MtDef4 peptitlerinin dizi karşılaştırması (Sagaram et al. 2011)

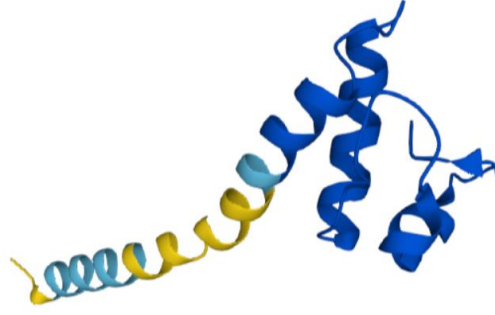


Şekil 1.14. MsDef1'in 3 boyutlu yapısı (pembe→ α -dönüş ve turuncu→ γ -dönüş) (Sagaram et al. 2011).

MsDef1 ve MtDef4 peptitleri korunmuş benzer dizilere sahiptirler, ama α -dönüş ve γ -dönüş dizileri birbirinden farklı aminoasitler içerirler (Şekil 1.13). Farklı dizilerinden dolayı aktivitelerinde değişiklikler vardır. Örneğin; fungal patojenlere karşı etki ettikleri IC_{50} değerleri birbirinden farklıdır; *F. graminearum* patojenine karşı MsDef1'in IC_{50} değeri 2-4 μM iken Mtdef4'ün IC_{50} değeri 0,75-1 μM 'dır.

MsDef1 geni patates bitkisine aktarıldıktan sonra *Verticillium dahliae* fitopatojenine karşı tam bir koruma sağlamıştır. Ayrıca in vitro'da ise *V. dahliae*'e karşı 15 μM konsantrasyonda inhibisyon etkisi oldukça yüksektir. Bir diğer çalışma ise MsDef1 *F. graminearum* ve *N. crassa* fitopatojenlerinin gelişimini sırasıyla 25 $\mu g/ml$ ve 2 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarda engelledikleri belirlenmiştir (Spelbrink et al. 2004).

MsSN1 ilk olarak *M. sativa* fidelerinin köklerinden tanılanmıştır (Garcia et al. 2014). MsSN1'in *Solanum tuberosum* (patates) yumrularından saflaştırılan StSN1 AMP'sine olan dizi benzerliği tanılanmasında yardımcı olmuştur. MsSN1 91 amino asit içeren ve 9,9 kDa moleküler kütleye sahip snakin ailesine ait bir AMP'dir. Üç boyutlu yapısında 3 α -sarmal içerir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Uniprot veri tabanından alınan MsSN1'in 3 boyutlu yapısı

MsSN1 *in vitro*'da *Agrobacterium tumefaciens* ve *Phoma medicaginis*'e karşı inhibisyon etkisi göstermiştir ancak *in vivo* koşullarda *A. tumefaciens* ile muamele edilmesinden sonra MsSN1 ifadesinde bir değişiklik görülmemiştir. MsSN1'i overexpres eden transgenik *M. sativa* hatlarında *Phoma medicaginis* CT1 ve *Colletotrichum trifolii* CT2 ile muamele edildiklerinde hastalık semptomlarının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Garcia et al. 2014).

1.7. Tez Çalışmasının Önemi

Uzun yıllar boyunca tarım alanlarında ekilen türleri zararlı bitkiler, böcekler ve patojen mikroorganizmalardan korumak ve verimi artırmak için pestisit, fungusit ve herbisitler kullanılmıştır. Bu kimyasalların uzun ve sıkça kullanımı sonrasında bazı böcekler, zararlı bitkiler ve patojen mikroorganizmalar bu kimyasallara karşı direnç geliştirmişlerdir. Bunun yanı sıra, kullanılan kimyasallar torakta bulunan diğer mikroorganizmalara ve su ile taşınması yoluyla da başka bölgelerdeki canlı organizmalara da zarar vermekte ve böylece biyoçeşitlilik için bir tehlike oluşturmaktadır. Hatta, tarımda kimyasalların kullanımı sonucunda özellikle insan besini olan mahsül ve ürünlerde kullanımı insan sağlığını da tehdit etmektedir. Bu nedenlerden dolayı tarımda kullanılan çeşitli kimyasalların yerine kullanılabilecek yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer yandan bilinçsizce kullanılan antibiyotikler bakterilerin direnç kazanması ile sonuçlanmıştır. Antibiyotik direnci insan yaşamını olumsuz yönde etkilemiştir ve bakteriler ile savaşımızda bizleri olumsuz yönde etkilemiştir. Tarımda olduğu gibi ilaç sektöründe de yeni ajanlara ihtiyaç vardır. Yeni ajanlar olarak, AMP'ler ise kararlı yapıları ve geniş etki spektrumları sayesinde en önemli adaylardır. Bitki

1. GİRİŞ

AMP'leri de içerdikleri disülfüt köprüleri sayesinde kararlı yapı (termostabil, pH değişimlerine dayanıklı, vb.) oluşturmaları, bakteri, fungus ve virüs patojenlerine, böcek ve afit gibi zararlılara karşı etkili olup geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca, zararlılara karşı etkili oldukları konsantrasyonlarda insan hücrelerine zararlı bir etkisi tespit edilmemiştir. Bu sebeplerle bitki AMP'lerinin de kimyasalların yerine kullanılabilme potansiyelleri oldukça yüksektir.

M. sativa genomunun %3'ünün AMP kodlandığı bilinmesine rağmen *M. sativa*'dan şimdiye kadar sadece 2 farklı AMP tanımlanmıştır. Dolayısıyla *M. sativa* keşfedilecek çok sayıda AMP barındırmaktadır. Bitki tohumları da AMP bakımından zengin içeriğe sahiptir çeşitli bitki türlerinin tohumlarından da çok sayıda AMP keşfedilmiştir. Örneğin; buğday (*Triticum kiharae*) tohumlarından 12 tanesi defensin olmakla birlikte 24 tane farklı sınıflara dahil AMP izole edilmiştir. *M. sativa*'da tohumlarında ise keşfedilmeyi bekleyen yeni AMP'ler içer mektedir. Yukarıda belirtilen durumlarla mücadele edebilmek için bu tez çalışmasında, *M. sativa* tohumlarından ısıya dayanıklı (85 °C) yeni bir AMP izole edilmesi ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yeni bir AMP keşfi ile çeşitli mikroroganizma ve bitki zararlısı ile mücadelede bizleri bir adım öne geçirecektir bu açıdan bu ve benzeri çalışmalar önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bhunia et al. (1992), *Pediococcus acidilactici*'den yeni bir bakteriosin olan pediocin AcH antimikrobiyal peptidini tanımlamışlardır. Jel kapama testi ile pediocin AcH'nin *Lactobacillus plantarum*'a karşı inhibisyon etkisi belirlenmiştir.

Gao et al. (2000) tarafından *Medicago sativa* tohumlarından MsDef1 (alfAFP) antifungal peptidi tanımlanmıştır. Bu peptit *V. dahliae*'e karşı güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Patates bitkisine bu peptit geni aktarıldıktan sonra da sera koşullarında *V. dahliae* patojenine karşı koruma sağlanmıştır.

Parret et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada rekombinant olarak *Escherichia coli*'de llpA1_{Pf-5} ve llpA2_{Pf-5} genlerinin ifade edildikten sonra rekombinant proteinlerin antimikrobiyal aktiviteleri jel kapama testi ile belirlenmiştir. Ll pA1_{Pf-5} and Ll pA2_{Pf-5} bakteriocinleri *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 mantar patojeninin çeşitli suşlarının gelişimini inhibe etmiştir.

Ming et al. (2007), insan servikal mukusundan antimikrobiyal proteinler izole ederek bu proteinlerin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisini jel kapama testi ile belirlenmiştir. *E. coli*'ye karşı inhibisyon etkisi belirlenen proteinler N-terminal dizileme ve MALDI-TOF yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

Games et al. (2008), *Phaseolus vulgaris* L. tohumlarından PvD1 antifungal defensinini tanımlamışlardır. PvD1 AMP'si 47 amino asit içeren yaklaşık 6 kDa moleküler kütleyle sahip olup *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı inhibisyon etkisi gösterilmiştir.

Moreira et al. (2011), *Lippia sidoides*'ten 10 ve 15 kDa moleküler ağırlığa sahip 2 farklı antifungal peptit tanımlamışlardır. Bu peptitler *B. cineræ* gelişimini inhibe edebilen peptitlerdir ancak bakteriler üzerinde bir etkisi bulunmamıştır.

Aliahmadi et al. (2012), *Medicago sativa* tohumlarından metanol kullanarak elde edilen ekstrakt ile yapılan jel kapama testinde Methicillin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vancomycin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE)'e karşı inhibisyon zonları gözlemişlerdir. Bu çalışmada küçük molekül kütleli proteinlerin inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir.

Liu et al. (2012), gram pozitif bir bakteri olan *Lactobacillus paracasei*'den laparaxin isimli bir polipeptidi karakterize etmişlerdir. Laparaxin eksponansiyel fazın başlarında üretilen, küçük moleküler kütleli ve *Enterococcus faecalis* ve *Lactococcus lactis*'e antimikrobiyal etkisi jel kapama testi ile belirlenmiştir.

Sakthivel and Palani (2016), *Bauhinia purpurea* L. fidelerinden yeni bir antimikrobiyal peptit karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan antimikrobiyal peptidin MALDI-TOF MS/MS analizi sonucunda 174 amino asit içerdiği ve 20.9 kDa moleküler kütleli olduğu belirlenmiştir. Bu yeni peptidin *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon etkisi gözlenmiştir.

Alkahalili et al. (2016), *Geobacillus* sp. ZGt-1 suşundan *G. stearothermophilus*, mezofilik *B. subtilis* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı gelişimlerini inhibe eden peroteine adayları tanımlamışlardır. Protein tanımlamasında jel kapama testi kullanarak 15-20 kDa bant aralığında bir inhibisyon zonu belirlemişlerdir. Jeldeki bu bant aralığındaki proteinler kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir.

Saiqali et al. (2018), *Azadirachta indica* yapraklarından küçük molekül kütleli polipeptitler ekstrakte etmişlerdir. Jel kapama testi ile 14-11 kDa arasındaki peptitlerin *Staphylococcus aureus*, methicillin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* karşı bakteriyosidal ve *Candida tropicalis*'e karşı fungisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. 11-14 kDa aralığında bulunan tüm peptitler MALDI-TOF/TOF analizi ile karakterize edilmiştir.

Rodriguez-Decuadro et al. (2019) tarafından *Erythrina crista-galli* genomundan izole edilen ve defensin kodlayan *EcgDf1* geni *E. coli*'ye aktarılarak eksprese edilmesini sağlanmıştır. *EcgDf1*'in 6697,55 Da moleküler kütleye sahip, 8 sistein amino asidi ve γ -dönüşü yapısı içeren tipik bir defensin olduğu belirlenmiştir. *Candida albicans*, *Aspergillus niger* ve bitki patojeni olan *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* ve *Alternaria alternata*'ya akrışi inhibisyon etkisi gösterdiği görölmüştür.

Cunsolo et al. (2020), *Charybdis pancration* (Steinh.) Speta'dan *S. aureus* ve *P. aeruginosa* 'ya karşı 30 μ g/ml konsantrasyonda etkili olan peptitler tanımlamışlardır.

Mirzaee et al. (2021), farklı bakteri türlerinden moleküler ağırlıklarına göre antimikrobiyal bileşikleri belirlemek için jel kapama testi uygulandıktan sonra inhibisyon bölgesindeki peptitlerin jelden kesilerek ardışık MS yöntemi ile karakterize etmişlerdir.

Seyedjavadi et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada 3,759 kDa büyüklüğüne sahip Cc-AFP1 antifungal bir peptit tanımlanmıştır. Bu çalışma ile Cc-AFP1 peptidinin *Aspergillus* türlerine karşı MIC değeri 8-10 μ g/ml olarak belirlenmiştir.

Moyer et al. (2021) tarafından *Amarantus tricolor*'un toprak üstü dokularından olası peptitleri tanılamak için kütle spektrometresi temelli bir proteomik çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda çeşitli peptitler tanılanarak Atr-LTP1 için *S. auresus* ve *Enterococcus faecium* gibi yüksek riskli olan bakteri patojenlerine karşı etkisi gösterilmiştir.

Silva et al. (2022) tarafından yapılan çalışma ile şeker kamışına ait defensin ve LTP antimikrobiyal peptitlerinin bu bitkinin farklı çeşitlerindeki aminoasit farklılıkları belirlenmiştir. Çeşitlerden elde edilen diziler için filogenetik ağaç ile evrimsel yakınlıkları belirlenmiştir. Ayrıca üç boyutlu modellemeleri Phyre2 programı ile yapılarak çeşitler arasındaki defensin ve LTP farklılıkları gösterilmiştir.

Kirar et al. (2023), *Datura stramonium* yapraklarından *Anopheles stephensi*'ye karşı insektisit etkisi olan yeni bir peptit keşfetmişlerdir. Bu peptit iyon değişimi kromatografisiyle saflaştırıldıktan sonra LC-MS/ESI-MS analizi ile 10 kDa moleköl ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasının *in vitro* kısmı, 221Z328 nolu TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki ve patojen mikroorganizmalar

Medicago sativa antimikrobiyal peptit kaynağı olarak kullanılmıştır. *M. sativa* bitkisi doku kültürü ortamında geliştirilerek gen ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır.

Tüm antimikrobiyal testlerde *Agrobacterium tumefaciens* (AGL-1), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25023), *Escherchia coli* (ATCC 25922), ve *Ramotenellum solonacearum* (bitki izolatu) bakteri patojenleri ve *Candida albicans* (ATCC 10231) fungal patojeni kullanılmıştır.

3.1.2. Sarf malzeme ve cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, kullanılan sarf malzemeler ise Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Buzdolabı (4 °C)	SIEMENS	4 °C’de saklanması gereken malzemeler için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-20 °C)	SIEMENS	-20 °C’de saklanması gereken malzemeler için kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devamı)

Derin dondurucu (-80 °C)	ESCO Lexicon®	-80 °C’de saklanması gereken malzemeler için kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Peptit ekstraksiyonunda kullanıldı.
µDrop	Thermo Fisher-Multiscan Go	Nükleik asit konsantrasyon ölçümü için kullanıldı.
Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) cihazı	Sensoquest-Labcyclers	Gen bölgesinin çoğaltılmasında ve cDNA sentezinde kullanıldı.
qPCR cihazı (Gerçek zamanlı PCR)	Qiagen Rotor-Gene	Gen Ekspresyonunun belirlenmesinde kullanıldı.
Mikropipet	Axygen	Çalışmalarda kullanılan sıvı malzemelerin miktarlarını doğru hacimde elde etmek için kullanıldı
Su Banyosu	Wisd-WiseBath	Örneklerin uygun sıcaklığa getirilmesi amacıyla kullanıldı.
Mini Santrifüj	WiseSpin	DNA, RNA ve plazmit izolasyonlarında kullanıldı.
Vorteks	Wisd-Wisemix VM-10	Homojenizasyonda kullanıldı.
Otoklav	Tomy SX-500E	Sıvı ve katı materyalleri sterilize etmek için kullanıldı.
Yatay Elektroforez	Bio-Rad	Nükleik asit örneklerinin ayrılmasında kullanıldı.
SDS-PAGE Sistemi	Bio-Rad	Proteinlerin ayrılmasında kullanıldı.
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-RadChemiDoc	Jel görüntülemek amacıyla kullanıldı.
Isıtıcı-Soğutucu Kuru Blok	BIOER	Çalışmalarda kullanılan örneklerin belirli bir ısıya getirilmesinde kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devamı)

LC-MS/MS	UltiMate ® 3000 HPLC series (Dionex), Nanomate nanospray source (Advion Biosciences), QExactive HF (QEHF) mass spectrometer	Jelden kesilen protein örneğinin molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanıldı.
Liyofilizatör	CHRIST-Alpha 1-2 LD plus	Örneklerdeki sıvının uçurulmasında kullanıldı.
Çalkalayıcı İnkübatör	Zhicheng, zhwy-2102c	Bakteri ve fungus patojenlerinin gelişebilmesi için gerekli ısının sağlanmasında kullanıldı.
Steril Kabin	ESCO NordicSafe™	Çalışmalar için steril bir ortam sağlamak amacıyla kullanıldı.
Ultrasantrifüj	HITACHI	Proteinlerin saflaştırılmasında kullanıldı.
Mikroplaka okuyucu	Thermo Fisher-Multiscan Go	Protein konsantrasyonu ve hücre konsantrasyonu ölçmek amacıyla kullanıldı.
İnkübatör	Memmert, IN110	Bakteri ve fungus patojenlerinin gelişebilmesi için gerekli ısının sağlanmasında kullanıldı.
Büyütme kabini	Wisd SWGC-450	Bitki büyütme için uygun ortam sağlamak amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeler

Materyal	Marka	Kullanım Amacı
9 cm petri kapları	Isolab	Katı besiyeri hazırlamak için kullanıldı.
96 kuyulu plaka		Peptit ekstraktının patojenler üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanıldı.
Sülfürik asit		Protein ekstraksiyonunda kullanıldı.
NaCl		Protein ekstraksiyonunda kullanıldı.
Potato dextrose broth (PDB)		Fungus besiyeri olarak kullanıldı.
Nutrient broth (NA)		Bakteri besiyeri olarak kullanıldı.
Nutrient Agar (NA)		Bakteri besiyeri olarak kullanıldı.
Tris-Base	Sigma Aldrich	SDS-PAGE analizinde kullanıldı.
Potato dextrose agar (PDA)		Fungus besiyeri olarak kullanıldı.
Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB)		Bitki DNA izolasyonunda kullanıldı.
Protein konsantratör	Amicon®	Peptit ekstraksiyonunda kullanıldı.
Taq DNA Polimeraz Master Mix (2X)	AMPLIQON	İstenilen gen dizisini çoğaltmak amacıyla kullanıldı.
pGEM-T easy vektör sistemi	Promega	İstenilen gen bölgesinin vektöre aktarılması için kullanıldı.
Nystatin	Sigma Aldrich	Funguslar için pozitif kontrol olarak kullanıldı.
Ampicilin	Sigma Aldrich	Bakteriler için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devamı)

