

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TERAPÖTİK PEPTİT TİLAPİA PİSCİDİN 4'ÜN (TP4) *PİCHIA*
PASTORIS EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT
ÜRETİMİ VE HT-29 KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Seda KILINÇ

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU
Eş Danışman: Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2024
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

TERAPÖTİK PEPTİT TİLAPİA PİSCİDİN 4'ÜN (TP4) *PICHIA PASTORIS* EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE HT-29 KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Seda KILINÇ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU
Eş Danışman: Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN

Tilapia piscidin 4 (TP4), Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) balıklarının bağışıklık sisteminde yer alan ve yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip katyonik bir peptittir. Antimikrobiyal özelliğinin yanı sıra yara iyileştirici ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir.

Tez çalışması kapsamında, TP4 peptidinin kodon optimizasyonlu dizisi, *Pichia pastoris* KM71H ekspresyon sisteminde güçlü ve indüklenebilir AOX1 promotörünü içeren pPICZαA vektörü kullanılarak eksprese edilmiştir. Rekombinant TP4 peptiti, Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve antibakteriyel aktivitesi MİK ve MBK yöntemleri ile doğrulanmıştır. TP4, HT-29 kolon kanseri ve HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki sitotoksik etkiler MTT, TAS-TOS, MDA yöntemleri ile apoptozda yer alan genler (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*) ve proteinlerin ekspresyon düzeyleri ise RT-qPCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu tez kapsamında rekombinant TP4'ün insan HT-29 hücre hattında güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir.

2024, 89 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Tilapia piscidin 4, Rekombinant peptit, *Pichia pastoris*, HT-29 hücre hattı

ABSTRACT

PhD Thesis

RECOMBINANT PRODUCTION OF THERAPEUTIC PEPTIDE TILAPIA PISCIDIN 4 (TP4) IN *PICHIA PASTORIS* EXPRESSION SYSTEM AND INVESTIGATION OF ITS EFFECT ON HT-29 COLORECTAL CANCER CELLS

Seda KILINÇ

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KUZUCU
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mert KARAOĞLAN

Tilapia piscidin 4 (TP4), a cationic peptide with high antimicrobial activity, is part of the immune system of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In addition to its antimicrobial properties, it has various biological significances, including wound healing and anticancer properties.

In the scope of this thesis, the codon-optimized sequence of the TP4 peptide was expressed in the *Pichia pastoris* KM71H expression system under the pPICZαA expression vector, which includes the strong and inducible AOX1 promoter. Recombinant TP4 peptide was purified by Ni-NTA affinity chromatography and its antibacterial activity was confirmed by MIC and MBC methods. TP4 was applied to HT-29 colon cancer and HGF-1 healthy gingival fibroblast cells and cytotoxic effects on the cells were investigated by MTT, TAS-TOS, MDA methods and the expression levels of genes (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*) and proteins involved in apoptosis were investigated by RT-qPCR and ELISA methods. In this thesis, it was shown for the first time that recombinant TP4 has strong anticancer activity in human HT-29 cell line.

2024, 89 Pages

Keywords: Tilapia piscidin 4, Recombinant peptide, *Pichia pastoris*, HT-29 cell line

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mehmet KUZUCU ve eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN'a sonsuz teşekkürler ederim. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımını esirgemeyen Nihan GÜNAY'a teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Dürdane KILINÇ, sevgili babam Sabahattin KILINÇ ve sevgili kardeşim Eda KILINÇ İŞLEYEN'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

2023-A3-01 Çağrı ve 31705 proje no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB) teşekkür ederim.

Seda KILINÇ

Eylül, 2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
1. Kolorektal Kanser ve Mevcut Tedavi Yöntemleri	3
2. Terapötik Peptitlerin Genel Özellikleri	3
2.3. Terapötik Peptit Türleri	5
2.3.1. Antimikrobiyal/por oluşturuıcı peptitler (AMP).....	5
2.3.2. Hücre geçirgen peptitler (HGP).....	6
2.3.3. Tümör hedefli peptitler (THP).....	6
2.4. Terapötik Peptitlerin Antikanser Etki Mekanizmaları	7
2.4.1. Sinyal iletim yollarını hedefleyen terapötik peptitler	7
2.4.2. Hücre döngüsünü hedefleyen terapötik peptitler	8
2.4.3. Hücre ölümünü indükleyen terapötik peptitler	8
2.5. Tilapia piscidin 4'ün (TP4) Kimyasal Özellikleri ve Antikanser Aktivitesi.....	9
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinde TP4'ün apoptotik indüksiyonu	12
2.6. AMP'lerin Elde Edilme Yöntemleri.....	12
2.6.2. Kimyasal sentez yoluyla üretim.....	13
2.6.3. Rekombinant teknikler ile üretim	13
2.6.3.1. Bakteriyel ekspresyon sistemleri.....	14
2.6.3.2. Bitkisel ekspresyon sistemleri.....	14
2.6.3.3. Fungal ekspresyon sistemleri	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal.....	16

3.1.1. Primerler	16
3.1.3. Vektör ve restriksiyon enzimleri	17
3.1.4. Hücre hatları	18
3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler	18
3.1.5.1. Rekombinant protein üretim deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler.....	18
3.1.5.2. Hücre kültürü deneylerinde ve biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddeler	19
3.1.6. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	19
3.2. Yöntem	21
3.2.1. TP4 Peptitinin <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sisteminde üretilmesi ve saflaştırılması.....	21
3.2.1.1. Biyoinformatik analizler, kodon optimizasyonu.....	21
3.2.1.2. TP4 peptitini kodlayan DNA dizisinin üretimi	22
3.2.1.3. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi.....	24
3.2.1.4. Rekombinant ekspresyon plazmidinin elde edilmesi.....	26
3.2.1.5. <i>E. coli</i> XL1-Blue ve <i>P. pastoris</i> KM71H hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi	27
3.2.1.6. Rekombinant plazmidin kompetent <i>E. coli</i> XL1-Blue hücrelerine transformasyonu.....	28
3.2.1.7. <i>E. coli</i> XL1-Blue transformantlarının doğrulanması	29
3.2.1.8. Kompetent <i>P. pastoris</i> KM71H hücrelerine transformasyon	29
3.2.1.9. <i>P. pastoris</i> KM71H transformantlarının doğrulanması	30
3.2.1.10. Rekombinant TP4'ün ekspresyonu	31
3.2.1.11. Rekombinant TP4'ün saflaştırılması.....	32
3.2.1.12. Rekombinant TP4'ün SDS-PAGE ile doğrulanması	33
3.2.1.13. Rekombinant TP4'ün antimikrobiyal testler ile analizi	34
3.2.2. Hücre kültürü deneyleri ve biyokimyasal analizler	35