Streptomycin		Bakteriler için pozitif kontrol olarak kullanıldı.
RNA-Solv Reagent	OMEGA Bio-Tek	RNA izolasyonu için kullanıldı.
cDNA sentez kiti	NucleoGene	RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla kullanıldı.
qPCR Mix	Solis BioDyne HOT FIREPol® EvaGreen®	Gen ekspresyonlarını belirlemek amacıyla kullanıldı.
Plazmit izolasyon kiti	İntron Biotechnology	Bakteriden plazmit izole etmek için kullanıldı.
PCR kiti	Sigma Aldrich	Koloni PCR için kullanıldı.
Whatman kağıdı		Disk difüzyon testinde kullanıldı.
Bovine serum albümin (BSA)	Sigma Aldrich	Protein konsantrasyonu belirlemek için kullanıldı.
ClearBand Laemli Buffer 10X	EcoTech Biotechnology	Proteinleri yürütmesini jelde izlemek için kullanıldı.
EcoPURE PCR/Gel Purification Kit	EcoTech Biotechnology	PCR ürünlerini jelden ekstrakte etmek amacıyla kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *M. sativa* tohumlarından peptit ekstraksiyonu

Öğütülerek toz haline getirilmiş *M. sativa* tohumlarının üzerine sıvı nitrojen eklenip havanda dövülerek ezilmiştir. Elde edilen tozun her gramı için 3 ml 50 mM sülfirik asit eklenmiştir. Bu karışım 1 saat karıştırılıp sonrasında çözünmeyen kısımlar

gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Süzülen sıvı 14.000 g ve 4 °C’de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvının pH değeri 10 M NaOH ile 7,8’e ayarlanmıştır. 4 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra aynı koşullarda tekrar santrifüj edilerek üst sıvı yeni tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan sıvının amonyum sülfat doygunluğu %35 oranına ayarlanmıştır. Daha sonra, amonyum sülfatlı karışım 1 saat 4 °C’de inkübe edilip tekrar 14.000 g’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı %90 oranında doygun amonyum sülfat içinde gece boyu 4 °C’de sürekli karışması sağlanarak inkübe edilmiştir. Oluşan çökelti üst sıvıdan ayrılarak 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl çözeltisi ile çözülmüştür. Daha sonra, 85 °C’de 10 dk ısı ile muamele edilerek 20.000 g’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Pellet uzaklaştırıldıktan sonra üstte kalan sıvı protein konsantratörü (10K) ile filtrelenmiştir. Filtreden geçen sıvı 3 kDa por büyüklüğüne sahip protein konsantratörü ile diyaliz edilmiştir (Kovaleva et al. 2009).

3.2.2. Bradford testi

Bradford testi ekstrakte proteinlerin konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Bu boya kullanılarak 10 µg- 1 mg/ml konsantrasyonları arasında BSA (bovine serum albümin) ile 595 nm’de ölçüm alındıktan sonra bir standart grafik hazırlanmıştır. Daha sonra ekstrakte edilen proteinler de aynı boya kullanılarak 595 nm’de ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümlerin konsantrasyonları standart grafiğe göre belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.2.3. SDS-PAGE

Tohumlardan peptit ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, peptitleri ayırmak için SDS-PAGE (%15) yöntemi kullanılmıştır. SDS-PAGE jeli Çizelge 3.3’e göre hazırlanmıştır. Jel ayırma tamponunda (1 litre saf su içerisinde 3 g Tris-base, %1 SDS, and 14.4 g glisin) 100 voltta 2,5 saat yürütülmüştür. Yürütme sonrasında jel %1’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 içerisine konulup 20 dk çalkanarak boyanması sağlanmıştır. Boyanan jelde ayrılan proteinleri görüntüleyebilmek için fazla boya yıkama solüsyonu (%30 etanol, %10 asetik asit) ile yıkanmıştır.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE (%15) jel içeriği

	Ayırma Jeli (10 ml)	Yükleme Jeli (5 ml)
dH ₂ O	2,85 ml	3,6 ml
%30 Acrylamide/Bisacrylamide solüsyonu	5 ml	670 µl
2 M Tris-Cl (pH 8,8)	1,95 ml	-
1 M Tris-Cl (pH 6,8)	-	625 µl
%10 SDS (sodyum dodecyl sülfat)	100 µl	50 µl
%10 APS (Amonyum per sülfat)	100 µl	50 µl
TEMED ((N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine)	10 µl	5 µl

3.2.4. LC-MS/MS

LC-MS/MS analizi Birmingham Üniversitesi “Advanced Mass Spectrometry” biriminde hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. Uygulanan yöntem aşağıda verilmiştir.

SDS-PAGE jelinden kesilen protein bandı tripsin ile muamele edilerek kısa peptit dizilerine parçalanmıştır. UltiMate® 3000 HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) (Dionex, Sunnyvale, CA USA) kullanılarak elde edilen kısa peptit dizilerinin ayrılması ve konsantrasyonlarının belirlenmesi sağlanmıştır. Örnekler uPrecolumn Cartridge, Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å 300 µm i.d.x5mm (Dionex, Sunnyvale, CA USA) kolonunda tutulmuş, Nano Series™ Standard Kolonlar 75 µm i.d. x 15 cm kolonunda ayrılmıştır ve son olarak C18 PepMap100, 3 µm, 100 Å (Dionex, Sunnyvale, CA USA) kolonunda paketlenmiştir. Gradient solüsyon %3,2-%44 solvent B (asetonitril içinde %0,1 formik asit) 30 dakika boyunca kullanılmıştır. Peptitler, bir Triversa Nanomate nanosprey kaynağı (Advion Biosciences, NY) aracılığıyla doğrudan bir QExactive HF (QEHF) kütle spektrometresine (Thermo Fisher Scientific) ~ 350 nL dk⁻¹ akış hızıyla aktarılmıştır. Veriye bağlı tarama edinimi Xcalibur 4.0 yazılımı tarafından kontrol edilmiştir. Kütle spektrometresi, tam bir FT-MS taraması (m/z 360 – 1600) ve ardından en bol bulunan 20 iyonun yüksek enerjili çarpışma ayrışması (HCD) MS/MS taramaları arasında dönüşümlü olarak geçiş yapmıştır. Değerlendirme taramaları,

m/z 200'de 120 000 çözünürlük ve otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3x10⁶ ile QEHF'de elde edilmiştir. Öncü iyonlar, çözünürlük 15.000'e ve normalleştirilmiş çarpışma enerjisi 28'e ayarlanarak HCD MS/MS'de parçalanmıştır. HCD MS/MS için ACG hedefi 1x10⁵'ti. Öncü izolasyon penceresinin genişliği 1,2 m/z idi ve MS/MS için yalnızca çoklu yüklü öncü iyonlar seçilmiştir. Spektrumlar, 20 saniyelik dinamik dışlama süresiyle 56 dakika boyunca elde edilmiştir.

MS ve MS/MS taramaları, Proteome Discoverer 2.2 (ThermoFisher Scientific) kullanılarak Uniprot veritabanında aranmıştır. Değişken modifikasyonlar deamidasyon (N ve Q), oksidasyon (M) ve fosforilasyondur (S, T ve Y). Öncü kütle toleransı 10 ppm'dir ve MS/MS kütle toleransı 0,02 Da'dır. Kaçırılan iki bölünmeye izin verilir ve en az iki yüksek güvenilirliğe sahip peptit ile gerçek bir isabetli protein olarak kabul edilir.

3.2.5. Disk difüzyon testi

Disk difüzyon testi için bitki patojenleri NA (nutrient agar) ve PDA (potato dextrose agar) içeren petri kaplarında inkübe edilmiştir. Gece boyu geliştirilmiş patojen türleri agar üzerine pamuklu çubuk yardımıyla yayılmıştır. Petri üzerinde belirlenmiş noktalara pamuk diskler konulmuştur. Diskler üzerine negatif kontroller yanında 10 (3 µg) ve 20 µl (6 µg) peptit ekstraktı damlatılmıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek inhibisyon zonu oluşumu gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak saf su kullanılarak oluşan inhibisyon zonları karşılaştırılmıştır (Wittayapipath et al. 2020).

3.2.6. Jel kapama testi

Jel kapama testi Yung and Murphy (2012)'nin yöntemi takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre öncelikle Native PAGE jeli SDS eklenmeden Çizelge 3.3'e göre hazırlandıktan sonra yükleme boyası jelden çıkana kadar 100 volt akım ile yürütülmüştür. Steril koşullarda Native PAGE jeli kesilerek agarozlu, az besin içeren ve dökme plak yöntemi ile gece boyu geliştirilmiş olan patojen türlerinden 200 µl ekim yapılmış besiyeri üzerine konulmuştur. Jeldeki peptitlerin besiyerine geçmesi için jel

katılaşmış besiyeri üzerinde 37 °C'de 4 saat bekletildikten sonra jel agarozlu besiyeri üzerinden alınmıştır. Az besin içeren besiyeri üzerine zengin besiyeri dökülerek geceboyu (overnight) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri içerisine geçmiş peptitlerin inhibisyon etkisi gözlenmiştir.

3.2.7. Mikrodilüsyon testi

Antimikrobiyal etkiyi belirlemek için mikroplate (96-well) kuyularının her birine 50 µl potato dextrose broth (PDB) veya nutrient broth (NB) yaklaşık ve gece boyu geliştirilen patojen mikroorganizmadan 50 µl eklenmiştir. Kuyulara peptit ekstraktından 6, 12, 24, 48 ve 96 µg/ml son konsantrasyonu olacak şekilde seyreltilerek eklenip saf su ile 150 µl'ye tamamlanmıştır. Her bir konsantrasyon üç tekrar olacak şekilde uygulanmıştır. Mikroplate 37 °C'de geliştirildikten sonra 24 ve 48 saat sonunda mikroorganizma gelişimleri OD₆₀₀ ile spektrofotometrede ölçülerek pozitif (streptomycin ve nystatin) ve negatif (dH₂O) kontroller ile karşılaştırılmıştır (Luber et al. 2003).

3.2.8. *M. sativa* Defensin 2.1 gen ekspresyonu

3.2.8.1. Bitki doku kültürü

M. sativa Sazova çeşidinin tohumlarının geliyeceği standart MS ortamı hazırlanmıştır (Murashige and Skoog 1962). Bu ortama ekilmek üzere tohum örnekleri %30 sodyum hipoklorit çözeltisi kullanılarak steril edilmiştir. Daha sonra tohumlar besiyerine ekilerek gelişmesi için 25 °C sıcaklıkta 16 saat ışıklı ve 8 saat karanlık döngü olacak şekilde inkübe edilmiştir. Tohum ekiminden 3, 7, 14 ve 21 gün sonrasına yaprak, kotiledon, kök ve gövde kısımları toplanmıştır.

3.2.8.2. RNA izolasyonu

3, 7, 14 ve 21. günlerde toplanan örneklerden RNA-solv reagent (Omega Bio-Tek Nocross, Georgia, USA) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamaları ürünün protokolüne göre yapılmıştır.

100 mg doku örneği sıvı azot ile havanda ezildikten sonra 1 ml RNA-solv çözeltisi eklenmiştir. Çözelti üzerine 200 µl kloroform eklenip 15 saniye boyunca vortekslenmiştir. Elde edilen karışım 10 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 12000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatant yeni 2 ml tüpe alınarak pellet atılmıştır. Supernatant üzerine 500 µl izopropilalkol eklenip 10 dk soda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen karışım 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atılmıştır. Pellet üzerine 1 ml %80 etanol çözeltisi eklenerek 7.500 g'de 5 dk santrifüj edilerek yıkama işlemi uygulanmıştır. Son olarak pellet 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 50 µl nükleaz içermeyen dH₂O'da çözülmüştür.

3.2.8.3. cDNA sentezi

İzole edilen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için her bir RNA örneğinden 1.000 ng (1 µg) kullanılmıştır. cDNA sentez karışımı (Nucleogene, İstanbul, Türkiye) kullanılarak karışımla birlikte verilen verilen metot ile yapılmıştır. Bu protokole göre, cDNA sentezi için 5X kit karışımından 4 µl, 1.000 ng RNA örneği ve dH₂O eklenerek toplamda 20 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 30 dk 25 °C'de, 5 dk 85 °C'de bekletilmiştir.

3.2.8.4. qPCR

M. sativa Defensin 2.1 gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla qPCR metodu uygulanmıştır. Primerler Primer 3 çevrimiçi programı kullanılarak elde edilmiştir ve bu primerler (Oligomer, Ankara, Türkiye) sentezletilmiştir. 5X Hot FIREPol Evagreen qPCR karışımı (Solis BioDyne, Tartu, Estonya), sentezlenen cDNA ve primerler kullanılarak qPCR reaksiyonu hazırlandı. qPCR koşulları 95 °C'de 12 dk bekletildikten sonra 95 °C'de 15 sn, 61 °C'de 20 sn ve 72 °C'de 30 sn 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Housekeeping gen olarak MtAct2 (*M. sativa* aktin 2) geni kullanıldı. qPCR sonuçları 2^{-ΔΔCt} metodu ile değerlendirilmiştir.

3.2.9. Defensin 2.1 geninin klonlanması ve gen analizi

3.2.9.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için *M. sativa* Sazova çeşidinin yaprakları kullanılmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azot ile toz haline getirilmiştir. CTAB (setiltrimetilamonyum bromür) solüsyonu hazırlanarak 600 µl örneklerin üzerine eklendikten sonra örnekler 65 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Örneklerin üzerine 100 µl kloroform eklenip karışması sağlandıktan sonra 8.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı yeni tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpteki hacim kadar izopropanol eklenerek 30 dk -20 °C’de bekletildi. Bu süre sonunda örnekler 8.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılarak pellet için %70’lik alkol ile 2 kez yıkama işlemi uygulanmıştır. Pellet üzerine TE (Tris-EDTA) tamponu eklenerek DNA’nın çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.9.2. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

İzole edilen *M. sativa* Sazova çeşidinin DNA örneği kullanılarak PCR koşulları ve miktarları optimize edilmiştir. Bu reaksiyonda hem Defensin 2.1 kodlanan dizisi hem de tüm gen dizisi için farklı PCR yapılmıştır. Kodlanan bölge için 5’-ATGAGGACTTGTGAGCATTTGGCTGATACA-3’ ve 5’-TTAACAGTTTTGAGTGCAGAAACATT-3’ primerleri kullanılmıştır. Kodlanan dizi için PCR koşulları 95 °C’de 2 dk bekletildikten sonra 95 °C’de 30 sn, 58 °C’de 20 sn ve 72 °C’de 30 sn 35 döngü olarak belirlenmiştir.

Klonlama sonrasında kontrol için yapılan PCR’da SP6 ve T7 primerleri kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan reaksiyondaki koşullar 95 °C’de 2 dk bekletildikten sonra 95 °C’de 30 sn, 48 °C’de 45 sn ve 72 °C’de 60 sn 35 döngü olarak belirlenmiştir.

3.2.9.3. Gen klonlama

Gen klonlama için pGEM-T easy vektör sistemi kullanılmıştır. Kodlanan ve tüm gen dizileri bu vektör içine aktarılmıştır. Ligasyon işlemi vektör sisteminde belirtilen metoda göre yapılmıştır. Ligasyon için 1 µl pGEM-T easy vektörü, 150 ng (3 µl) PCR örneği 5 µl ligasyon tampon çözeltisi ve 1 U (1 µl) T4 DNA ligaz eklenerek toplamda 10 µl reaksiyon karışımı hazırlanarak 1 saat 25 °C’de inkübe edilmiştir.

Transformasyon işleminde kompetent hücre olarak *E. coli* JM101 suşu kullanılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı kompetent hücrelerin içine eklenerek 30 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra 42 °C’de 45 sn ısı muamelesi uygulandıktan sonra 250 µl LB (Luria Broth) eklenerek 1 saat 37 °C’de 150 rpm’de çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir. Bu sırada Mavi -Beyaz koloni seçimi yapabilmek için Ampisilin içeren LBA (Luria Broth Agar) besiyeri üzerine XGal ve IPTG eklenerek yayılmıştır. Son olarak çalkalayıcı inkübatördeki kompetent hücre örnekleri alınarak 100 ve 50 µl hacimlerde LBA besiyeri üzerine yayılarak ekim yapılmıştır. 16 saat 37 C’de inkübe edildikten sonra beyaz kolonilerden seçilerek Ampisilin içeren LB içerisine koloni ekimleri yapılmıştır.

3.2.9.4. Plazmit izolasyonu

Hedef dizileri içeren vektör plazmitleri Mavi-beyaz seçilimi sonrasında LB’de geliştirilen koloni hücrelerinden izole edilmiştir. Plazmit izolasyonu kullanılan kit protokolü (İntron Biothechnology) uygulanarak yapılmıştır.

Geceboyu LB’de geliştirilen kültürden bakterileri elde etmek için 2 ml kültür 13.000 rpm’de 30 sn santrifül edilmiştir. Pelleti çözmek için 2 µl RNase içeren 250 µl resüspansiyon ramponu eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra 250 µl lizis tamponu eklenen tüp 10 defa ters-düz edilerek karışması sağlanmıştır. Tüp 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 350 µl nötralizasyon tamponu eklenmiştir. Daha sonra, tüpü 10 defa ters-düz edilip yine karışması sağlanmıştır ve 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. 5 dk sonra tüp 13.000 rpm’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatant alınarak kit içinde bulunan kolon üzerine aktararak 13.000 rpm’de 1 dk satrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra kolon üzerine 1. yıkama

tamponundan 500 µl eklenmiş ve yine 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı atıldıktan sonra 2. yıkama tamponundan 700 µl eklenerek aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Kolon bir kere de aynı koşullarda boş olarak santrifüj edilmiştir. Kolon yeni 1,5 ml tüpe aktarılmıştır. Elüsyon tamponu kolona eklenerek 1 dk oda sıcaklığında bekletilip 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Plazmitler 1,5 ml tüpün içine geçmiştir.

3.2.9.5. Sekans analizi

Plazmit izolasyonundan sonra sekans analizi için Sanger yöntemi ile gen sekansı belirlenmiştir. Bu dizileme Biolabs’tan hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.2.9.5. Biyoinformatik analizler

DNA sekans analizi NCBI BLAST çevrimiçi programı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizisi BLAST programına yüklenerek veri tabanında karşılaştırılmıştır. DNA sekansı Expasy “Translate Tool” (Gasteiger et al. 2003) (<https://web.expasy.org/translate/>) ile amino asit sekansına dönüştürülmüştür. Protein dizisi yine NCBI BLAST (Altschul et al. 1990) programına yüklenerek veritabanında karşılaştırma yapılmıştır.

AMP’nin amino asit sekansı belirlendikten sonra Expasy ProtParam (Gasteiger et al. 2005) (<https://web.expasy.org/protparam/>) ve ADP-AMP “Calculator and Predictor” (Wang et al. 2016) (<https://aps.unmc.edu/prediction>) araçları kullanılarak AMP sekansının fizyokimsal özellikleri belirlenmiştir.

AMP dizilerinin tripsin kesim noktaları “Expasy PeptideCutter” (Gasteiger et al. 2005) (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) aracı ile tespit edilmiştir.

AMP’nin primer dizisi kullanılarak PROCHECK (Laskowski et al. 1993; Laskowski et al. 1996; Laskowski et al. 2001) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) çevrimiçi

programı ile proteinin sekonder yapısının tahmini yapılmıştır ve sekonder yapı tahmininde kullanılan Ramachandran Grafiği elde edilmiştir.

Tersiyer yapının (3 boyutlu yapı) tahmini olarak belirlenmesi için Expasy SwissModel (Guex et al. 2009), Phyre2 (Kelley et al. 2015) ve PRISPRED (Bunchan et al. 2019) (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) çevrimiçi programları kullanılmıştır.

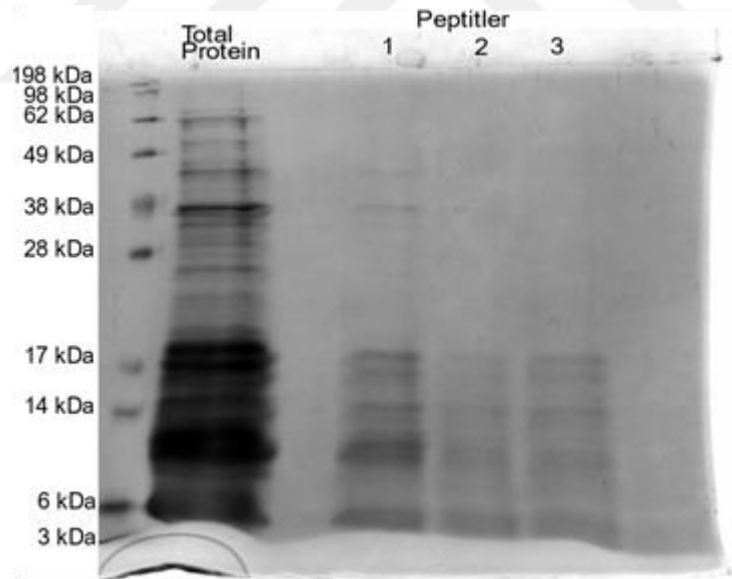
3.2.10. İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler SPSS programında One-way ANOVA - Duncan testi ile analiz edilerek peptit muamelelerinin etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Testler sonucunda p değerinin 0,05'ten küçük bulunması durumunda sonuçların anlamlı olduğu söylenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Antimikrobiyal Peptit İzolasyonu ve Moleküler Kütlesinin Belirlenmesi

M. sativa tohumlarından proteinler amonyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle izole edildikten sonra SDS-PAGE yöntemi kullanılarak jelde görüntülenmiştir. 10 kDa altı proteinler (peptitler) jelle diyalizden önce ve sonra elde edilen halleriyle jel kuyularına yüklenmiştir (Şekil 4.1). Protein ve peptit ekstraktlarının konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan önceki çalışmalarda, aynı yöntemin kullanıldığı farklı türlerden izole edilen antimikrobiyal peptitler (AMP) karakterize edilmiştir. İlk olarak, sarıçam fidelerinden p1 (11 kDa) ve p2 (5,8 kDa) olmak üzere iki farklı AMP tanımlanmıştır (Kovaleva et al. 2009). Yine, aynı yöntem kullanılarak *Carum carvi*'den (frenk kimyonu) 10 kDa altında farklı peptitler SDS-PAGE'de görüntülenmiştir ve 36 amino asit içeren Cc-AFP1 AMP'si tanımlanmıştır (Seyedjavadi et al. 2021).

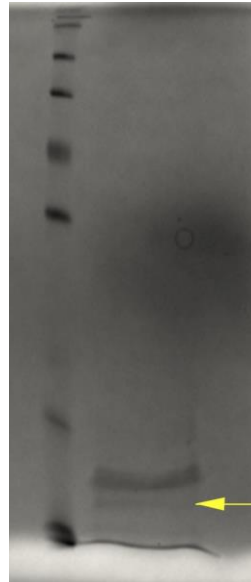


Şekil 4.1. Tohumlardan protein ekstraksiyonu sonrası elde edilen jel görüntüsü (1 diyaliz öncesi, 2 ve 3 diyaliz sonrası elde edilen peptitlerin yüklendiği kuyulardır.).

Çizelge 4.1. Protein ve peptit konsantrasyonları

	Konsantrasyon (µg/ml)
Total Protein	0,487882
Peptit (10K cut off)	0,338972
Diyaliz Sonrası Peptit	0,31

Jelde ayrılan peptit bantlarının Rf değerleri hesaplanarak tahmini molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Protein marker ile karşılaştırıldığında 7,4 kDa'a denk gelen ve Şekil 4.2'de sarı okla gösterilen bant örneği kesilerek LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen kromatogramdaki (Ek 1) pikler Uniprot veritabanında bulunan proteinlerle benzeyen diziler belirlenmiştir. LC-MS/MS analizinden sonra, gönderilen peptit örneği Uniprot veri tabanında bulunan karakterize edilmemiş 3 farklı *M. sativa* defensini ile benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.2). Benzerlik gösteren peptitler arasında hipotetik (putative) defensinler de bulunmaktadır. Hipotetik proteinler genom analizleri sonucunda sadece dizi benzerliği sonucunda belli bir sınıfa dahil edilen ancak fonksiyonuna dair çok az veya hiçbir deneysel veri bulunmayan proteinlerdir (Varma et al. 2015); hipotetik defensinler de bunun içine dahil olduğundan aynı şekilde tanımlanmaktadır.

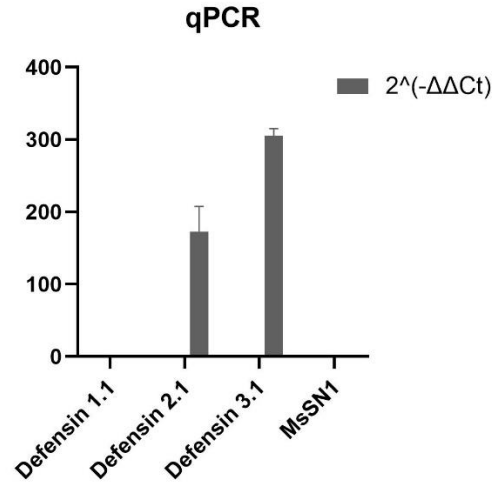


Şekil 4.2. SDS-PAGE jelinden kesilen bant örneği

Çizelge 4.1. LC-MS/MS sonucunda dizi benzerliği gösteren peptitler

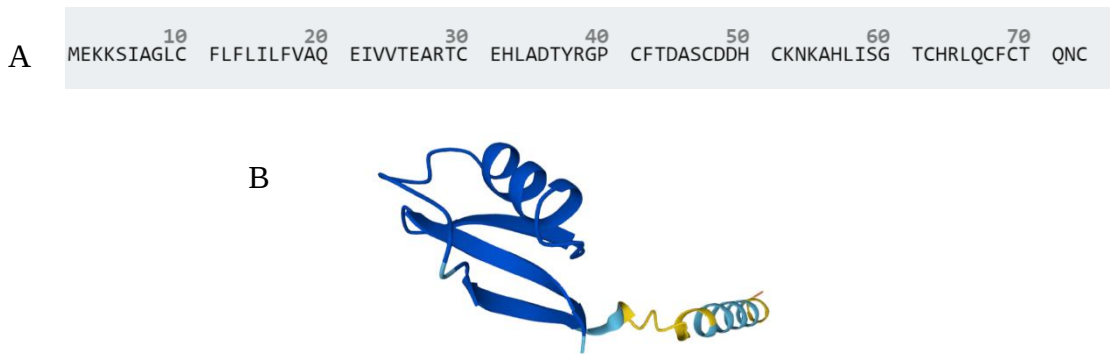
UniProt ID	Peptit İsmi	MW (Molekül Ağırlığı, kDa)	Benzerlik gösteren diziler (bulunduğu dizi aralığı)
Q4G3U7	Putative defensin 1.1	8,1	GPCFSGCDTHCTTK (63-79)
Q4G3U6	Putative defensin 2.1	8,2	GPCFTDASCDDHCK (39-52) TCEHLADTYR (29-38)
Q29ZQ8	Putative defensin 3.1	8,2	GPCFGGCDFFHCK (39-50)
Q40329	Serin proteinaz inhibitör	12,6	CTDIGETCHSACK (75-87) STTTACCNFCPCTR (54-67) CTDITNFCYPK (101-111)
H9D2D5	Snakin-1 (MsSN1)	9,9	CVPSGTYGNKHECPCYR (63-79)
Q40330	Serin proteinaz inhibitör	12,6	STTTACCNFCPCTK (54-67) CTDITNFCYPK (101-111)

Kesilen peptit bandının benzerlik gösteren defensinlerden hangisine ait olduğunu doğrulamak amacıyla qPCR analizi yapılmıştır ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile gen ifadeleri değerlendirilmiştir. qPCR analizinde housekeeping gen olarak MsACT2 (*M. sativa* actin 2) geni kullanılmıştır. Serin proteaz inhibitörlerinin gen ifadeleri kök ve yapraklarda bir uyaran sonucu (yaralanma veya patojen enfeksiyonu) gerçekleştiğinden ve sürekli ifade edilmediğinden dolayı bu peptitler qPCR analizine dahil edilmemiştir (McGurl et al. 1995). qPCR sonucunda MsSN1 ve Q4G3U7 kodlu defensin 1.1 için anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Q29ZQ8 kodlu defensin 3.1 ve Q4G3U6 kodlu Defensin 2.1 gen ifadesi bulunmaktadır (Şekil 4.3). Defensin 3.1 için sadece bir dizi çakışması mevcutken defensin 2.1 içinse iki farklı dizi çakışması bulunmaktadır (Çizelge 4.2). Bunun yanında, doğru bir tanılama yapabilmek için LC-MS/MS sonucunda peptitle en az iki farklı dizi çakışması olması gerekmektedir. Her iki sonuç birlikte değerlendirildiğinde ise gönderilen SDS-PAGE bandının hipotetik Defensin 2.1'e (Q4G3U6) ait olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. qPCR analiz sonucunda hesaplanan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

UniProt veri tabanında Defensin 2.1'in ilk 27 amino asidi sinyal dizisi olmak üzere 73 amino asit içeren ve toplamda 8,201 kDa moleküler ağırlığa sahip bir peptittir (Hanks et al. 2005). Sinyal dizisi olmadan aktif formu ise 46 aminoasit içerirken molekül ağırlığı 5,205 kDa'dur. Sinyal dizisi dışındaki amino ait dizisinde 8 tane sistein içermektedir (Şekil 4.4A). Bu peptidin amino asit dizisinden dolayı tahmini üç boyutlu yapısında 2 tane α -heliks ve 3 tane β -tabaka yapı bulunmaktadır (Şekil 4.4.B). UniProt veritabanındaki Defensin 2.1 *M. sativa*'nın LegenDairy çeşidinin genomundan elde edilmiştir (Hanks et al. 2005).



Şekil 4.4. Defensin 2.1'in amino asit dizisi (A) ve varsayımsal üç boyutlu yapısı (B)

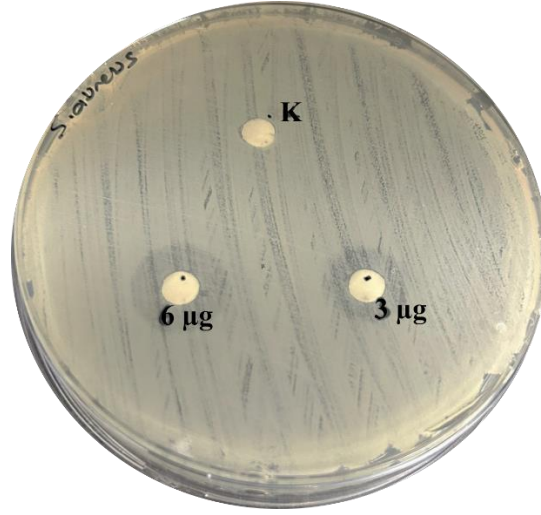
4.2. Antimikrobiyal Özelliklerin Belirlenmesi

Tüm antimikrobiyal testlerde *Agrobacterium tumefaciens* (AGL-1), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25023), *Escherchia coli* (ATCC 25922), ve *Ramotenellum solonacearum* (bitki izolatu) bakteri patojenleri ve *Candida albicans* (ATCC 10231) fungal patojeni kullanılmıştır.

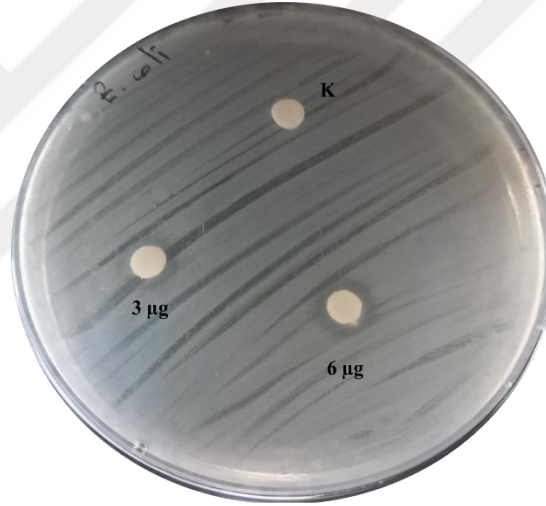
4.2.1. Disk difüzyon testi

Disk difüzyon testi patojen ekimi yapılmış bir agar besiyeri üzerine antimikrobiyal ajanların emdirildiği diskler koyarak bu antimikrobiyal ajanların patojen üzerine olan etkisinin disk etrafında oluşan inhibisyon halkası ve bu halkanın genişliği ile belirlenmesi için uygulanan bir testtir (Tenover 2019).

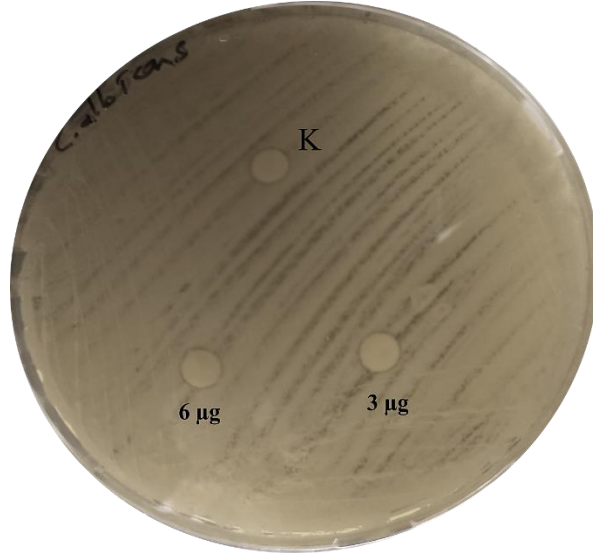
Bu test peptit ekstraktının antimikrobiyal özelliklerini test etmek için uygulanmıştır. 3.1.1’de belirtilen patojenler disk difüzyon testi ile peptit ekstraktına maruz bırakıldığında *S. aureus* ve *E. coli*’ye karşı inhibisyon zonu oluşumu görülmüştür (Sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6). Disk difüzyon testinde peptit ekstraktı *C. albicans*’a karşı inhibisyon etkisi görülmemiştir (Şekil 4.7) ancak diğer testlerde çoğalmasını inhibe etmiştir. Negatif kontrol (K) ile karşılaştırıldığında oluşan inhibisyon zonunun antimikrobiyal etki olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, mikrodilüsyon testi ve jel kapama testi ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.5. *S. aureus* disk difüzyon test sonucu



Şekil 4.6. *E. coli* disk difüzyon test sonucu

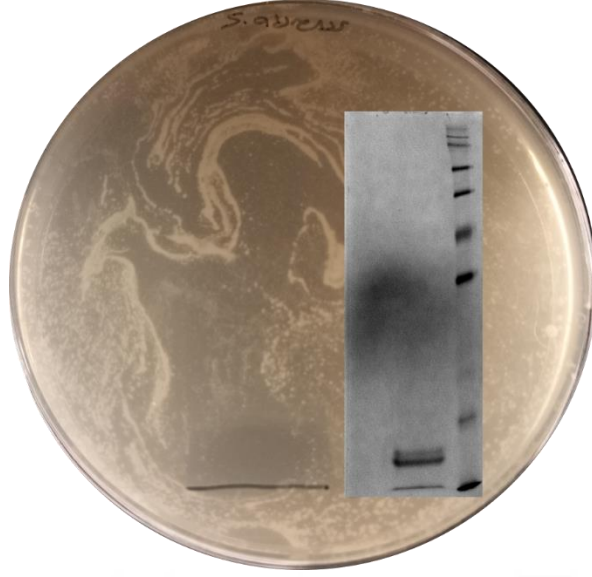


Şekil 4.7. *C. albicans* disk difüzyon test sonucu

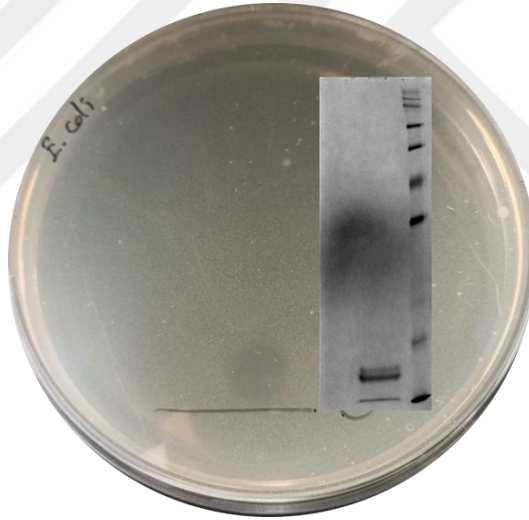
Disk difüzyon testinde *R. solanacearum* ve *A. tumefaciens*'e peptit ekstraktı uygulandığında ise inhibisyon zonu görülmediği için antimikrobiyal etki olmadığı söylenmiştir. Bu iki patojene karşı antimikrobiyal etki olmadığı mikrodilüsyon testi ve jel kapama testi ile de doğrulanmıştır.