3.2.2.1. Hücre kültürü koşulları	35
3.2.2.2. Hücre kültürünün pasajlanması.....	37
3.2.2.3. Hücre kültürünün stoklanması	38
3.2.2.4. Dondurulan hücrelerin açılması	38
3.2.2.6.1. Uygulanacak TP4 peptidinin hazırlanması	39
3.2.2.6.2. Hücre canlılık testi	39
3.2.2.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	40
3.2.2.7. RNA ve cDNA'nın konsantrasyon ve saflık değerlendirmesi.....	41
3.2.2.8. RT-qPZR deneyi	42
3.2.2.9. Protein ifade düzeyinin belirlenmesi.....	42
3.2.2.11. Malondialdehid (MDA) tayini	44
3.2.2.12. İstatistiksel hesaplamalar	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. TP4 Peptidini Kodlayan DNA Dizisinin Eldesi	46
4.2. Rekombinant Ekspresyon Plazmidinin Elde Edilmesi.....	47
4.3. Rekombinant Plazmidin Kompetent <i>E. coli</i> XL-1 Blue Hücrelerinde Klonlanması	48
4.4. Pozitif <i>E. coli</i> XL-1 Blue Transformantlarının Doğrulanması.....	49
4.5. Rekombinant Plazmidin <i>P. pastoris</i> KM71H Hücrelerine Transformasyonu	51
4.6. Pozitif <i>P. pastoris</i> KM71H Transformantlarının Doğrulanması.....	51
4.7. TP4'ün Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi ile Doğrulanması.....	52
4.8. Rekombinant TP4'ün Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	54
4.9. MTT Testi ile TP4'ün HT-29 ve HGF-1 Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	58
4.10. TP4'ün HT-29 ve HGF-1 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Genlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....	60
4.11. Apoptotik Genlerin Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	67
4.12. TP4'ün Hücrelerde Meydana Getirdiği Antioksidan ve Oksidan Düzeylerin Belirlenmesi	73

4.13. MDA Tayini	77
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	80
KAYNAKLAR	85



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tarapötik peptitlerin sınıflandırılması	7
Şekil 2.2. TP4'ün 3 boyutlu yapısı.....	10
Şekil 2.3. Kanseri hücrelerinde TP4'ün apoptotik indüksiyonu	12
Şekil 3.1. pPICZ α A-TP4 ekspresyon vektörünün şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.2. TP4 geni, restriksiyon enzim kesim bölgeleri, stop kodonu, G-TEV Proteaz bölgesi ve C-terminal 6xHis dizisini içeren optimize edilmiş nükleotid dizisi.....	21
Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforez düzeneği	25
Şekil 3.4. <i>P. pastoris</i> hücrelerinde ekspresyon çalışmaları.....	32
Şekil 3.5. SDS-PAGE jel elektroforez düzeneği.....	34
Şekil 3.6. HT-29 kolon kanseri hücre hattının mikroskopik görüntüsü	36
Şekil 3.7. HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücre hattının mikroskopik görüntüsü	36
Şekil 3.8. Steril kabin içerisinde hücrelerin pasajlanması.....	38
Şekil 4.1. TP4 geninin overlap PZR ile elde edilmesi	47
Şekil 4.2. <i>Xho</i> I ve <i>Xba</i> I restriksiyon enzimleri ile 87 bp'lik kısım düşürülmüş ve pPICZ α A plazmidinin jelden kesilmesi.	48
Şekil 4.3. Zeosin içeren LB agar besiyerinde gelişmesi pozitif <i>E. coli</i> XL-1 Blue transformantları	49
Şekil 4.4. Zeosin içeren LB agar besiyerinde <i>E. coli</i> XL-1 Blue hücrelerinin gelişimi..	49
Şekil 4.5. Ligasyon yapılmış hücrelerin <i>Asu</i> II ve <i>Sal</i> I restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrolü.....	50
Şekil 4.6. Zeosin içeren YPD agar besiyerinde <i>P. pastoris</i> KM71H hücrelerinin gelişimi.	51
Şekil 4.7. <i>P.pastoris</i> KM71H'ye aktarılan TP4 geninin PZR ile doğrulanması.....	52
Şekil 4.8. TP4 proteinin saflaştırma adımlarının SDS-PAGE analizi.....	53
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün <i>E. coli</i> hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	55
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün <i>B. subtilis</i> hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	56
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün <i>M. luteus</i> hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	57
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün <i>P. aeruginosa</i> hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	58

Şekil 4.13. TP4'ün HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	59
Şekil 4.14. TP4'ün HGF-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	60
Şekil 4.15. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>BAX</i> seviyesi	61
Şekil 4.16. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>BAX</i> seviyesi	62
Şekil 4.17. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>BCL-2</i> seviyesi.....	63
Şekil 4.18. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>BCL-2</i> seviyesi	64
Şekil 4.19. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>CASP3</i> seviyesi	65
Şekil 4.20. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>CASP3</i> seviyesi	66
Şekil 4.21. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>BAX</i> protein düzeyi.....	68
Şekil 4.22. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>BAX</i> protein düzeyi	69
Şekil 4.23. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>BCL-2</i> protein düzeyi	70
Şekil 4.24. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>BCL-2</i> protein düzeyi.....	71
Şekil 4.25. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki <i>CASP3</i> protein düzeyi	72
Şekil 4.26. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki <i>CASP3</i> protein düzeyi.....	73
Şekil 4.27. HT-29 hücreleri üzerindeki <i>TAS</i>	74
Şekil 4.28. HGF-1 hücreleri üzerindeki <i>TAS</i>	75
Şekil 4.29. HT-29 hücreleri üzerindeki <i>TOS</i>	76
Şekil 4.30. HGF-1 hücreleri üzerindeki <i>TOS</i>	77
Şekil 4.31. HT-29 hücrelerindeki <i>MDA</i> miktarı	78
Şekil 4.32. HGF-1 hücrelerindeki <i>MDA</i> miktarı	79

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Terapötik peptitlerin avantajları ve dezavantajları	4
Tablo 2.2. TP4'ün kimyasal özellikleri.....	9
Tablo 3.1. Overlap PZR için kullanılan primerler	16
Tablo 3.2. Overlap PZR reaksiyon karışımları ve koşulları.....	22
Tablo 3.3. Jel elektroforezi reaksiyon karışımları ve koşulları.....	24
Tablo 3.4. TP4 geninin ve pPICZαA vektörünün <i>XhoI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.	26
Tablo 3.5. Ligasyon reaksiyon bileşenleri	27
Tablo 3.6. Aktarılan TP4 geninin PZR ile validasyonu	31
Tablo.3.7. Deney seti kodları.	40
Tablo 3.8. RT-qPZR protokolü.	42
Tablo 4.1. MİK (µg/ml) değerleri.	54
Tablo 4.2. MBK (µg/ml) değerleri.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

<i>C</i>	Celcius
<i>dk</i>	Dakika
<i>kDa</i>	Kilo Dalton
<i>m</i>	Mili (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
<i>OD</i>	Optik Density
<i>pH</i>	H ⁺ iyon konsantrasyonunun eksi logaritması
<i>sn</i>	Saniye
<i>T_m</i>	Erime sıcaklığı
<i>V</i>	Volt
<i>%</i>	Yüzde

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bç	Baz Çifti
BMGY	Buffered Glycerol Complex Medium
BMMY	Buffered Methanol Complex Medium
cDNA	Complementer Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
NCBI	National Center Of Biotechnology Information
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrophorezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPZR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
taq	Thermus aquaticus
YNB	Yeast Nitrogen Based

1. GİRİŞ

Kolorektal kanseri için mevcut tedaviler; radyasyon, kemoterapi, immünoterapi ve cerrahi yöntemlerdir (Stintzing, 2014; Mármol vd., 2017). Ancak, tümörlü hücreleri hedeflemede sınırlı seçicilik ve tümör hücrelerinde direncin ortaya çıkması bu tür tedavilerin iki büyük zorluğudur ve tüm bu tedaviler hafif ila şiddetli yan etkilere neden olabilir (Daniels vd., 2012). Literatür incelendiğinde Dünya’da kolon kanseri için terapötik peptitler gibi yeni ve etkili tedavi metotlarının geliştirilmesi gereği vurgulanmaktadır (Kuroda vd., 2015; Lau ve Dunn, 2018; Chauhan vd., 2021; Saleh vd., 2022).

Terapötik peptitler içerisinde antimikrobiyal/por oluşturuucu peptitler (AMP) antikanser etkisinden dolayı dikkat çekmektedir. AMP’ler tüm canlı organizmalarda doğal olarak oluşan ve bağışıklık savunma mekanizmasının bir parçasıdır. AMP’ler katyonik yüklere sahiptir ve polar olmayan çözücülerde amfipatik yapılar oluşturur (Lien ve Lowman, 2003). Kanser hücreleri normalde zwitteriyonik olan sağlıklı hücrelerin aksine, genellikle dış zarlarında negatif yüklü fosfatidilserin (PS) veya anyonik yapılara sahiptir. Antimikrobiyal katyonik peptitler, kanser hücresi zarlarını hedefler ve nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklerler (Boohaker vd., 2012). Yapılan çalışmalarda katyonik AMP’lerin hücre zarının bütünlüğünü bozarak kolorektal kanser hücreleri üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Chauhan vd., 2021).

Bir deniz antimikrobiyal peptiti olan ve Nil Tilapyası’ndan (*Oreochromis niloticus*) tanımlanan katyonik bir antimikrobiyal peptit olan *Tilapia piscidin 4*’ün (TP4) antibakteriyel, yara iyileştirici, immünomodülatör ve antikanser aktiviteleri dahil olmak üzere çoklu biyolojik fonksiyonlar gösterdiği bilinmektedir (Peng vd., 2012; Mahrous vd., 2020; Dyshlovoy ve Honecker, 2020). Ayrıca, TP4, glioblastoma hücrelerinde, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde güçlü antikanser aktivitesi nedeniyle dikkat çekmektedir (Ting ve Chen, 2018; Su vd., 2019).

AMP’ler bilimsel araştırmalar ve endüstriyel kullanımı gibi birçok özelliğe sahip olmalarının yanı sıra AMP’ler üzerine çalışmaları sınırlayan ana faktörler, AMP’lerin elde edilmesinin zaman alıcı ve oldukça maliyetli olmasıdır (Neshani vd., 2018). AMP’lerin

üretiminde üç farklı strateji mevcuttur; doğal kaynaklardan doğrudan AMP ekstraksiyonu, kimyasal sentez ve rekombinant tekniklerdir. Rekombinant yöntem, birçok yönden kimyasal sentez ve ekstraksiyona göre tercih edilmektedir. Örneğin, daha uygun maliyetlidir ve hem araştırma hem de farmasötik kullanımda büyük ölçekli üretim için sonsuz bir peptit üretimi kaynağı sağlar (Zorko vd., 2010; Li, 2011; Neshani vd., 2018). Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* son zamanlarda ökaryotik protein üretimi için en sık kullanılan ekspresyon sistemi olmuştur. Çünkü *P. pastoris*, bakterilerin gerçekleştiremediği post-translasyonel değişiklikleri, örneğin polipeptidlerin doğru katlanması, disülfid bağlarının oluşumu ve glikozilasyon gibi, doğru bir şekilde yapabilen önemli bir ökaryotik protein sistemidir (Hagenson vd., 1991; Cregg vd., 1993).