4.2.2. Jel kapama testi

Jel kapama testi peptitlerin akrilamid jelden agarozlu besiyerine geçişi temeline dayanan bir yöntemdir (Yung and Murphy 2012; Liu et al. 2012). Bu test, peptit ekstraktı için uygulandığında *S. aureus*, *E. coli* bakterilerine ve *C. albicans*'a karşı bir inhibisyon zonu oluşumu görülmüştür (Şekil 4.8, 4.9, 4.10). Jel kapama testi bitki patojeni olan *Agrobacterium tumefaciens* ve *Ralstonia solanacearum* bakterileri için de uygulanmasına rağmen bu bakterilerin gelişiminde bir inhibisyon etkisi görülmemiştir. Benzer çalışmalarda, AMP'ler ile yapılan jel kapama sonucunda Gram pozitif MRSA (meticillin dirençli *S. aureus*), VRE (vancomycin dirençli *Enterococcus faecium*), *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ve Gram negatif *Pseudomonas fluorescens* bakterilerine karşı inhibisyon zonları elde edilmiştir (Valore et al. 1996; Abdel-Mohsei et al. 2011; Aliahmadi et al. 2012; Liu et al. 2012; Mirzaee et al. 2021).



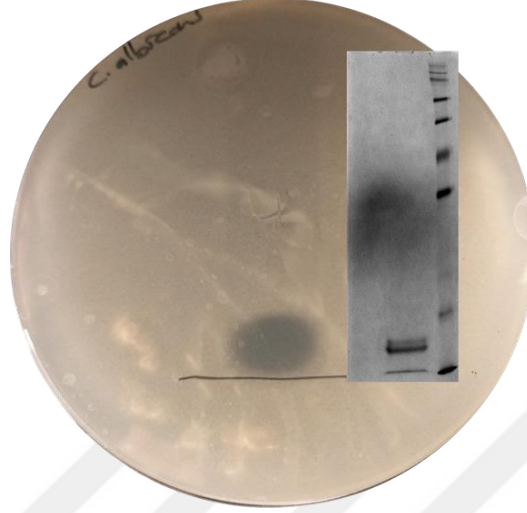
Şekil 4.8. *S. aureus* jel kapama testi sonucu



Şekil 4.9. *E. coli* jel kapama testi sonucu

Jel kapama testinde tüm bakteriler ve *C. albicans*'a karşı oluşan inhibisyon jelin en altında bulunan 3 peptit çevresinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). Benzer şekilde SDS-PAGE jelinde de belirtilen kDa aralığında bantlar görülmüştür. Bunun sonucunda peptit ekstraktının inhibisyon zonu görülen patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki eden en az bir peptit içerdiği belirlenmiştir. Bu test sonucuyla birlikte disk difüzyon testi sonucu da doğrulanmıştır. *C. albicans*'a karşı disk difüzyon testinde inhibisyon etkisi görülmezken jel kapama ve mikrodilüsyon testinde inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Bu sonuç agarlı besiyeri üzerinde *C. albicans* çoğalmasının daha fazla

olması nedeniyle disk difüzyon testinde fazla sayıda patojene karşı bir inhibisyon zonunun belirgin olarak görülememesinden kaynaklanmıştır.



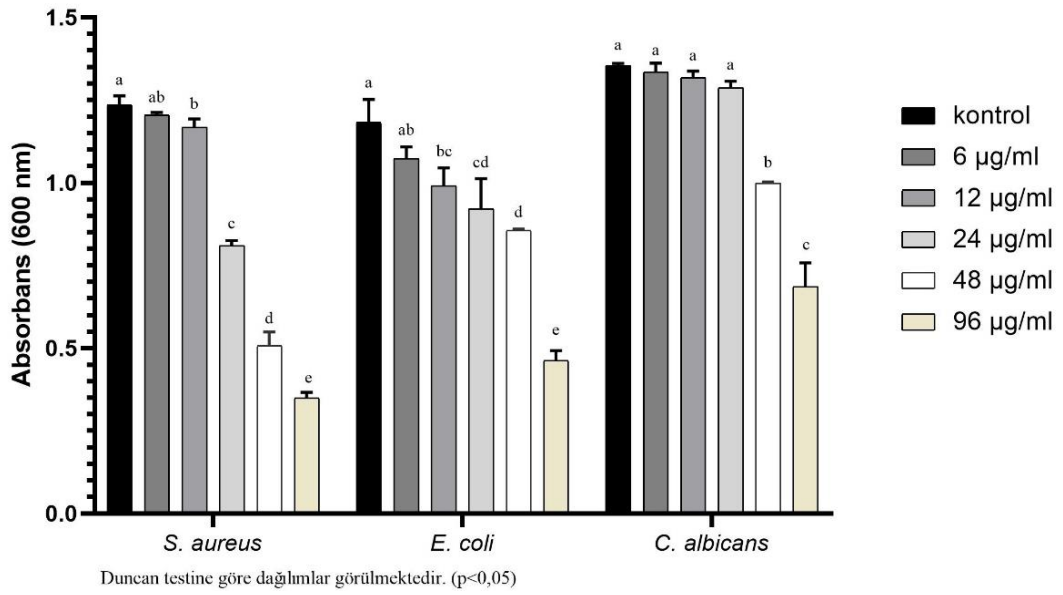
Şekil 4.10. *C. albicans* jel kapama testi sonucu

4.2.3. Mikrodilüsyon testi

Mikrodilüsyon testi antimikrobiyal ajanlar için standart bir antimikrobiyal özellik belirleme testidir (Jorgensen et al. 2009). Bu test mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıklarını belirlemek için uygulanır. Mikrodilüsyon testinde mikroorganizmaya belirli bir molekülün artan konsantrasyonlarının muamelesi yapılır ve sonucunda molekülün etkili olduğu konsantrasyonlar belirlenir (Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher 2021). Bu çalışmada mikrodilüsyon testi peptit ekstraktının farklı mikroorganizmalara karşı inhibisyon etki gösterip göstermediği ve artan konsantrasyonlarda etkisinin nasıl değiştiğini belirlemek için uygulanmıştır. Çalışma kapsamında yukarıda belirtilen 3.1.1’de belirtilen patojen mikroorganizmalar kullanılmıştır. Belirtilen patojen mikroorganizmalara artan miktarda peptit ekstraktı (6, 12, 24, 48 ve 96 µg/ml) ile muamale edildikten 24 ve 48 saat sonrasında mikroorganizma gelişimleri OD₆₀₀ ölçümüyle belirlenmiştir. *R. solanocearum* ve *A. tumefaciens* için bir inhibisyon etkisi görülmemiştir.

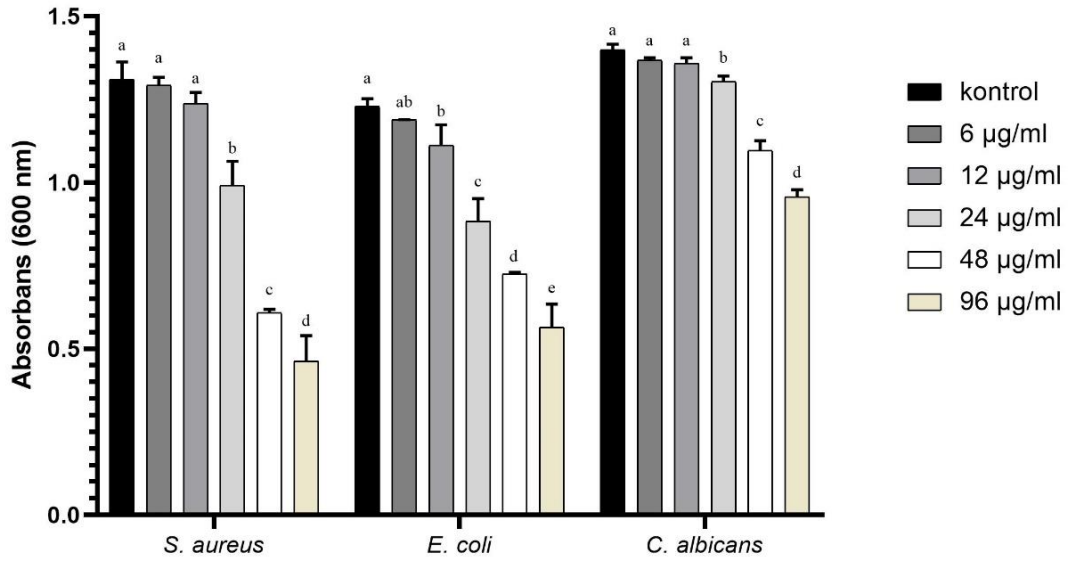
Peptit ekstraktı muamelesinden 24 saat sonra ölçülen OD₆₀₀ değerlerine göre tüm mikroorganizmalarda en yüksek etki 48 ve 196 µg/ml muamelesinde görülmüştür (Şekil

4.11). En yüksek inhibisyon ise %72 inhibisyon oranıyla *S. aureus*'a karşı 96 µg/ml muamelesinde olduğu görülmüştür. 24 saat sonra 96 µg/ml muamelede *E. coli*'de %63 ve *C. albicans*'ta ise %48 oranında bir inhibisyon olduğu hesaplanmıştır. 48 µg/ml muamelede ise *S. aureus*'ta %60, *E. coli*'de %25 ve *C. albicans*'ta %25 oranında inhibisyon etkisi hesaplanmıştır. Elde edilen inhibisyon oranlarına göre en fazla antimikrobiyal etkinin *S. aureus*'a karşı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11. 24 saat sonra mikrodilüsyon testi sonuçları

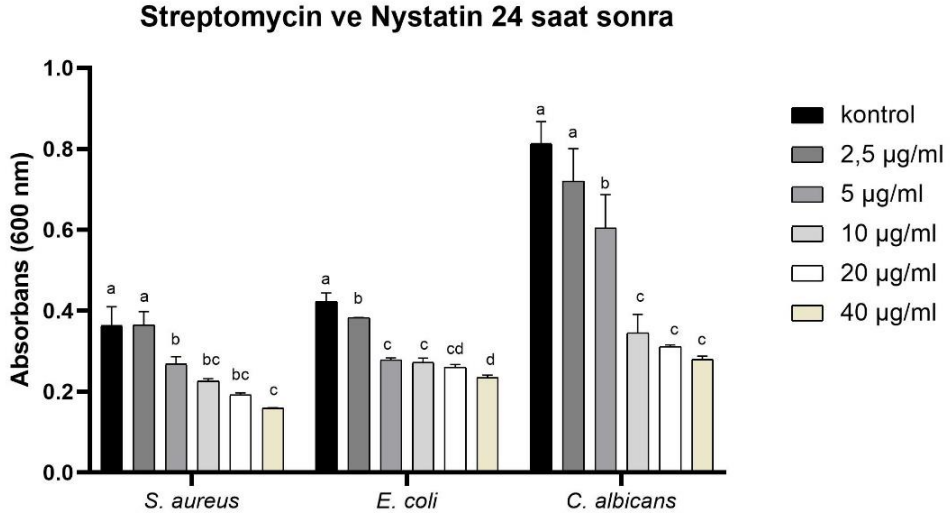
48 saat sonra alınan ölçümlerde ise yine en yüksek inhibisyon 96 µg/ml muamelede *S. aureus*'a karşı görülmüştür. Bu konsantrasyonda patojen gelişimlerine bakıldığında *S. aureus*'ta %65, *E. coli*'de %53 ve *C. albicans*'ta %32 oranında inhibisyon etkisi hesaplanmıştır. Benzer olarak 48 µg/ml peptit ekstraktı muamelesinde *S. aureus*'ta %54, *E. coli*'de %41 ve *C. albicans*'ta %21 oranında inhibisyon etkisi olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre 48. saatte inhibisyon etkisi devam etmesine rağmen *C. albicans* için bu etki azalmıştır. Bunun aksine *E. coli* için inhibisyon oranı özellikle 48 µg/ml peptit ekstraktı muamelesinde artış görülmüştür. Yine 24 saat sonraki inhibisyonunda olduğu gibi 48 saat sonunda da en yüksek inhibisyon etkisinin *S. aureus*'a karşı olduğu belirlenmiştir.



Duncan testine göre dağılımlar görülmektedir. ($p < 0,05$)

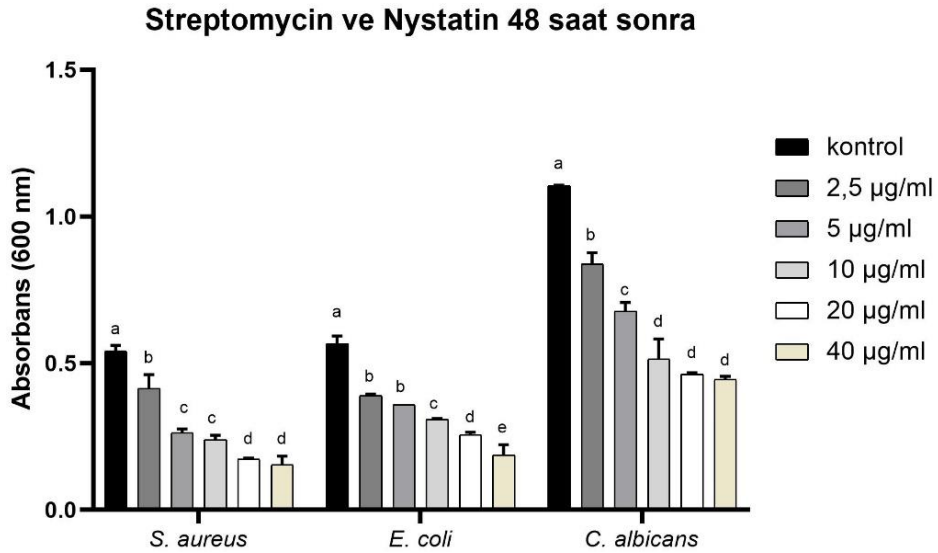
Şekil 4.12. 48 saat sonra mikrodilüsyon testi sonuçları

Peptit ekstraktının belirtilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan pozitif kontrol olan streptomycin (balteriler için) ve nystatin (funguslar için) (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14) ile karşılaştırıldığında benzer inhibisyon etkisinin olduğu söylenmiştir. Şekil 4.13'ye göre 24 saat sonunda tüm patojenler için en yüksek inhibisyon etkisinin 20 ve 40 µg/ml streptomisin ve nystatin muamelelerinde görülmüştür. Sadece *C. albicans*'a muamele edilen nystatin 40 µg/ml muamelede %66 ve 2 µg da ise %61 inhibisyon sağlanmıştır. Peptit ekstraktının 96 µg/ml muamelesi ile karşılaştırıldığında 20 ve 40 µg/ml nystatinin etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. Streptomisin muamele edilen bakteri patojenlerinden *S. aureus* için 20 ve 40 µg/ml muamelelerinde sırasıyla %56 ve %46 oranında inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Peptit ekstraktının 48 ve 96 µg/ml (sırasıyla %54 ve 65) muamelesine göre *S. aureus*'a karşı streptomisin 20 ve 40 µg/ml muamelesinden daha fazla inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir. Benzer olarak *E. coli* için de peptit ekstraktının 48 ve 96 µg/ml muamelesinde elde edilen inhibisyon oranının streptomisine (20 ve 40 µg/ml) göre daha fazla olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.13. Pozitif kontrol olan streptomisin ve nystatinin 24 saat sonunda patojenler üzerine etkisi.

Pozitif kontrol muamelesinde 48 saat sonunda tüm patojenlerde inhibisyon devam ederken 40 µg/ml muamelede *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı inhibisyon oranının (%85 ve 67) artış olduğu görülmüştür. *C. albicans* içinse inhibisyon oranında (%60) azalma olmuştur. Tüm patojenler için inhibisyon etkisi 20 ve 40 µg/ml muamelelerde 48. saatte peptit ekstraktından daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Pozitif kontrol olan streptomisin ve nystatinin 48 saat sonunda patojenler üzerine etkisi.

Daha önce yapılan çalışmalarda kültür veya peptit ekstraktları için mikrodilüsyon testleri çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı uygulanmıştır. Örneğin; bir yumuşakça olan *Olivancillaria hiatula*'dan elde edilen peptit ekstraktının gram pozitif olan *S. aureus* ve *Enterococcus faecalis* ve gram negatif *E. coli*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Gasu et al. 2018). Bir diğer çalışmada kuzukulağıgillerden olan ravent bitkisinden elde edilen ekstraktın beslenmeye dahil edildiğinde hepatik inflamasyonunu önlediğini ve mikrobiyotanın değişimine etki ettiğini belirlenmiştir (Neyrinck et al. 2016). Bir diğer benzer çalışmada, Lactobacilli kültürlerinden elde edilen peptit ekstraktının *Helicobacter pylori*'nin farklı klinik izolatlarına karşı inhibisyon etkisi mikrodilüsyon testi ile belirlenmiştir (Vuyst et al. 2010). Verilen farklı çalışmalarda bu çalışmada da olduğu gibi elde edilen peptit ekstraktları çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal özellikler göstermiştir. Bu özelliklerin belirlenmesi gelişen ve yayılan antnibiyotik dirençlerine karşı alternatif çözümler üretebilmenin bir parçası olması açısından önem taşımaktadır.