Bu tezin ilk amacı TP4 peptidini *P. pastoris* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretmektir. İkinci amacı ise saflaştırılmış olan rekombinant TP4'ü HT-29 kolon kanseri ve HGF-1 sağlıklı fibroblast hücrelerine uygulayarak TP4'ün kanserli ve sağlıklı hücreler üzerindeki biyokimyasal mekanizmalarını araştırmak ve TP4'ün terapötik potansiyeli ve antikanser aktivitesi değerlendirmektir.

Tez çalışması kapsamında, TP4 peptidinin kodon optimizasyonlu dizisi, *P. pastoris* KM71H ekspresyon sisteminde metanol ile indüklenebilen AOX1 promotörünü içeren pPICZ α A vektörü kullanılarak eksprese edilmiştir. Rekombinant TP4 peptidi, Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmasından sonra TP4'ün antikanser aktivitesi HT-29 kolorektal karsinoma hücrelerinde değerlendirilmiş. Ayrıca TP4 HGF-1 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde de aynı koşullarda çalışılmış olup biyokimyasal sonuçları HT-29 sonuçları ile mukayese edilmiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez rekombinant olarak üretilen TP4 peptidinin insan HT-29 kolorektal kanser hücre hattında güçlü antikanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

1. Kolorektal Kanser ve Mevcut Tedavi Yöntemleri

Kolorektal kanser (KRK) 2020'de dünya çapında yaklaşık 2 milyon (%10) yeni vaka ile en sık görülen üçüncü kanser ve 935.173 (%9,4) ölüm oranı ile kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), kolorektal kanserin küresel yükünün 2020 ile 2040 arasında yaklaşık %56 artacağını tahmin ediyor (Sung vd., 2021). KRK'de tümör yerleşimi kolon veya rektumun herhangi bir bölgesinde olabilir. KRK'nın evresine ve tümör yerleşimine göre izlenecek tedavi yöntemleri değişmektedir. Bu tedavi yöntemleri radyasyon, kemoterapi, immünoterapi ve cerrahidir. Kemoterapi kolorektal kanser için en yaygın kullanılan tedavi yöntemidir ve hastaların hastalıksız sağkalımını ve genel sağkalımını iyileştirmeye yardımcı olur. Ancak çoğu kemoterapötik ilaç sağlıklı hücrelere de zarar vererek bağışıklığın azalmasına, sindirim sisteminde işlev bozukluğuna ve kalp, böbrek ve karaciğer toksisitelerine yol açma gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Ayrıca, KRK sıklıkla tedaviden sonra nüksetmektedir ve dirençli KRK'si olan hastalar sürekli olarak daha da kötü sağkalım göstermektedir (Stintzing, 2014; Ponnusamy vd., 2016; Mármol vd., 2017; Sedlak vd., 2023). Bu gerçekler göz önüne alındığında, kolorektal kanser tedavisi için etkili ve zararsız yeni antikanser ilaçlar/moleküller geliştirmek için yoğun çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Terapötik peptitlerin kullanımı, katı tümörlere özellikle kolorektal kansere karşı umut vadeden yeni bir stratejidir (Lau ve Dunn, 2018; Chauhan vd., 2021; Saleh vd., 2022; Jia, 2023).

2. Terapötik Peptitlerin Genel Özellikleri

Peptitler, iki ila elli aminoasitten oluşan kısa zincirlerdir ve genellikle disülfid bağları ile stabilize edilirler. Peptitler, farklı biyokimyasal özellikleri ve terapötik potansiyellerinden dolayı son yıllarda benzersiz bir terapötik ajan sınıfı haline gelmiştir. Terapötik peptitler genellikle hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler, iyon kanalı ligandları veya anti-enfektif maddeler olarak işlev görür. Hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanırlar ve terapötik proteinler ve antikolar dahil olmak üzere biyolojik maddelere benzer bir şekilde hücre içi olayları tetiklerler. Terapötik peptitler, proteinlere ve antikolara göre birkaç önemli avantaja sahiptir: boyutları küçüktür, sentezlenmesi kolaydır ve hücre zarlarına

nüfuz etme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca yüksek aktiviteye, özgüllüğe ve afiniteye, minimum ilaç-ilaç etkileşimine ve biyolojik ve kimyasal çeşitliliğe sahiptirler. Peptitlerin diğer avantajları ise belirli organlarda (örneğin böbrek veya karaciğer) birikmemeleri ve düşük toksisite sağlamalarıdır. Ayrıca hızla sentezlenebilir ve kolayca modifiye edilebilirler ve rekombinant antikorlardan ve proteinlerden daha az immünojeniktirler. Avantajlarının yanı sıra terapötik peptitler, *in vivo* stabiliteleri gibi bazı önemli dezavantajlara sahiptir. Ayrıca kısa bir yarı ömür, düşük biyoyararlanım ve endüstriyel üretim zorluğu dezavantajları arasındadır (McGregor, 2008; Boohaker vd., 2012; Marqus vd., 2017).

Terapötik peptitler, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi farklı hastalıkların tedavisinde umut verici terapötik ajanlar olarak geliştirilmiş ve uygulamaları artmıştır. Kanser uygulamaları için peptitler, onkojenik proteinler gibi spesifik molekülleri hedeflemek ve bunlarla etkileşime girmek için dizilerinde ve yapılarında afinitelerini arttırabilecek şekilde tasarlanabilmektedir. Bu nedenle günümüzde peptitler kanser tedavisinde yeterli inhibitörler olarak kabul edilmektedir (Lau ve Dunn, 2018; Seyfi vd., 2019). Yüksek özgüllük, biyolojik aktivite ve düşük toksisite nedeniyle peptitler, özellikle kanser hastalıklarında aday yeni terapötik ajanlar ve ilaçlar olarak kabul edilir (Shoombuatong vd., 2018; Wang vd., 2022).

Tablo 2.1. Terapötik peptitlerin avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Düşük toksisite	Düşük stabilite
Yüksek hedef özgüllüğü ve seçiciliği	Zayıf membran geçirgenliği
Geniş hedef yelpazesi	Kötü oral biyoyararlanım
Yüksek etki gücü	Zayıf çözünürlük
Daha az yan etki	Yüksek üretim maliyeti
Dokularda düşük birikim	Zayıf aktivite
Yüksek biyolojik ve kimyasal çeşitlilik	Hızlı temizleme

2.3. Terapötik Peptit Türleri

Boohaker vd. (2012) kanser tedavisi için mevcut terapötik peptitleri üç ana grupta sınıflandırmıştır: antimikrobiyal/por oluşturuucu peptitler, hücre geçirgen peptitler ve tümör hedefli peptitlerdir.

2.3.1. Antimikrobiyal/por oluşturuucu peptitler (AMP)

AMP/por oluşturan peptitler, insan, bitki ve hayvan hücrelerinin farklı doku ve hücre tipleri tarafından üretilen, genlerle kodlanmış ve doğuştan gelen doğal bağışıklık savunma mekanizmasının bir parçası olan küçük peptitlerdir (Gaspar vd., 2013; Marqus vd., 2017). Antimikrobiyal Peptit Veritabanı (APD)'na göre doğada 3569 antimikrobiyal peptit içerir. Bu peptitlerin 380' i bakterilerde, 5'i arkealarda, 8'i protistalarda, 25'i mantarlarda, 371'i bitkilerde ve 2600'ü hayvanlarda bulunmaktadır (APD, 2023). AMP'ler arjinin gibi bazik katyonik aminoasitlerce zengin peptitlerdir ve arjininin sahip olduğu katyonik yük sayesinde peptitleri negatif yüklü membranlara çekerler. Elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü bakteri hücre zarlarına bağlanıp işlevlerini bozarlar ve ölümüne sebep olurlar. Son yıllarda yapılan araştırmalar, antimikrobiyal peptitlerin sadece mikroorganizmalara değil, aynı zamanda tümör hücrelerine karşı da etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Tümör hücre zarlarının bakteriyel zarlar gibi anyonik özellik göstermesi nedeniyle, katyonik antimikrobiyal peptitlerin bu zarlarla elektrostatik olarak bağlandığı ve etkileşime geçtikten sonra zar bütünlüğünü bozarak zarın içine yerleştiği düşünülmektedir. Kanser hücreleri normalde zwitteriyonik olan sağlıklı hücrelerin aksine, genellikle dış zarlarında negatif yüklü fosfatidilserin (PS), lipopolisakkarit, teikoik asit, fosfatidilgliserol fosfolipid baş grupları gibi anyonik yapılara sahiptir (Lien ve Lowman, 2003; Zhong vd., 2020). Antimikrobiyal katyonik peptitler, kanser hücresi zarlarının bu özelliğinden dolayı kanser hücresini hedefler ve nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklerler. Nekrozda, AMP'ler kanser hücresi zarındaki negatif yüklü molekülleri hedefler ve hücre lizisine neden olur; apoptozda ise mitokondriyal membranın bozulmasına neden olurlar (Lien ve Lowman, 2003; Marr vd., 2006; Boohaker vd., 2012). AMP'ler hücre duvarı ve hücre zarına etki edebildiği gibi hücre içi mekanizmalar (örneğin, mitokondri, protein sentezi, DNA/RNA veya temel enzimler) üzerinde de etkili olabilmektedir. Hücre içine etki eden AMP'lerin

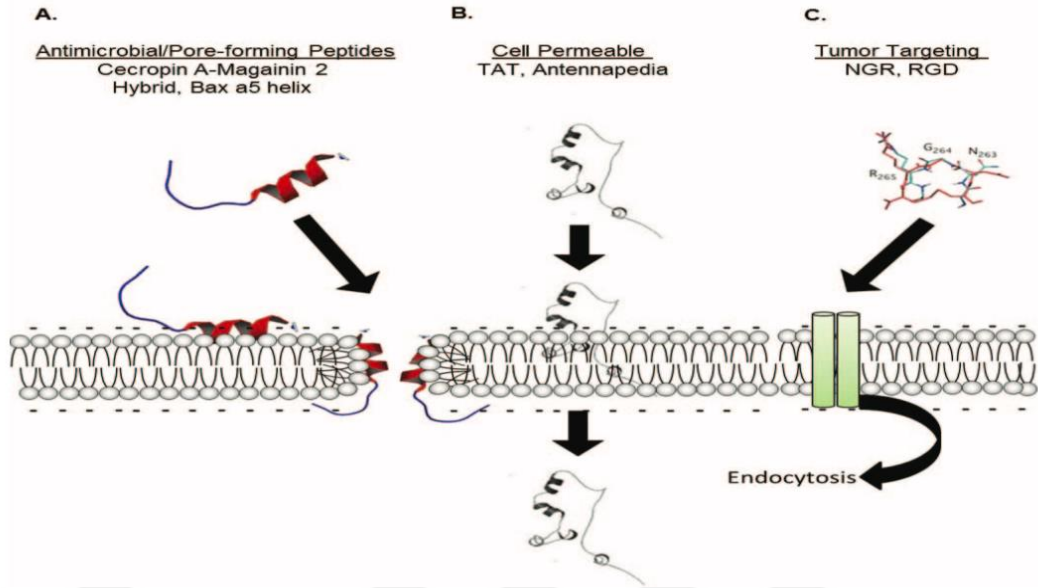
çoğu nükleik asitleri hedeflemektedir. Pozitif yüklü AMP'ler, negatif yüklü nükleik asitlere (DNA ve/veya RNA) bağlanarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği de bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kaynaklı çeşitli katyonik antimikrobiyal peptitlerin hücre zarının bütünlüğünü bozarak prostat, meme, melanom, kolon kanser hücreleri üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2018; Emelianova vd., 2018; Chauhan vd., 2021).