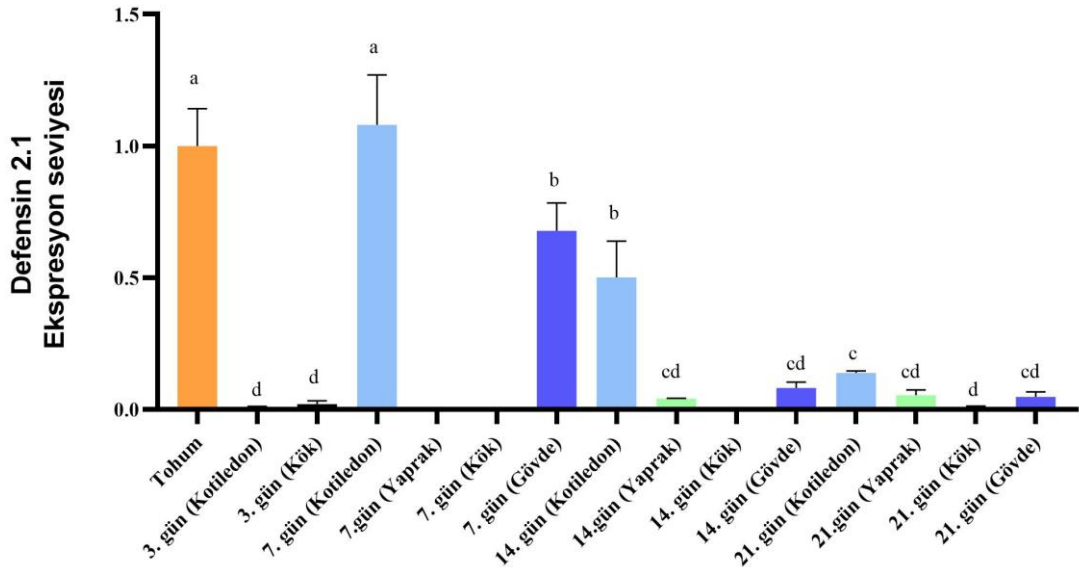
4.3. *M. sativa* Defensin 2.1 gen ekspresyonu

LC-MS/MS ile *M. sativa* Defensin 2.1 AMP'sinin tanınması yapıldıktan sonra, bu peptidin *M. sativa* (Sazova çeşidi) gelişim aşamalarında üretilip üretilmediği veya ne kadar üretildiği qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem 3, 7, 14 ve 21. günlerde *M. sativa* yaprak kotiledon, gövde ve kök kısımları için uygulanmıştır. Bitki gelişim sürecinde 3. gün kotiledonlar ve primer kök bulunmaktadır. Büyüme 7 güne geldiğinde kotiledon, gövde, yaprak ve kök kısımları oluşmuştur (Şekil 15). 14 ve 21. günlerde oluşan bitki organlarının gelişimleri gözlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 4.15. *M. sativa* Sazova çeşidinin 21 günlük gelişimi

M. sativa'dan 3, 7, 14 ve 21. günlerde toplanan örneklerde Defensin 2.1 gen ekspresyonu değişimleri incelenmiştir. qPCR sonuçlarına göre (Şekil 4.16) en yüksek ekspresyon seviyesi 7. gün kotiledonlarında, ikinci en yüksek ekspresyon seviyesi ise tohumda hesaplanmıştır. 7. günden sonra kotiledonlarda gen ekspresyonu azalırken, 3. günden itibaren az da olsa köklerde gen ekspresyonu seviyesinde artış görülmüştür. Diğer yandan bitki gövdesindeki gen ekspresyonu 7. günde en fazlayken ilerleyen günlerde azaldığı görülmüştür. Gen ekspresyonu verileri göstermiştir ki bitkinin ilk gelişim zamanlarında Sazova Defensin 2.1 gen ekspresyonu fazla iken gelişimin ileri safhalarında azalmıştır.



Duncan testine göre dağılımlar gösterilmektedir. ($p < 0,05$)

Şekil 4.16. *M. sativa* gelişim sürecinde çeşitli organların gen ekspresyon seviyeleri

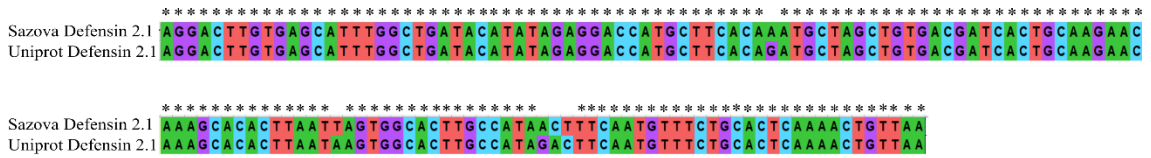
Defensinler sürekli veya bir uyarana bağlı olarak bitkilerin farklı organlarında üretilirler (Tam et al. 2015). Defensinler diğer AMP'ler gibi doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olmakla birlikte patojenlere karşı savunmanın ilk aşamasında görev alırlar. Sürekli üretilen AMP'ler ise patojen saldırılarına karşı bir bariyer oluşturması açısından önemlidir. El-Shehawi et al. (2016) altı farklı defensin geninin üretildiği bitkilerin çiçek tomurcuğu ve yapraklarındaki gen ifadesi seviyelerini araştırmışlardır. Çalışmalarında defensin genlerinin ifadelerinde farklılık olmasına rağmen bir uyarın olmadan üretildiğini gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Solanum lycopersicum*'un (domates) kök, gövde, yaprak, tohum gibi farklı organlarında Snakin-2 AMP'sinin gen ekspresyonunun değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Herbel et al. 2017). Bu çalışmada ise tanımlanan *M. sativa* (Sazova) Defensin 2.1'in bitkinin gelişim aşamalarında farklı organlarda ekspresyonunun değişiklik gösterdiğini ve sürekli eksprese edildiğini açığa çıkarılmıştır.

AMP ekspresyonunun sürekli olması innate immune içinde patojenlere karşı bir bariyer oluşturduğu anlamına gelmektedir. Örneğin, bir çalışmada köpekgillerin normal deri epiteli hücrelerinden alınan örneklerle 65 farklı hipotetik AMP'nin ekspresyonunu belirlenmiştir (Wingate et al. 2008). Belirlenen gen seviyeleri deri hücrelerinin

enfeksiyonun ilk aşamasında bağışıklığa katkı yaptığı belirtilmiştir. Çeşitli çalışmalarda da AMP'lerin normalden fazla eksprese edilmesi sonucunda belirli hasatalıklara karşı da dayanıklılık sağladığı gösterilmiştir (Rivero et al. 2012; Garcia et al. 2014; Deb et al. 2020).

4.4. *M. sativa* Defensin 2.1 Gen Analizi

Sanger sekans analizinden sonra elde edilen sekans NCBI BLAST online programı ile NCBI veri tabanındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Bu incelemede NCBI veri tabanında bulunan *M. sativa* Defensin 2.1 gen sekansı ve Sazova çeşidine ait sekans arasında %97 oranında benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Bu diziler arasında Sazova çeşidinden elde edilen sekansta 49. bazda adenin (A) bulunuyorken NCBI dizisinde guanin (G) bulunmaktadır. Benzer olarak NCBI verisinden farklı 93. bazda A yerine timin (T) bazı bulunmaktadır. Sekanslar karşılaştırıldığında 100. bazda Sazova çeşidinde ve 113. bazda ise NCBI sekansında boşluk olduğu görülmüştür. Ancak her ikisinde de birer boşluk varlığından dolayı bu durum tüm sekans uzunluğunda bir değişime sebep olmamıştır.



Şekil 4.17. NCBI veri tabanında bulunan *M. sativa* Defensin 2.1 kodlanan sekans ve Sazova çeşidindeki sekans karşılaştırması.

LC-MS/MS ile belirlenen hipotetik AMP olan *M. sativa* (UniProt) Defensin 2.1 46 amino asitten oluşmaktadır. Gen sekans analizi sonucunda Sazova Defensin 2.1 de 46 amino asitten oluşmaktadır. Yapılan amino asit sekans karşılaştırması sonucunda Şekil 4.21'de görülen baz değişimleri sonucunda amino asit dizisinde de farklılık meydana geldiği belirlenmiştir. Diziler arasında 3 amino asit farklılığı görüldü (Şekil 4.18). 17. sıradaki amino asit aspartik asit (D) yerine asparajin (N) amino asidine dönüşmüştür (Şekil 4.18). Benzer olarak 37. amino asitte arjinin (R) yerine asparajin ve 38. amino asit ise lösin (L) yerine fenilalanin gelmiştir.

Bitki türlerinin çeşitleri arasında genomlarında veya üretilen proteinlerin sekanslarında bir farklılık olması olasılığı beklenen bir durumdur. Genetik farklılıklar bitkilerin kuraklık, soğuk ve patojenler gibi çeşitli streslere karşı duyarlılıklarını da belirlemektedir (Eckardt 2002). Bir türün çeşitleri arasında dizi farklılıkları olabildiği gibi bunun sonucu olarak gen ifadelerinde de değişiklikler meydana gelmektedir (Lopez et al. 2021, Palacıoglu et al. 2023). Bu tez çalışmada *M. sativa*'nın yerel bir çeşidi olan Sazova kullanılarak gen dizisi elde edilmiştir ve *M. sativa* Defensin 2.1'e ait NCBI'da bulunan veriler ile karşılaştırılması sonucunda Sazova çeşidindeki Defensin 2.1 için sekans farklılıkları ortaya çıkarılmıştır.

Sazova Defensin 2.1 RTCEHLADTYRGPCTNASCDHCKNKAHLISGTCHNFCFCFTQNC
Uniprot Defensin 2.1 RTCEHLADTYRGPCTDASCDHCKNKAHLISGTCHRLQCFCTQNC

Şekil 4.18. *M. sativa* Sazova Defensin 2.1 ve Uniprot Defensin 2.1 amino asit sekans karşılaştırması.

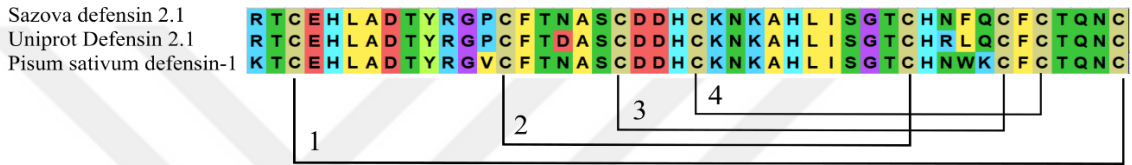
Sazova Defensin 2.1 için ADP ve NCBI veritabanlarındaki aramalarda farklı AMP sekanslarıyla benzerlikleri belirlenmiştir (Şekil 4.19). Veritabanlarına göre AMP'lerden *Pisum sativum* defensin-1 (Almeida et al. 2002) ile %91,3 oranında en yüksek benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. *Vigna radiata* defensin 2 (VrD2) (tohumdan) ile %70,21, *V. unguiculata* tohumunda bulunan pSAS10 defensini ile %68,09, *Phaseolus vulgaris* tohumundan tanımlanan Pv-defensin ile %67,35 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu AMP'ler (*M. sativa* da dahil olmak üzere) Fabaceae ailesine ait farklı cins ve türlerdeki canlıların tohumlarında bulunan AMP'lerdir. Ayrıca tüm benzerlik gösteren AMP'lerden *P. sativum* defensin-1 46 ve diğerleri 47 amino asit içermektedir.

*** * * * * * * * * * * * * * * * *
Sazova Defensin 2.1 RTCEHLADTYRGPCTNASCDHCKNKAHLISGTCHNFCFCFTQNC
Uniprot Defensin 2.1 RTCEHLADTYRGPCTDASCDHCKNKAHLISGTCHRLQCFCTQNC
Pisum sativum defensin-1 KTCENLADTYRGPCTNASCDHCKNKAHLISGTCHNWKCFCTQNC
VrD2 KTCENLADTYRGPCTTGS CDHCKNKEHLRSGRCDDFRCWCTRNC
pSAS10 KTCENLADTYRGPCTTGS CDHCKNKEHLRSGRCDDFRCWCTRNC
Pv-Defensin KTCENLADTFRGPCTFASNCDDHCKNKEHLRSGRCDDFRCWCTRNC

Şekil 4.19. Sazova Defensin 2.1 ile benzer olan AMP'lerin sekans karşılaştırması

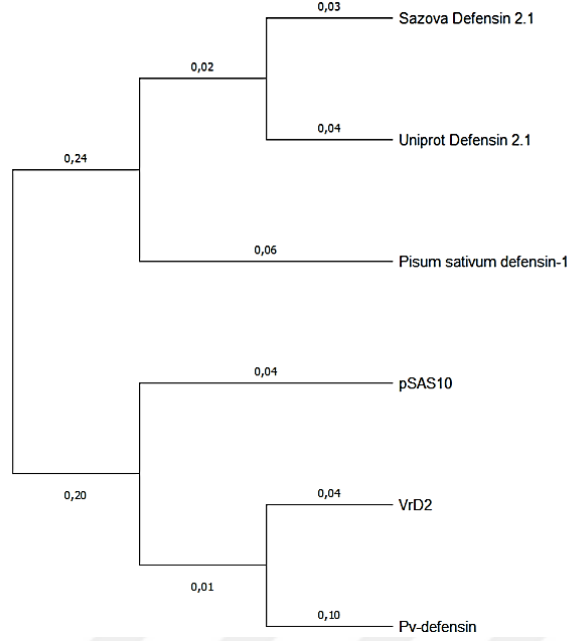
Sazova Defensin 2.1'in *P. sativum* defensin-1 ile sekanslarında bulunan sistein kalıntıları karşılaştırıldığında bu sisteinlerin sayısında ve sırasında bir değişiklik olmadığı ve bu sebeple kurulacak difülit köprülerinde de bir değişiklik görülmüştür

(Şekil 4.20). Disülfid köprüleri tersiyer yapıda da gösterilmiştir. ADP veri tabanına göre *P. sativum* defensin-1 antifungal bir AMP'dir ve *C. albicans*'a karşı inhibisyon etki göstermektedir. Diğer yandan Sazova Defensin 2.1 ile %70 benzerliğe sahip olan VrD2 AMP'si antibakteriyel ve antifungal etki göstermektedir. Pv-defensin ise gram (+) ve (-) bakterilere antibakteriyel etkisi vardır. Bitki AMP'lerinin birçoğu antifungal ve antibakteriyel özelliği bir arada gösterebilmektedir (Liv et al. 2021, Bakare et al. 2022). Örneğin *M. sativa*'dan saflaştırılan antifungal defensin olan MsDef1 *Pseudomonas syringe pv tabaci* ve *Ralstonia solanacearum* ve *Xanthomonas campestris* karşı antibakteriyel etki de göstermektedir (Deb et al. 2020).



Şekil 4.20. Sazova Defensin 2.1 ve *P. sativum* defensin-1 disülfid köprüleri

Şekil 4.19'te verilen AMP sekansları için MEGA11 programı kullanılarak Filogenetik ağacı elde edilmiştir. Filogenik ağaç oluşturmak için "Neighbor-Joining" metodu kullanılmıştır. Filogenik ağaca göre Sazova Defnsin 2.1 ve UniProt Defensin 2.1 ile evrimsel olarak en yakın olan ve yüzde olarak da en çok benzerliğe sahip AMP *P. sativum* defensin-1 olduğu görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Taksonların evrimsel ilişkileri. Evrimsel tarih, Komşu Birleştirme yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır (Saitou and Nei 1987). Evrimsel mesafeler Poisson düzeltme yöntemi (Felsenstein 1985) kullanılarak hesaplanmıştır ve birimi bölge başına düşen farklı amino asit sayısıdır. Bu analiz 6 amino asit dizisini içeriyordu. Her dizi çifti için tüm belirsiz konumlar kaldırılmıştır (çift yönlü silme seçeneği). Nihai veri setinde toplam 47 pozisyon vardı. Analizler evrimsel MEGA11'de yapılmıştır (Tamura et al. 2021).

4.5. Biyoinformatik Analizler

4.5.1. Fizyokimyasal özellikler

Karakterizasyonun yanısıra hipotetik proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarının *in silico* yaklaşımlarla desteklenmesi önem arz etmektedir. *In silico* araçlar deneysel araştırmalar için bir ön çalışma olabildiği gibi bazı araçlarla veri analizi sağlanmaktadır (Amberg 2013). Bu çalışmada çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak LC-MS/MS ile belirlenen hipotetiksel AMP'nin *in silico* analizleri yapılmıştır.

İlk olarak Sazova çeşidinden elde edilen dizinin farklı fizyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla çevrimiçi bir program olan Expasy Protparam ve ADP-AMP “Calculator and Predictor” araçları kullanılmıştır. Tüm bu özellikler Uniprot Defensin 2.1

ve Sazova Defensin 2.1 için karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu grafiğe göre Uniprot veritabanında bulunan hipotetik Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 aynı amino asit sayısına sahipken amino asit dizisindeki farklılıklar molekül ağırlıklarının olmasına sebep olduğu görülmüştür. Yine amino asit dizisinde meydana gelen değişiklikler sonucunda Defensin 2.1 AMP’sinin içerdiği pozitif ve negatif yüklü amino asit sayısı azalmasına rağmen net yükü değişmemiştir.

İnstability indeks II proteinlerin test tüpündeki stabilitesini belirlemek için kullanılan bir değer olmakla birlikte bu değer proteinlerin içerdiği belirli diziler sayesinde belirlenir (Guruprasad et al. 1990). Bu değer 40’tan büyük ise protein stabil değil, eğer bu değer 40’tan küçük ise protein stabil anlamına gelmektedir (Guruprasad et al. 1990). Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi Uniprot Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 için hesaplanan insatbility indeks II her iki protein için de 40 değerinden küçük olduğundan iki proteinin de stabil olduğu anlamına gelmektedir. Bu değer aynı zamanda *in vivo* yarılanma süresini de etkilememiştir. Her iki AMP dizisi için hesaplanan yarılanma süresi memeli hücrelerinde 1 saat, mayada 2 dk ve *E. coli*’de ise 2 dk’dır. Önceki çalışmalarda *in silico* olarak AMP ve diğer protein dizileri için instability indeks II değerleri hesaplanmıştır (Ramathan and Sethumadhavan 2011; Enany 2014; Dziuba and Dziuba 2014; Sunil et al. 2021; Rahman et al. 2023). Örneğin, *Trichogramma chilonis*’e ait 6515.76 Da molekül ağırlığına sahip bir AMP için *in silico* analizlerde stability indeks II değeri 32,71 olarak hesaplanmıştır (Sunil et al. 2021). Ayrıca SARS-CoV ile ilişkili hipotetik Q6S8D9_SARS kodlu bir protein için yapılan *in silico* çalışmada da instability indeks II 26,67 olarak hesaplanmıştır (Rahman et al. 2023). Benzer olarak, süt proteinlerinden türetilmiş potansiyel AMP’ler için *in silico* olarak instability indeks belirlenmiştir. Bu AMP’lerin %51’inin instability indeks II değerinin 40’ın altında olduğu belirlenmiştir (Dziuba and Dziuba 2014).

Çizelge 4.1. Uniprot Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 için karşılaştırmalı fizyokimyasal özellikler.

Fizikokimyasal Özellik	Uniprot Defensin 2.1	Sazova Defensin 2.1
Amino asit sayısı	46	46
Molekül Ağırlığı (Da)	5.204,85	5.195,79
Teoriksel pI	7,02	7,03
Negatif yüklü amino asit sayısı	5	4
Pozitif yüklü amino asit sayısı	5	4
Net yük	+1	+1
İnstability İndeks (II)	25,96	17,48
Alifatik İndeks	40,43	31,96
Hidropatisity (GRAVY)	-0,598	-0,598
Boman İndeks (kcal/mol)	2,54	2,36

Alifatik indeks bir proteinin yan zincirinde bulunan alanin, valin, izolösin ve lösin amino asitlerinin bağıl hacmi olarak tanımlanır. Alifatik indeks globular proteinlerde termostabilite ile ilişkilendirilir (Ikai 1980). Sazova Defensin 2.1'in tohumdan izolasyonu sırasında total protein 10 dk süreyle 85 °C sıcaklığa maruz bırakıldıktan sonra antimikrobiyal testler gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal testlerde Sazova Defensin 2.1'in aktif olması da bu defensinin termostabil olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi alifatik indeks olarak UniProt Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 için birbirinden farklı ve hipotetik peptit için daha yüksektir. Bu sebeple alifatik indekse göre her iki peptit dizisinin de termostabil olduğu ancak Uniprot verisindeki peptit dizisinin daha termostabil olduğu söylenmiştir.

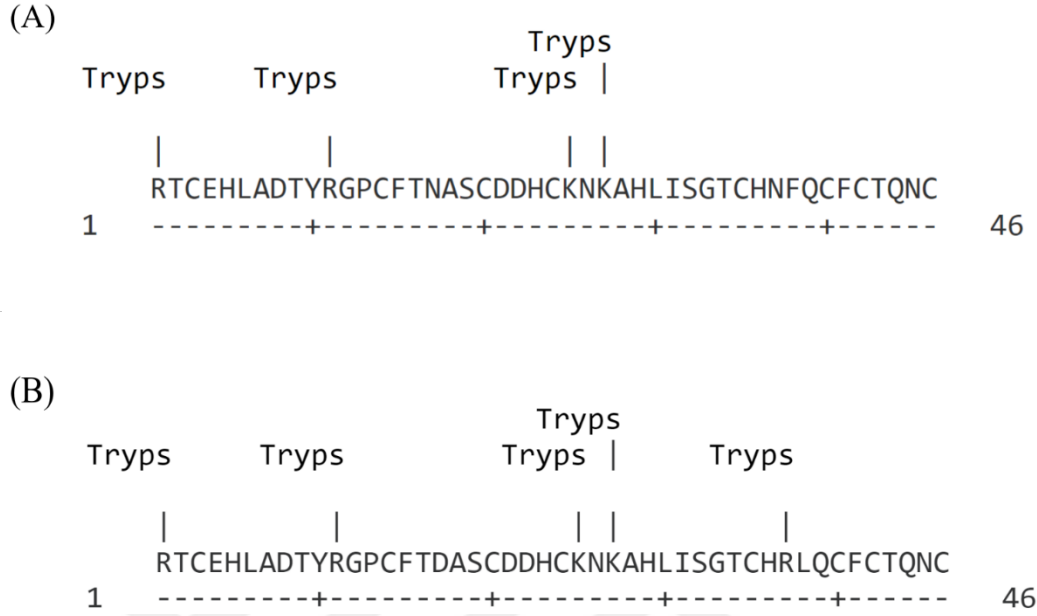
Hidropatisity (GRAVY) proteinlerin hidrofilik veya hidrofobik olduğunu belirlemek için kullanılan bir değerdir. Bu değer pozitif ise hidrofobik, negatif değer ise hidrofilik özellik taşımaktadır. Bu değerın büyüklüğü ise ne kadar hidrofilik veya hidrofobik bir protein olduğunu belirtmektedir (Kyte and Doolittle 1982). Bu çalışmada ise her iki peptit dizisi de aynı GRAVY değerine sahiptir ve negatif değere sahip oldukları için hidrofilik oldukları belirlenmiştir.

UniProt Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 amino asit dizileri ile ADP veritabanında bulunan AMP “Calculator and Predictor” aracıyla bu dizlerin özellikleri belirlenmiştir. Bu araç peptit dizileri için Boman indeksini de vermektedir. Boman indeksi bir proteinin başka bir proteine bağlanma potansiyelini tahmin etmek için kullanılan bir değerdir (Boman 2003). Yüksek Boman indeksi değeri AMP’nin multifonksiyonel olduğunu veya çeşitli proteinlerle etkileşebilmesi nedeniyle hücre içinde farklı rollerde görev aldığını göstermektedir (Boman 2003). UniProt Defensin 2.1 için Boman indeks değeri 2,54 kcal/mol ve Sazova Defensin 2.1 için bu değer 2,36 kcal/mol’dür. Boman indeksi açısından iki peptit arasında belirgin bir farklılık olmamasına rağmen UniProt Defensin 2.1 için daha farklı görev alabileceği söylenmiştir. Sazova Defensin 2.1 dizisine %91 oranında benzer olan *P. sativum* defensin-1 için ADP veritabanında Boman indeksi 2.08 olarak belirlenmiştir ve *M. sativa* Sazova çeşidinde bulunan Defensin 2.1 AMP’sinin bu defensine göre daha fazla işlevinin olduğu söylenmiştir. *P. sativum* defensin-1 ile UniProt Defensin 2.1 arasında ise %87 oranında bir benzerlik olduğu yine ADP veritabanındaki karşılaştırma ile belirlenmiştir.

4.5.2. Tripsin kesimi karşılaştırma

M. sativa Uniprot defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 amino asit dizilerinde Şekil 4.18’de görüldüğü gibi 3 farklı amino asit vardır. Bu amino asitlerden Uniprot defensin 2.1’de R olan amino asidin Sazova Defensin 2.1’de N ile değişmesinden dolayı tripsin kesim noktasını etkilediği belirlenmiştir. Uniprot defensin 2.1 amino asit dizisindeki 5. tripsin kesim noktası Sazova Defensin 2.1’de yer almamaktadır (Şekil 4.22). LC-MS/MS yöntemi için gönderilen örnek *M. sativa* Uniprot defensin 2.1 ile 2 farklı peptit çakışması tespit edilmiştir. Gönderilen örnek (Sazova Defensin 2.1) tripsin kesim noktası

bakımından eksik olduğu için LC-MS/MS yönteminde tespit edilememesi beklenen bir durumdur.



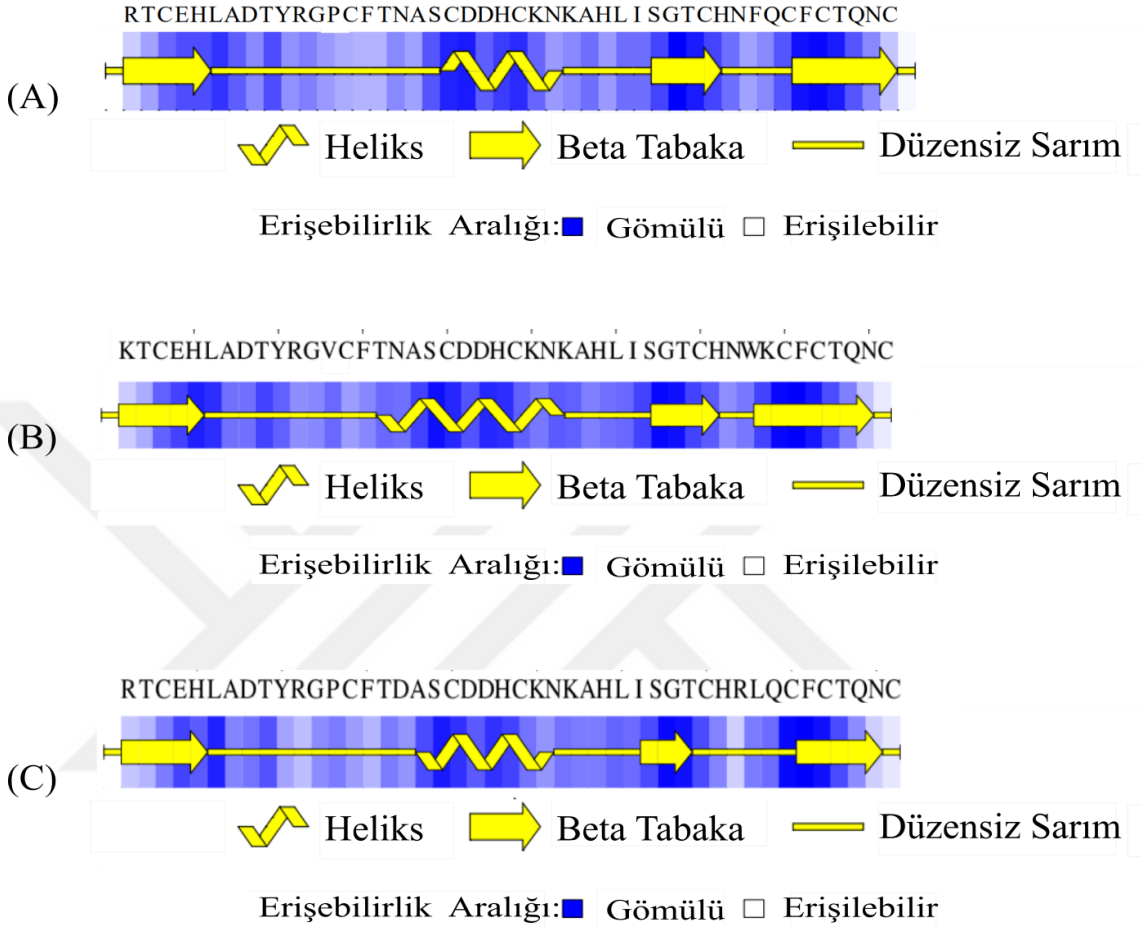
Şekil 4.22. Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot defensin 2.1 (B) tripsin kesim noktaları

Tripsin kesim noktalarındaki farklılık kesim sonucunda oluşan peptitler birbirinden farklıdır. Sazova Defensin 2.1 için tripsin kesimi ile “R”, “TCEHLADTYR”, “GPCFTNASCDDHCK”, “NK” ve “AHLISGTCHNFQCFCTQNC” peptitleri oluşurken Uniprot defensin 2.1 için “R”, “TCEHLADTYR”, “GPCFTDASCDDHCK”, “NK”, “AHLISGTCHR” ve “LQCFCTQNC” peptitleri ortaya çıkmıştır. LC-MS/MS sonucunda Uniprot defensin 2.1 ile uyuşan “TCEHLADTYR” ve “GPCFTDASCDDHCK” peptitleri her iki sekans için ortaktır.

4.5.3. Sekonder yapı

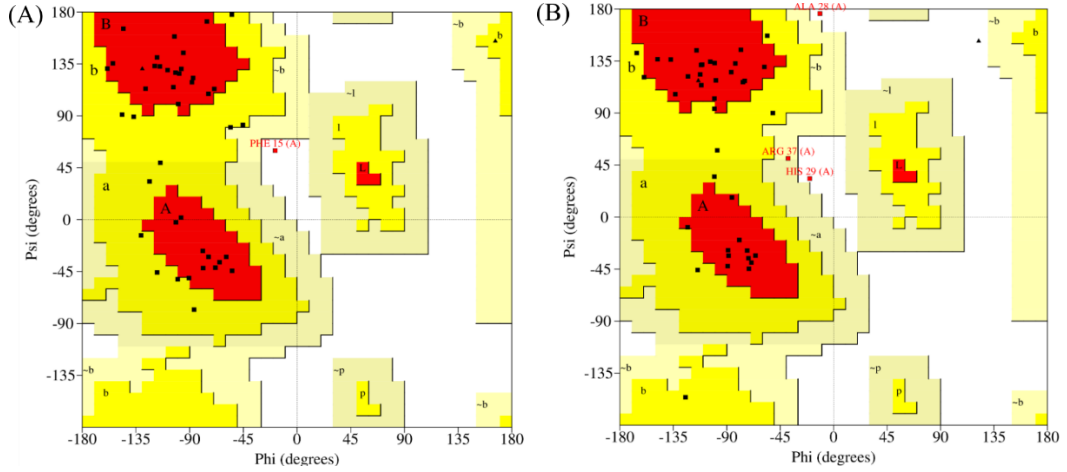
Sekans analizinden sonra belirlenen AMP amino asit dizisine göre *in silico* sekonder yapı tahmin edilmiştir. Sekonder yapı analizi PROCHECK çevrimiçi aracı ile gerçekleştirildikten sonra sekonder yapılar elde edilmiştir (Şekil 4.23A). Şekil 4.23A’ya göre Sazova Defensin 2.1’in sekonder yapıda 1 tane α -heliks ve 3 tane β -tabaka olduğu görülmüştür. Sazova Defensin 2.1 ADP veritabanında yapılan karşılaştırmaya göre *P. sativum* defensin-1 ile %91 benzerliğe sahiptir. *P. sativum* defensin-1 sekonder yapısında da 1 tane α -heliks ve 3 tane β -tabaka içermektedir (Şekil 4.23B). Daha önce *P. sativum*

defensin 1 ile yapılan çalışmada belirlenen sekonder ve teyrsiyer yapıları (Almeida et al. 2002) bu program ile elde edilen yapılar aynıdır.



Şekil 4.23. PROCHECK çevrimiçi aracıyla elde edilen Sazova Defensin 2.1'in tahmini sekonder yapısı (A), *P. sativum* defensin-1 sekonder yapısı (B) ve Uniprot Defensin 2.1 sekonder yapısı.

Ramachandran grafiği yapısal stereokimya özelliklerini öngörebilen bir grafikdir. Tahmin edilen protein yapısının doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla Ramachandran grafiği kullanılmaktadır (Yadav et al. 2022). Bu tez çalışmasında kullanılan PROCHECK çevrimiçi aracı proteinin genel modelini analiz ederken amino asit kalıntılarının geometrisini kullanılmıştır ve tahmin edilen bir modelin stereokimyasal kalitesini vermiştir. Şekil 4.24'te görülen PROCHECK'in oluşturduğu Ramachandran grafikleri Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot Defensin 2.1'e (B) aittir.



Şekil 4.24. PROCHECK çevrimiçi aracıyla elde edilen Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot Defensin 2.1 (B) Ramachandran grafiği.

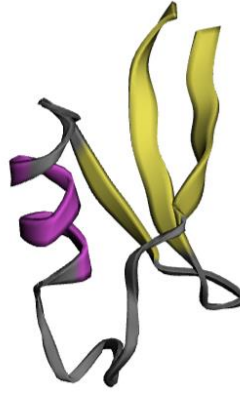
Ramachandran grafiğinde 4 farklı bölge (avantajlı, izin verilen, sıkça izin verilen ve izin verilmeyen) bulunmakla birlikte protein sekansındaki amino asitlerin bulunduğu bölgeye göre sekonder yapı tahmin edilmektedir (Ramachandran 1963, Ramachandran ve Sasisekharan 1968). Ramachandran grafiğinde avantajlı bölge olan A bölgesi sağ el α -heliks, B bölgesi β -tabaka ve L bölgesi sol el α -heliksi temsil etmektedir. Sazova Defensin 2.1 Ramachandran grafiğinde (Şekil 4.24A) avantajlı (favoured region) bölge olan A, B ve L' de %68,3, izin verilen bölge olan a, b, l ve p'de %29,3 ve izin verilmeyen bölge olan beyaz alanda ise %2,4 (fenilalanin-15) oranında amino asit görülmüştür. Uniprot Defensin 2.1 Ramachandran grafiğinde ise avantajlı bölgede %73,2, izin verilen bölgede %19,5, sıkça izin verilen bölgede %2,4 ve izin verilmeyen bölgede %4,9 (alanin-28, histidin-29 ve arjinin-37) oranında aminoasit bulunmaktadır (Şekil 4.24B).

Son yıllarda *in silico* araçların kullanımının yaygınlaşması ve artan bilgyle birlikte daha güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle *in silico* araçların kullanımı artmıştır. Protein çalışmalarında hipotetik proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarının tahmin edilmesi için de çeşitli araçlar mevcuttur ve Ramachandran grafiği de bunlardan biridir. Örneğin *Sorsogona tuberculata*'a ait olan hepcidin antimikrobiyal peptidin sekonder yapısını tahmin etmek, diğer antimikrobiyal peptitlerle olan benzerliğini tespit etmek için çeşitli *in silico* araçlarla (Ramachandran grafiği de dahil olmak üzere) kullanılarak bu özellikler belirlenmiştir (Veedu et al. 2021). Benzer şekilde *Bacillus subtilis*'e ait olan Subtilisin A antimikrobiyal peptidi için de *in silico* değerlendirmeler yapılarak sekonder yapı Ramachandran grafiği ile doğrulanmıştır (Venkatasamy et al. 2021). Diğer yandan,

modifiye edilen proteinlerin sekans ve konformasyonel değişikliklerini belirlemek amacıyla da Ramachandran grafiği kullanılabilmektedir (Moazzezy et al. 2022).