2.3.2. Hücre geçirgen peptitler (HGP)

Bu peptitler plazma membranı boyunca yer değiştirebilir ve küçük moleküllerden (örneğin DNA, siRNA ve plazmid) oligonükleotidlere ve proteinlere kadar değişen moleküllerin hücresel alımını kolaylaştıran kısa peptitlerdir. Bunlara kargo peptitlerde denmektedir ve ilaç dağıtımı için umut verici bir mekanizmadır (Regberg vd., 2012). Bir HGP örneği, transkripsiyonel trans-aktivatör (TAT)'dür. Tat peptiti, HIV'den türetilir ve hücre zarını kolayca geçebilir. Yapılan bir çalışmada Tat peptidine konjüge edilen doksorubisinin insan meme kanseri hücresi gibi ilaca dirençli tümör hücreleri tarafından alındığı ve ölümleriyle sonuçlandığı belirlendi (Liang vd., 2005; Marqus vd., 2017).

2.3.3. Tümör hedefli peptitler (THP)

Bu peptitler, tümör hücrelerindeki hücre zarı üzerinde ifade edilen reseptörlerini tanır ve hedefler. Örneğin, RGD peptiti, meme kanseri gibi bazı kanser hücrelerinin zarında ifade edilen $\alpha\beta3$ ve $\alpha\beta5$ integrinlerini tanıyan ve bunlara bağlanan Arg-Gly-Asp dizisini içerir (Chen vd., 2012; Marqus vd., 2017). Diğer bir tümör hedefleme peptiti bir Asn-Gly-Arg dizisi içeren NGR'dir. NGR, mide kanseri, pankreas kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu gibi endotelial tümör hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen aminopeptidaz N'ye (APN) (CD13 olarak da bilinir) bağlanır (Chen vd., 2010). Bu tanıma dizilerinden dolayı tipik olarak ikincil bir kemoterapi ajanını veya bir biyolojik ajanı tümörlere hedeflemek için ilaç taşınımının yanısıra biyogörüntüleme, biyosensör gibi kullanım alanları vardır (Xiong vd., 2005).



Şekil 2.1. Terapötik peptitlerin sınıflandırılması: (A) antimikrobiyal/por oluşturuucu peptitler, (B) hücre geçirgen peptitler ve (C) tümör hedefli peptitler (Boohaker vd., 2012)

2.4. Terapötik Peptitlerin Antikanser Etki Mekanizmaları

TP'ler kanser hücrelerinde meydana getirdiği etkiye göre üç sınıfa ayrılabilir: sinyal iletim yollarını inhibe eden peptitler, hücre döngüsünü durduran peptitler ve doğrudan apoptozu veya nekrozu indükleyen peptitler.

2.4.1. Sinyal iletim yollarını hedefleyen terapötik peptitler

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolu hem normal hücrelerin hem de birçok kanser hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerini içermektedir. MAPK'ler hücrel sinyal iletim basamaklarında önemli bir role sahiptir ve dış büyüme faktörleri, hormonlar, besin durumu veya strese yanıt olarak hücre içi olayları tetikler (Hughes vd., 2016). Bu sinyaller çekirdeğe iletilerek gen ekspresyonunda değişikliklere neden olur. Birçok terapötik peptit, MAPK'leri inhibe etmek için tasarlanmıştır. MAPK yolağının yapısal aktivasyonu özellikle pankreas, kolon, akciğer, yumurtalık ve böbrek tümörlerinde gözlenmektedir. Memeli hücrelerinde bulunan MAPK'ların üç ana karakterize edilmiş alt ailesi, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK'ler), c-Jun amino terminal kinazlar (JNK'ler) ve p38 MAPK'leri içerir. Ras/Raf/MEK/ERK yolunu hedefleyen küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesi,

kanser tedavisi için büyük potansiyele sahiptir (Liu vd., 2007). Li vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada; MEK1/2 inhibitörden türetilen bir MEK inhibitörü ile RGD peptitinden oluşan bir dizi konjuge edilmiştir. RGD-MEKI konjugatlarının, ERK1/2 sinyalini inhibe ederek melanom A375 hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu belirlendi.

2.4.2. Hücre döngüsünü hedefleyen terapötik peptitler

Hücre döngüsü, iki gap fazı G1 ve G2'nin yanı sıra S fazı ve M fazı dahil olmak üzere dört farklı fazdan oluşur. Bir hücrenin hücre döngüsünün farklı fazları boyunca ilerlemesi, birkaç siklin-bağımlı kinaz sınıfının (Cdks) kontrolü altındadır (Suryadinata vd., 2010). Hücre döngüsü fazları farklı Cdk'lar tarafından kontrol edilir. Hücrede Cdk'lerin aktivasyonu, Cdk inhibitörleri (CKI'ler) tarafından düzenlenir. Memelilerde iki ana CKI ailesi vardır: (1) INK4 proteinleri: p16, p15, p18 ve p19 ve (2) CIP/KIP proteinleri; p2, p27 ve p57. Peptitler, çok spesifik olarak siklinler veya sikline bağımlı kinazlar etkileşime girecek şekilde tasarlanabilir. Örneğin; Tümör baskılayıcı protein p16, siklin D'nin bu kinaza bağlanmasını önleyen Cdk4/6'ya bağlanarak hücrelerin G1'den S fazına ilerlemesini engeller (Sherr vd., 2016). Bir grup araştırmacı pRb fosforilasyonunun yanı sıra siklin D-Cdk4 kompleksinin oluşumunu inhibe eden Cdk4/6'ya bağlanan p16 proteininin (84-103 AA) 20 AA sentetik bir peptitini elde ettiler ve yaptıkları çalışmalarda HaCat, MCF-7 meme kanseri hücreleri, MRC-5 fibroblastları, HT-29 kolon karsinom hücreleri ve T3 fare fibroblastlarının hücre döngüsünün S-fazına ilerlemesini engellediği belirlendi (Fahraeus vd., 1998).