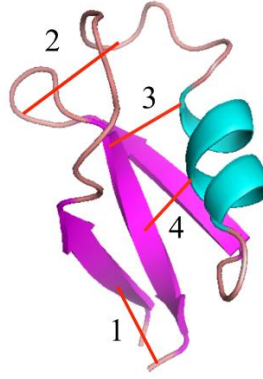
4.5.4. Tersiyer yapı

Proteinlerin 3 boyutlu konformasyonu olan tersiyer yapı proteinin fonksiyonu açısından önemlidir. Tersiyer yapı tek zincirli bir proteinin işlevsel olan formudur. Proteinin primer yapısında bulunan amino asit değişiklikleri işlevsel formunu etkilemektedirler. Bu tez çalışmasında çeşitli çevrimiçi modelleme araçları (Expasy-Swiss-Model, Phyre2 ve PRISPRED kullanılarak Sazova Defensin 2.1 için 3 boyutlu modellemeler yapıldı ve herbirinde aynı sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.25).



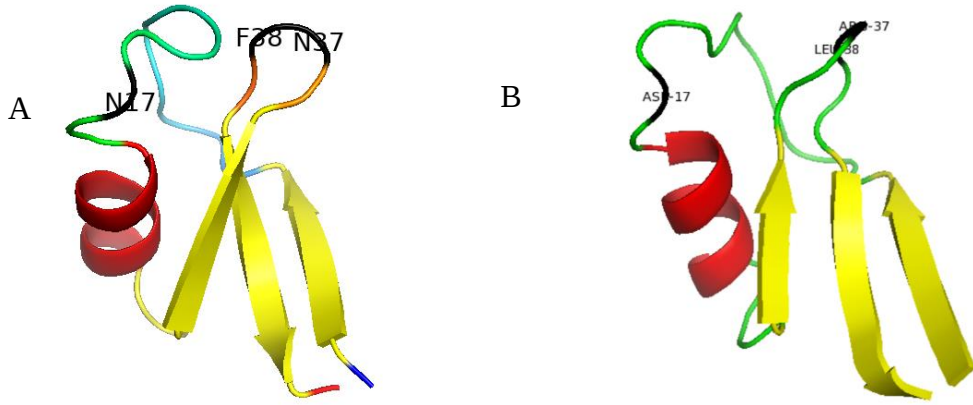
Şekil 4.25. Sazova Defensin 2.1 AMP'sinin tahmini tersiyer yapısı

Disülfid köprüleri proteinlerin dizisinde bulunan sistein amino asitlerinde bulunan thiol grupları arasında kurulan ve tersiyer yapının kurulmasında görevli bağlardır. Proteinlerin yapısında oluşan disülfid köprüleri sayılarının artması prtoeinin stabilitesini artırmaktadır. Sazova Defensin 2.1'in tahmini 3 boyutlu yapısı modellendikten sonra Pymol programı ile disülfid köprüleri Şekil 4.26'da kırmızı renkle gösterilmiştir. Sazova Defensin 2.1 ve UniProt Defensin 2.1'in amino asit farklılıkları tersiyer yapıda rastgele sarım bölgelerindedir (Şekil 4. 27).



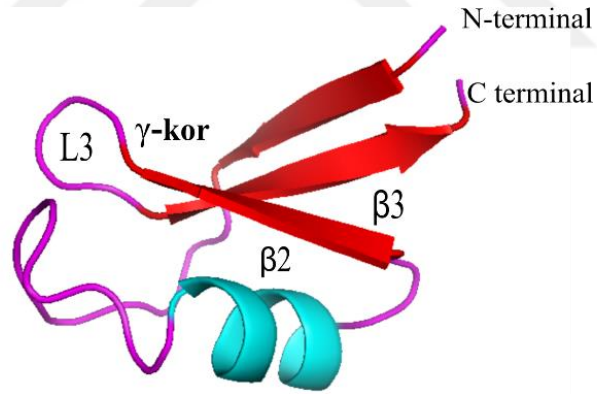
Şekil 4.26. Sazova Defensin 2.1’de bulunan disülfid köprülerinin tersiyer yapıdaki gösterimi.

Son yıllarda biyoinformatik araçların gelişmesi ile protein karakterizasyonu bu araçlar yardımıyla sekonder ve tersiyer yapılar yüksek doğrulukta tahmin edilebilmektedir. Farklı canlıların genomlarından belirlenen antimikrobiyal peptitler için de karakterizasyon *in silico* olarak yapılabilmektedir (Noonan et al. 2017; Duan et al. 2020). Örneğin *Schizothorax richardsonii*’den hepcidin benzeri bir AMP belirlenerek dizi analizi, sekonder ve tersiyer yapıları gösterilmiştir (Chaturvedi et al. 2014). Benzer olarak 127 hipotetik AMP dizileri alınarak ADP veritabanında fizyokimyasal özellikleri belirlenip biyoinformatik araçlarla (PROCHECK, I-TASSER, PEP-FOLD) sekonder ve tersiyer yapıları elde edilmiştir (Okella et al. 2020). Diğer bir çalışmada glikoz taşıyıcı 4 protein (GLUT4) ligand bağlanma özelliklerini belirlemek amacıyla çeşitli tersiyer yapı elde etmek için 3 boyutlu modelleme araçları kullanılıp kanser çalışmalarında teröpatik hedef olarak kullanılması araştırılmıştır (Aruleba et al. 2018). Bu gibi çalışmalar göstermiştir ki biyoinformatik araçların daha da güvenilir olması bir yandan tedavi amaçlı kullanılacak proteinlerin test edilmesini kolaylaştırırken diğer yandan proteomik çalışmalara hız kazandırabilmektedir. Ayrıca biyoinformatik araçların kullanımı deneysel olarak test edilmeden önce bilim insanlarına güvenilir bir öngörü kazandırması ile birlikte laboratuvar malzemesi kullanımı ve zaman açısından tasarruf sağlayacaktır.



Şekil 4.27. *M. sativa* Sazova Defensin 2.1 (A) ve Uniprot Defensin 2.1 (B) arasındaki amino asit farklılıklarının tersiyer yapıdaki gösterimi.

AMP'lerin tersiyer yapısındaki γ -kor motifi tüm disülfid köprüleri içeren antimikrobiyal peptit sınıfları için ortaktır. γ -kor motifi iki antiparalel β -tabakası ve ikisi arasında bağlantı kuran bir ilmek bölgesi içerir. Bitki defensinlerindeki γ -kor motifi X1-3GXCX3-9C şeklindedir (Yount and Yeaman, 2004). Sazova Defensin 2.1 bu sekans içermektedir ve tersiyer yapısındaki γ -kor motifi Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Sazova Defensin 2.1 γ -kor motifi

Bazı yapı-aktivite çalışmaları göstermiştir ki bitki defensinlerinde antifungal ve antimikrobiyal aktivite γ -kor motifine bağlıdır (Sagaram et al. 2011; Ochiai et al. 2018). Ek olarak %65 oranında benzer olan MsDef1 ve MtDef4 defensinlerinde γ -kor motifindeki belirli bölgeler farklı antifungal aktivite göstermelerine katkı sağlamaktadır (Munoz et al. 2014). Sazova Defensin 2.1 ve Uniprot Defensin 2.1 γ -kor motifindeki L3 bölgesinde aminoasit farklılıkları (Şekil 4.27) olduğundan dolayı antimikrobiyal aktivitelerinde de farklılık olması beklenmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *M. sativa* Sazova çeşidine ait tohumlardan termostabil bir antimikrobiyal peptit tanımlanmak istenmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak antimikrobiyal özellikte bir peptit olup olmadığı disk difüzyon testi, mikrodilüsyon testi ve jel kapama testleri ile belirlenmiştir. Jel kapama testinde inhibisyon zonu oluşturduğu düşünülen SDS-PAGE jel bandı LC-MS/MS ile analiz edilerek *M. sativa* Sazova çeşidi tohumundan termostabil özellikte olan Defensin 2.1 antimikrobiyal peptidi tanımlanmıştır.

Sazova çeşidinden tanımlanan Defensin 2.1 amino asit sekansı ve UniProt veri tabanında yer alan sekans arasında 3 amino asit farklılığı belirlenmiştir. Bu farklılık bitki türlerinin çeşitleri arasındaki sekans farklılıkları ile ilişkilendirilmiştir. Sazova Defensin 2.1 için çeşitli *in silico* analizler yapılarak bu yeni peptidin fizyokimyasal özellikleri, sekonder ve tersiyer yapıları belirlenerek benzer AMP'ler ile karşılaştırılmıştır. UniProt Defensin 2.1 ve Sazova Defensin 2.1 arasındaki 3 aminoasit değişikliğinin net yükünü değiştirmedeği görülmüştür. Alifatik indeksleri UniProt Defensin 2.1 için 40,43 iken sazova Defensin 2.1 için 31,96 hesaplanmıştır. Boman indeksleri ise sırasıyla 2,54 ve 2,36 olarak hesaplanmıştır.

Sazova Defensin 2.1' e en yakın AMP ise *P. sativum* defensin-1 olarak belirlendi ve diğer benzer sekansların Fabaceae ailesine ait tohumdan izole edilen AMP'ler olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan bu peptidin sekonder yapısında 1 α -heliks ve 3 β -tabaka olduğu PROCHECK ile gösterilirken Ramachandran grafiği ile bu yapılar doğrulanmıştır. Tersiyer yapısı 3 farklı program (SwissModel, Phyre2 ve PRISPRED) ile tahmin edilmiştir ve tüm programlarda aynı tersiyer yapı elde edilmiştir.

Diğer yandan Sazova Defensin 2.1'in bitki gelişimi süresince (tohum, 3, 7, 14 ve 21. günler) farklı organlarındaki gen ekspresyonu belirlenmiştir. Gen ekspresyon seviyelerinde en yüksek seviyenin 7. gün gövde örneklerinde ve ikinci en yüksek seviye ise tohumda olduğu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle hesaplanmıştır.

Bu tez çalışması ile hipotetik bir protein olan *M. sativa* Defensin 2.1'in *M. sativa* Sazova çeşidindeki gen ve protein sekansı belirlenerek *in silico* araçlarla karakterizasyonu yapılmıştır. Bitkinin gelişiminin 21 günlük periyodundaki farklı organlarındaki gen ekspresyonu belirlenmiştir. Tanımlanan Sazova Defensin 2.1'e 85 °C'de 10 dk ısı uygulaması sonrasında peptidin antimikrobiyal özellik göstermesi sonucunda da bu peptidin termostabil olduğu söylenmiştir.

AMP'lerin doğal kaynaklarından sınırlı miktarda elde edilebilmesi bir dezavantaj olsa da rekombinant teknoloji sayesinde büyük miktarlarda üretilmektedir. Bu tez çalışmasından sonraki süreçlerde Sazova Defensin 2.1'in rekombinant üretimi yapılarak daha fazla miktarda elde edilmesi sağlanmalıdır. Fizyokimyasal özelliklerinde belirlendiği gibi stabil bir yapıda olması sebebiyle de antifungal veya antibakteriyel ilaç olarak kullanılabilmesi açısından avantaj sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında Sazova Defensin 2.1 için yapılan gen ekspresyon analizinde bitkinin gelişimindeki 21 günlük süreçte gen ekspresyonu belirlenmiştir. *M. sativa*'nın fungal veya bakteriyel enfeksiyonu sırasında gen ekspresyonunun seviyesi değerlendirilmelidir. Bu sayede Sazova Defensin 2.1'in gen ekspresyonunun indüklenebilir olup olmadığı belirlenebilir. Diğer yandan bitki defensinlerinin kuraklık, soğuk ve tuzluluk gibi çeşitli stres faktörlerinde düzenleyici roller oynadığı bilinmektedir. Yeni tanımlanan bu AMP'nin bitki stres faktörlerinde bir rolü olup olmadığı da test edilmelidir.

Defensinlerin antimikrobiyal özellik gösterdikleri konsantrasyon aralıklarında memeli hücrelerine toksik olmadığı bilinmektedir ancak yeni tanımlanan her AMP için sitotoksikite ve hemoliz testleri ilk aşamada uygulanmalıdır. Bu testler bir AMP veya bir maddenin ilaç olarak kullanılabilmesindeki ilk aşama testlerindendir. Dolayısıyla klinik testlerde uygulanabilmesi için bu testlere de ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Aboye, T. L., Strömstedt, A. A., Gunasekera, S., Bruhn, J. G., El-Seedi, H., Rosengren, K. J., Göransson, U. 2015. A Cactus-Derived toxin-Like cystine knot peptide with selective antimicrobial activity. *ChemBioChem*, 16(7), 1068-1077.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q.-T., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. 2007. The antifungal activity of RsAFP2, a Plant Defensin from *Raphanus sativus*, Involves the Induction of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. *Microbial Physiology*, 13(4), 243-247.
- Al Saiqali, M., Tangutur, A. D., Banoth, C., Bhukya, B. 2018. Antimicrobial and anticancer potential of low molecular weight polypeptides extracted and characterized from leaves of *Azadirachta indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 906-921.
- Albayrak Turgut, B., Bezirganoğlu, İ. 2022. Foliar application of CaO nanoparticles and salicylic acid on *Medicago sativa* seedlings enhances tolerance against *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 122, 101926.
- Almeida, M.S., Cabral, K.M., Kurtenbach, E., Almeida, F.C., Valente, A.P. 2002. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action *Journal Mol. Biol.* 315: 749–757.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Aruleba, R., Adekiya, T., Oyinloye, B., Kappo, A. 2018. Structural Studies of Predicted Ligand Binding Sites and Molecular Docking Analysis of Slc2a4 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 386.
- Atousa A., 2012. Identification and primary characterization of a plant antimicrobial peptide with remarkable inhibitory effects against antibiotic resistant bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9672-9676.
- Bahar, A., Ren, D. 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Bakare, O. O., Gokul, A., Fadaka, A. O., Wu, R., Niekerk, L.-A., Barker, A. M., Keyster, M., Klein, A. 2022. Plant antimicrobial peptides (PAMPs): features, applications, production, expression, and challenges. *Molecules*, 27(12), 3703.
- Barnes V, L., Heithoff, D. M., Mahan, S. P., House, J. K., Mahan, M. J. 2023. Antimicrobial susceptibility testing to evaluate minimum inhibitory concentration values of clinically relevant antibiotics. *STAR Protocols*, 4(3), 102512.
- Bharat Siva Varma, P., Adimulam, Y. B., Kodukula, S. 2015. *In silico* functional annotation of a hypothetical protein from *Staphylococcus aureus*. *Journal of*

- Bhattacharjya, S., Ramamoorthy, A. 2009. Multifunctional host defense peptides: functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. *The FEBS Journal*, 276(22), 6465-6473.
- Bhunia, A. K., Johnson, M. G. 1992. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, 15(1), 5-7.
- Bloch, C., Richardson, M. 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS Letters*, 279(1), 101-104.
- Bolouri Moghaddam, M. R., Vilcinskis, A., Rahnamaeian, M. 2016. Cooperative interaction of antimicrobial peptides with the interrelated immune pathways in plants. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 464-471.
- Boman, H. G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3), 197-215.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Buchan, D. W. A. and Jones, D. T. 2019. The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W402-W407.
- Campos, M. L., De Souza, C. M., De Oliveira, K. B. S., Dias, S. C., Franco, O. L. 2018. The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 69(21), 4997-5011.
- Campos, M. L., Lião, L. M., Alves, E. S. F., Migliolo, L., Dias, S. C., Franco, O. L. 2018. A structural perspective of plant antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, 475(21), 3359-3375.
- Chaturvedi, P., Dhanik, M., Pande, A. 2014. Characterization and structural analysis of hepcidin like antimicrobial peptide from *Schizothorax richardsonii* (Gray). *The Protein Journal*, 33(1), 1-10.
- Chen, L., Zhang, Q., Yuan, X., Cao, Y., Yuan, Y., Yin, H., Ding, X., Zhu, Z., Luo, S.-Z. 2017. How charge distribution influences the function of membrane-active peptides: Lytic or cell-penetrating?. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 83, 71-75.

- Chen, Y., Li, C., Zhu, J., Xie, W., Hu, X., Song, L., Zi, J., Yu, R. 2017. Purification and characterization of an antibacterial and anti-inflammatory polypeptide from *Arca subcrenata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 177-184.
- Cirac, A. D., Moiset, G., Mika, J. T., Koçer, A., Salvador, P., Poolman, B., Marring, S. J., Sengupta, D. 2011. The molecular basis for antimicrobial activity of pore-forming cyclic peptides. *Biophysical Journal*, 100(10), 2422-2431.
- Craik, D. J. 2009. Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. *Trends in Plant Science*, 14(6), 328-335.
- Cunsolo, V., Schicchi, R., Chiaramonte, M., Inguglia, L., Arizza, V., Cusimano, M. G., Schillaci, D., Francesco A. D., Saletti, R., Celso, F. L., Barone, G., Vitale, M. 2020. Identification of new antimicrobial peptides from mediterranean medical plant *Charybdis pancracion* (Steinh.) speta. *Antibiotics*, 9(11), 747.
- De Oliveira Carvalho, A., Moreira Gomes, V. 2011. Plant defensins and defensin-like peptides- biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(38), 4270-4293.
- De Vuyst, L., Vincent, P., Makras, E., Leroy, F., Pot, B. 2010. Peptide extracts from cultures of certain *Lactobacilli* inhibit *Helicobacter pylori*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 26-36.
- Deb, D., Shrestha, A., Sethi, L., Das, N. C., Rai, V., Das, A. B., Maiti, I. B., Dey, N. 2020. Transgenic tobacco expressing *Medicago sativa* Defensin (Msdef1) confers resistance to various phyto-pathogens. *The Nucleus*, 63(2), 179-190.
- Decker, A. P., Mechesso, A. F., Wang, G. 2022. Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: definition, deployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12874.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2), 193-202.
- Di Somma, A., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A., Duilio, A. 2020. Antimicrobial and antibiofilm peptides. *Biomolecules*, 10(4), 652.
- Douliez, J., Pato, C., Rabesona, H., Mollé, D., Marion, D. 2001. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *European Journal of Biochemistry*, 268(5), 1400-1403.
- Duan, X., Leng, Y., Chen, F., Zhang, M., Li, Z. 2023. Evaluation of oilseed proteins as precursors of antimicrobial peptides using bioinformatics method. *Amino Acids*, 55(3), 359-370.
- Duan, X., Zhang, M., Chen, F. 2021. Prediction and analysis of antimicrobial peptides from rapeseed protein using in silico approach. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4), e13598.

- Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. 2003. Pathogen self defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 501-538.
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., Durinx, C. 2021. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W216-W227.
- Dziuba, B., Dziuba, M. 2014. New milk protein-derived peptides with potential antimicrobial activity: An approach based on bioinformatic studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14531-14545.
- El-Shehawi, A., Al-Otaibi, S., Azab, E. 2016. Defensin gene expression in some plant sources of Taif. *Genetika*, 48(1), 9-24.
- Enany, S. 2014. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. *Journal of Infection and Public Health*, 7(4), 296-307.
- Fedhila, S., Lazhar, W., Jeridi, T., Sanchis, V., Gohar, M., Lereclus, D., Hamida, J. 2015. Peptides extracted from *Artemisia herba alba* have antimicrobial activity against foodborne pathogenic gram-positive bacteria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(1), 68.
- Finkina, E. I., Ovchinnikova, T. V. 2018. Plant defensins: structure, functions, biosynthesis, and the role in the immune response. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44(3), 261-278.
- Fiołka, M. J., Czaplewska, P., Macur, K., Buchwald, T., Kutkowska, J., Paduch, R., Kaczyński, Z., Wydrych, J., Urbanik-Sypniewska, T. 2019. Anti-*Candida albicans* effect of the protein-carbohydrate fraction obtained from the coelomic fluid of earthworm *Dendrobaena veneta*. *Plos One*, 14(3), e0212869.
- Gao, A. G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Rommens, C. M. T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 18(12), 1307-1310.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the Expasy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607.
- García, A. N., Ayub, N. D., Fox, A. R., Gómez, M. C., Diéguez, M. J., Pagano, E. M., Berini, C. A., Muschietti, J. P., Soto, G. 2014. *Alfalfa* snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia. *BMC Plant Biology*, 14(1), 248.

- Gasu, E. N., Ahor, H. S., Borquaye, L. S. 2018. Peptide extract from *Olivancillaria hiatula* exhibits broad-spectrum antibacterial activity. *BioMed Research International*, 2018, 1-11.
- Gomar, J., Sodano, P., Sy, D., Shin, D. H., Lee, J. Y., Suh, S. W., Marion, D., Vovelle, F., Ptak, M. 1998. Comparison of solution and crystal structures of maize nonspecific lipid transfer protein: A model for a potential *in vivo* lipid carrier protein. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 31(2), 160-171.
- Goyal, R. K., Mattoo, A. K. 2014. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science*, 228, 135-149.
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, 162-173.
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., Pandit, M. W. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155-161.
- Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Chang, C., Min, K., Moon, J., Shin, D. H., Kopka, M. L., Sawaya, M. R., Yuan, H. S., Kim, T. D., Choe, J., Lim, D., Moon, H. J., Suh, S. W. 2001. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 308(2), 263-278.
- Hanks, J. N., Snyder, A. K., Graham, M. A., Shah, R. K., Blaylock, L. A., Harrison, M. J., Shah, D. M. 2005. Defensin gene family in *Medicago truncatula*: Structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Molecular Biology*, 58(3), 385-399.
- Herbel, V., Sieber-Frank, J., Wink, M. 2017. The antimicrobial peptide snakine-2 is upregulated in the defense response of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) as part of the jasmonate-dependent signaling pathway. *Journal of Plant Physiology*, 208, 1-6.
- Huang, G.-J., Lai, H.-C., Chang, Y.-S., Sheu, M.-J., Lu, T.-L., Huang, S.-S., Lin, Y.-H. 2008. Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 'Tainong 57'] storage roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2989-2995.
- Hughes, P., Dennis, E., Whitecross, M., Llewellyn, D., Gage, P. 2000. The cytotoxic plant protein, β -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 823-827.
- Iqbal, A., Khan, R. S., Shehryar, K., Imran, A., Ali, F., Attia, S., Shah, S., Mii, M. 2019. Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants.

- Järvå, M., Lay, F. T., Phan, T. K., Humble, C., Poon, I. K. H., Bleackley, M. R., Anderson, M. A., Hulett, M. D., Kvensakul, M. 2018. X-ray structure of a carpet-like antimicrobial defensin–phospholipid membrane disruption complex. *Nature Communications*, 9(1), 1962.
- Jena, P., Mohanty, S., Mohanty, T., Kallert, S., Morgelin, M., Lindström, T., Borregaard, N., Stenger, S., Sonawane, A., Sørensen, O. E. 2012. Azurophil granule proteins constitute the major Mycobactericidal proteins in human neutrophils and enhance the killing of *Mycobacteria* in macrophages. *Plos One*, 7(12), e50345.
- Jha, S., Chattoo, B. B. 2009. Transgene stacking and coordinated expression of plant defensins confer fungal resistance in rice. *Rice*, 2(4), 143-154.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755.
- Kazan, K. ve Gürel, E. 2001. Hastalıklara dayanıklılığın artırılması. Bitki biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, S, 261-287.
- Kazan, K., Rusu, A., Marcus, J. P., Goulter, K. C., Manners, J. M. 2002. Enhanced quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* conferred by expression of a novel antimicrobial peptide in canola (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding*, 10, 63-70.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
- Kerenga, B. K., McKenna, J. A., Harvey, P. J., Quimbar, P., Garcia-Ceron, D., Lay, F. T., Phan, T. K., Veneer, P. K., Vasa, S., PArisi, K., Shafee, T. M. A., Weerden, N. L., Hulett, M. D., Craik, D. J., Anderson, M. A., Bleackley, M. R. 2019. Salt-tolerant antifungal and antibacterial activities of the corn defensin ZmD32. *Frontiers in Microbiology*, 10, 795.
- Kirar, M., Singh, H., Singh, S. P., Sehrawat, N. 2023. Identification of novel protein from *Datura stramonium* leaves with bioinsecticide potential against *Anopheles stephensi*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 29(3), 49.
- Koo, J. C., Lee, B., Young, M. E., Koo, S. C., Cooper, J. A., Baek, D., Lim, C. O., Lee, S.Y., Yun, D-J., Cho, M. J. 2004. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant and Cell Physiology*, 45(11), 1669-1680.
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., Nesmelova, I. V. 2020. Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5307.
- Kovaleva, V., Kiyamova, R., Cramer, R., Krynytsky, H., Gout, I., Filonenko, V., Gout,

- R. 2009. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides*, 30(12), 2136-2143.
- Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R. 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. 1993. PROCHECK-a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., Thornton, J. M. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, 8, 477-486.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Thornton, J. M. 2001. PROCHECK: validation of protein structure coordinates, in *International Tables of Crystallography, Volume F. Crystallography of Biological Macromolecules*, eds. Rossmann M G & Arnold E, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 722-725.
- Lay, F., Anderson, M. 2005. Defensins- components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85-101.
- Le Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., Castro, B., Boigegrain, R. A., Favel, A., Coletti-Previero, M. 1990. Molecular recognition between serine proteases and new bioactive microproteins with a knotted structure. *Biochimie*, 72(6-7), 431-435.
- Lee, S. C., Hong, J. K., Kim, Y. J., Hwang, B. K. 2000. Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(5), 207-216.
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., Yang, X. 2021. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 5.
- Li, L., Sun, J., Xia, S., Tian, X., Cheserek, M. J., Le, G. 2016. Mechanism of antifungal activity of antimicrobial peptide APP, a cell-penetrating peptide derivative, against *Candida albicans*: intracellular DNA binding and cell cycle arrest. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 3245-3253.
- Liu, S., Wilkinson, B. J. 2012. Novel antibacterial polypeptide Laparaxin produced by *Lactobacillus Paracasei* strain NRRL0 B-50314 via fermentation. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 03(03).
- López, W. R., Garcia-Jaramillo, D. J., Ceballos-Aguirre, N., Castaño-Zapata, J., Acuña-Zornosa, R., Jovel, J. 2021. Transcriptional responses to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen infection in three Colombian tomato cultivars. *BMC Plant Biology*, 21(1), 412.

- Mehta, L., Dhankhar, R., Gulati, P., Kapoor, R. K., Mohanty, A., Kumar, S. 2020. Natural and grafted cyclotides in cancer therapy: An insight. *Journal of Peptide Science*, 26(4-5), e3246.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V. M. 2011. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current Microbiology*, 62(4), 1209-1217.
- Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi De Sá, M. F., Bloch, C. 2002. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48(2), 311-319.
- Ming, L., Xiaoling, P., Yan, L., Lili, W., Qi, W., Xiyong, Y., Boyao, W., Ning, H. 2007. Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Human Reproduction*, 22(7), 1810-1815.
- Mirzaee, H., Ariens, E., Blaskovich, M. A. T., Clark, R. J., Schenk, P. M. 2021. Biostimulation of bacteria in liquid culture for identification of new Antimicrobial compounds. *Pharmaceuticals*, 14(12), 1232.
- Moazzezy, N., Rismani, E., Rezaei, M., Karam, M. R. A., Rafati, S., Bouzari, S., Oloomi, M. 2022. Computational evaluation of modified peptides from human neutrophil peptide 1 (HNP-1). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(3), 1163-1171.
- Moreira, J. S., Almeida, R. G., Tavares, L. S., Santos, M. O., Viccini, L. F., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Raposo, N. R. B., Dias, S. C., Franco, O. L. 2011. Identification of botryticidal proteins with similarity to NBS-LRR proteins in rosemary pepper (*Lippia sidoides* Cham.) flowers. *The Protein Journal*, 30(1), 32-38.
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassalo, A., Vogel, H., Sgambato, A., Falabella, P. 2021. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 668632.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12, 345-364.
- Muñoz, A., Chu, M., Marris, P. I., Sagaram, U. S., Kaur, J., Shah, D. M., Read, N. D. 2014. Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 92(6), 1357-1374.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

- Neyrinck, A. M., Etxeberria, U., Taminiau, B., Daube, G., Van Hul, M., Everard, A., Cani, P. D., Bindels, L. B., Delzenne, N. M. 2017. Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 1500899.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., Vogel, H. J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Noonan, J., Williams, W., Shan, X. 2017. Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1938.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198(1), 249-266.
- Okella, H., George, J. J., Ochwo, S., Ndekezi, C., Koffi, K. T., Aber, J., Ajayi, C. O., Fofana, F. G., Ikiriza, H., Mtewa, A. G., Nkamwesiga, J., Bassogog, C. B. B., Kato, C. D., Ogwang, P. E. 2020. New putative antimicrobial candidates: *In silico* design of fish-derived antibacterial peptide-motifs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 604041.
- Oliveira, J. T. A., Souza, P. F. N., Vasconcelos, I. M., Dias, L. P., Martins, T. F., Van Tilburg, M. F., Guedes, M. I. F., Sousa, D. O. B. 2019. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. *Biochimie*, 157, 10-21.
- Palacioğlu, G., Özer, G., Bayraktar, H. 2023. Expression comparisons of defense-related genes in resistant and susceptible chickpea cultivars in response to *Ascochyta rabiei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102107.
- Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J. 1994. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science*, 3(10), 1833–1839.
- Parret, A. H. A., Temmerman, K., De Mot, R. 2005. Novel lectin-like cacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5197-5207.
- Pinto, M. F. S., Fensterseifer, I. C. M., Migliolo, L., Sousa, D. A., De Capdville, G., Arboleda-Valencia, J. W., Colgrave, M. L., Craik, D. J., Magalhães, B. S., Dias, S. C., Franco, O. L. 2012. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 134-147.
- Pons, J.L., De Lamotte, F., Gautier, M.F., Delsuc, M.A. 2003. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. *Journal of Biological*

Chemistry, 278(16), 14249-14256.

- Ponte, P. I. P., Mendes, I., Quaresma, M., Aguiar, M. N. M., Lemos, J. P. C., Ferreira, L. M. A., Soares, M. A. C., Alfaia, C. M., Prates, J. A. M., Fontes, C. M. G. A. 2004. Cholesterol levels and sensory characteristics of meat from broilers consuming moderate to high levels of alfalfa. *Poultry Science*, 83(5), 810-814.
- Pranting, M., Loov, C., Burman, R., Goransson, U., Andersson, D. I. 2010. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1964-1971.
- Rahman, Md. F., Hasan, R., Biswas, M. S., Shathi, J. H., Hossain, Md. F., Yeasmin, A., Abedin, M. Z., Hossain, Md. T. 2023. A bioinformatics approach to characterize a hypothetical protein Q6S8D9_SARS of SARS-CoV. *Genomics & Informatics*, 21(1), e3.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95-99.
- Ramanathan, K., Sethumadhavan, R. 2011. Identifying therapeutic template by evaluating the structural stability of gram positive anti-bacterial peptides-a computational approach. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 3(3), 182-188.
- Redman, D. G., Fisher, N. 1969. Purothionin analogues from barley flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(7), 427-432.
- Rivero, M., Furman, N., Mencacci, N., Picca, P., Toum, L., Lentz, E., Bravo-Almonacid, F., Mentaberry, A. 2012. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Biotechnology*, 157(2), 334-343.
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., Shah, D. M. 2011. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *Plos One*, 6(4), e18550.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sakthivel, M., Palani, P. 2016. Isolation, purification and characterization of antimicrobial protein from seedlings of *Bauhinia purpurea* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 390-401.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-Olmedo, F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 12(1), 16-23.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant*

- Seyedjavadi, S. S., Khani, S., Goudarzi, M., Zare-Zardini, H., Shams-Ghahfarokhi, M., Jamzivar, F., Razzaghi-Abyaneh, M. 2021. Characterization, biological activity, and mechanism of action of a plant-based novel antifungal peptide, Cc-AFP1, isolated from *Carum carvi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 743346.
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., Kapila, Y. L. 2016. Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449-1465.
- Silva, L. O., Pereira, L. S., Pereira, J. L., Gomes, V. M., Grativol, C. 2022. Divergence and conservation of defensins and lipid transfer proteins (LTPs) from sugarcane wild species and modern cultivar genomes. *Functional&Integrative Genomics*, 22, 235–250.
- Slavokhotova, A. A., Rogozhin, E. A. 2020. Defense peptides from the α -hairpinin family are components of plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 465.
- Sousa, D., Porto, W., Silva, M., Da Silva, T., Franco, O. 2016. Influence of cysteine and tryptophan substitution on DNA-binding activity on maize α -hairpinin antimicrobial peptide. *Molecules*, 21(8), 1062.
- Sunil, S. V., Kerima, O. Z., Kumar, H. S. S., Prabhakar, B. T., Pramod, S. N., Niranjana, P. 2021. *In silico* characterization of a transcript code based screening of antimicrobial peptide from *Trichogramma chilonis*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(4), 2861-2872.
- Suwignyo, B., Aristia Rini, E., Helmiyati, S. 2023. The profile of tropical *alfalfa* in Indonesia: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(1), 103504.
- Suwignyo, B., Mustika, A., Kustantinah, Yusiati, L. M., Suhartanto, B. 2020. Effect of drying method on physical-chemical characteristics and amino acid content of tropical *alfalfa* (*Medicago sativa* L.) hay for poultry feed. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 15(2), 118-122.
- Tam, J., Wang, S., Wong, K., Tan, W. 2015. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceutics*, 8(4), 711-757.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tesfaye, M., Silverstein, K. At., Nallu, S., Wang, L., Botanga, C. J., Gomez, S. K., Costa, L. M., Harrison, M. J., Samac, D. A., Glazebrook, J., Katagiri, F., Gutierrez-Marcos, J. F., VandenBosch, K. A. 2013. Spatio-temporal expression patterns of *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula* defensin-like genes. *Plos One*, 8(3), e58992.
- Ikai, A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of*

Biochemistry, 88, 1895-1898.

- Veedu, A. M., Prahaladhan, A. P., Vadakkeveetil, A. V., Krishnakumar, A., Surendran, N., Philip, R. 2021. An antimicrobial peptide hepcidin, St-hep from tuberculated flathead, *Sorsogona tuberculata* (Cuvier, 1829): Molecular and functional characterization. *Biologia*, 76(11), 3477-3488.
- Venkatasamy, V., Durairaj, R., Karuppaiah, P., Sridhar, A., Kamaraj, S. K., Ramasamy, T. 2021. An *in silico* evaluation of molecular interaction between antimicrobial peptide subtilisin A of *Bacillus subtilis* with virulent proteins of *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 1709-1718.
- Wang, X., Yue, T., Lee, T. 2015. Development of Pleurocidin-poly (vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food Control*, 54, 150-157.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z. 2016. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087-D1093.
- Wingate, K. V., Torres, S. M., Silverstein, K. A. T., Hendrickson, J. A., Rutherford, M. S. 2009. Expression of endogenous antimicrobial peptides in normal canine skin. *Veterinary Dermatology*, 20(1), 19-26.
- Yadav, N.S., Kumar, P., Singh, I. 2022. Structural and functional analysis of protein. In *Bioinformatics*; Academic Press: Cambridge, MA, 189–206.
- Yeats, T. H., Rose, J. K. C. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*, 17(2), 191-198.
- Yount, N. Y., Yeaman, M. R. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7363-7368.

EKLER

EK 1 LC-MS/MS sonucunda elde edilen kromatogram