2.4.3. Hücre ölümünü indükleyen terapötik peptitler

Kanser hücreleri sıklıkla kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanan inaktive edilmiş apoptotik yollar içerir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklemek için terapötik peptitler geliştirmek çok önemlidir. Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerden oluşur ve apoptozun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynarlar. Normal hücreler de bu iki protein grubu arasında sağlıklı bir denge vardır. Ancak, anti-apoptotik proteinler kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin verir. Bu nedenle kanser hücrelerinde

Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin hedeflenmesi, kanser tedavisi için etkili bir terapötiktir (Brunelle vd., 2009). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, dört BH domaininin (BH1-BH4) tamamını, ilk üçünü ya da yalnızca BH-3 domainini içerebilir, bu proteinler şunlardır: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1 ve Bcl-B (Gross vd., 1999; Marqus vd., 2017). Kashiwagi vd. (2007), CPP Tat peptidini, Bim'den türetilen BH3 domaini ile birleştirmiş ve Tat-Bim peptidinin fare T-hücreli lenfoma, melanom ve pankreatik kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir.

2.5. Tilapia piscidin 4'ün (TP4) Kimyasal Özellikleri ve Antikanser Aktivitesi

Piscidinler, balık mast hücreleri tarafından eksprese edilen katyonik AMP'lerdir. Piscidin ailesi, amfipatik bir α -sarmal yapıya sahip, yapısal olarak 18-26 aminoasit içeren olgun peptitlerden oluşur (Noga vd., 2009). Bir deniz AMP'si olan ve deniz balığı Nile Tilapia'dan (*Oreochromis niloticus*) tanımlanan Tilapia piscidin 4'ün (TP4) anti-bakteriyel, yara iyileştirici, immünomodülatör ve antikanser aktiviteleri dahil olmak üzere çoklu biyolojik fonksiyonlar gösterdiği bilinmektedir (Peng vd., 2012; Mahrous vd., 2020; Dyshlovoy ve Honecker, 2020).

Tablo 2.2. TP4'ün kimyasal özellikleri

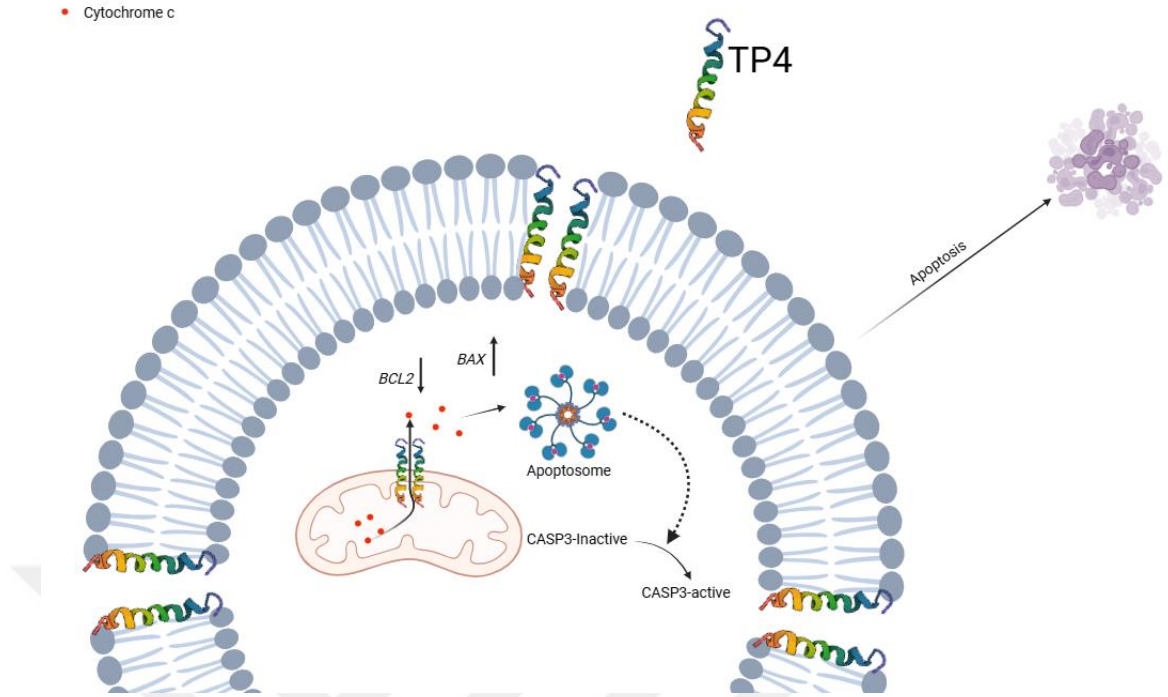
TP4'ün Kimyasal Özellikleri	
MW	: 2.981.57 kDa
Saf suda çözünürlüğü	: %100
Membran protein	: Evet
İzoelektrik noktası	: 12.72
Aminoasit dizisi	: F I H H I I G G L F S A G K A I H R L I R R R R R



Şekil 2.2. TP4'ün 3 boyutlu yapısı (RSCB, PDB; <https://www.rcsb.org/structure/5h2s>)

Son zamanlarda TP4 peptidinin antikanser etkileri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Su vd. (2019) tarafından glioblastoma hücreleri üzerine (U87MG, U251) yapılan çalışmada TP4, reaktif oksijen türlerini yükseltirken ATP'yi azalttığı ve nekrotik bir biyobelirteç olan siklofilin A salınımını önemli bir ölçüde arttırdığı belirlendi. Ayrıca, reaktif oksijen türlerindeki artışın glioblastoma hücrelerinde DNA hasarına ve hücre ölümüne sebep olduğu belirlendi. Su vd. (2021) tarafından ayrıca TP4'ün insan sinoviyal sarkomu Aska-SS ve SW982 hücre hatlarında nekrotik hücre ölümüne neden olabileceğini gösterilmiştir. Çalışmada TP4'ün reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini başlattığını ve ayrışan protein-2, süperoksit dismutaz SOD-1 ve SOD-2 gibi antioksidan proteinleri düşürdüğü görülmüştür. Sonuçta, TP4'ün kanserli hücrelerde oksidatif durumu bozduğu ve insan sinoviyal sarkom hücrelerinde güçlü antikanser aktivite sergilediği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde, TP4'ün hücreler üzerindeki toksik etkisinin birincil olarak nekroza götürdüğü bildirilmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile yönlendirilen tirozin kinaz inhibitörleri EGFR sinyal yollarını bloke ederek küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca, TP4'ün yüksek konsantrasyonunda hücre zarı parçalanması gözlenirken, düşük konsantrasyonlarda kontrollü hücre ölümüyle

sonuçlandığı belirlendi (Ting ve Chen, 2018). Ayrıca, TP4'ün sitotoksitesi hem in vitro hem de in vivo koşullar altında üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre dizilerinde de test edilmiştir. TNBC hücreleri, mitokondriye seçici bağlanma ve sitozolik Ca^{2+} birikiminin indüklenmesi yoluyla TP4 tarafından karşılanan FBJ murin osteosarkoma viral onkogen homolog B'yi (FOSB) aktive ettiği görülmüştür. FOSB aşırı ekspresyonu, TNBC hücre ölümüyle sonuçlanırken, kalsiyum sinyalinin inhibisyonu, FOSB indüksiyonunu ortadan kaldırır ve TP4'ün neden olduğu TNBC hücre ölümünü bloke eder. Sonuç olarak bu çalışma TP4'ün, özellikle TNBC'de FOSB'yi güçlü bir şekilde indüklediğini ve FOSB indüksiyonu yoluyla TNBC'ye yönelik yeni bir terapötik yaklaşım sağladığını göstermiştir (Ting vd., 2016; Hazam ve Chen, 2020). Kuo vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada TP4 stok solüsyonu (MSP-4) MG63 osteosarkom kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Çalışma sonucunda MSP-4 peptidinin anti-apoptotik protein olan BCL-2'nin ekspresyon seviyesini düşürdüğü ve pro-apoptotik protein olan BAX ve BİD'in ekspresyonunun doz bağımlı olarak arttığını göstermektedir. Ayrıca, CASP9 ve CASP3 protein seviyelerinin sürekli olarak arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada MSP-4 kaynaklı apoptozis mekanizmasının, hem içsel yol (mitokondriyal apoptotik yol) hem de dışsal yol (reseptör aracılı apoptotik yol) tarafından aktive edildiği belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında rekombinant olarak üretilen TP4'ün HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik mekanizmaları araştırılmıştır.



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinde TP4'ün apoptotik indüksiyonu

2.6. AMP'lerin Elde Edilme Yöntemleri

AMP'ler bakteriler, böcekler, bitkiler, omurgalılar dahil olmak üzere çeşitli türler tarafından üretilir. AMP'lerin terapötik potansiyelleri nedeniyle, klinik araştırma ve temel çalışmaların ötesinde ilaç olarak kullanımı için artan bir talep vardır. Bu nedenle, AMP üretiminin yükseltilmesi için çeşitli üretim yöntemleri ve stratejileri ortaya çıkmıştır. AMP'lerin eldesinde başlıca üç üretim yöntemi bulunmaktadır. Bunlar; doğal kaynaklardan doğrudan AMP ekstraksiyonu, kimyasal sentez ve rekombinant tekniklerdir. Rekombinant yöntem, birçok yönden kimyasal yöntemle tercih edilmekte ve son yıllarda peptit üretimi için daha fazla düşünülmektedir. Rekombinant sistemler genellikle daha uygun maliyetlidir ve hem araştırma hem de farmasötik kullanımda büyük ölçekli üretim için sonsuz bir peptit üretimi kaynağı sağlar (Li, 2011; Li vd. 2012).

2.6.1. Doğal kaynaklardan doğrudan AMP ekstraksiyonu

AMP'ler doğal kaynaklardan doğrudan ekstraksiyon yöntemi ile elde edilebilir. Böcekler, omurgalılarda önemli bir rol oynayan adaptif bağışıklık sistemine sahip değildirler, ancak kendilerini mikrobiyal enfeksiyonlardan korumak için etkili bir doğal bağışıklık

geliştirmişlerdir. Birçoğu bakterilere, mantarlara, ökaryotik parazitlere ve/veya virüslere karşı doğrudan antimikrobiyal aktivite gösterse de katyonik peptitlerin doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde anahtar modülatör bir role sahip olduğu tespit edilmiştir (Bulet ve Stöcklin, 2005).

AMP'leri kodlayan genler, böcekler dışında memeliler, amfibiler ve balıklar dahil olmak üzere çok çeşitli farklı türlerden çok sayıda doku ve hücre tipinde ifade edilir. Daha yüksek omurgalılarda, bu peptitlerin birçoğunun epitelyal katmanlarla ilişkili olduğu veya dolaşımdaki nötrofiller veya doku mast hücreleri (MC'ler) tarafından sentezlenip salgılandığı bulunmuştur (Mulero vd., 2008).

2.6.2. Kimyasal sentez yoluyla üretim

Doğal kaynaklardan üretimin yanısıra AMP'lerin kimyasal yöntemler ile sentetik olarak sentezi mümkündür. Katı faz peptit sentezi (SPPS) en yaygın olarak kullanılan kimyasal sentez yöntemidir. Küçük ve orta boy peptitleri (30-50 kalıntı) üretmek için kullanılır. SPPS işleminde, ilk amino asit çözünmez bir polimer desteğe bağlanır ve hedef diziyi oluşturmak için peptit zincirinin uzatılmasıyla istenen peptit oluşur. Katı desteğe bağlanmış peptit bir kimyasal ile katı rezinden uzaklaştırılır. Reaktiflerin kullanılması ile oluşan yan ürünler etkili bir şekilde uzaklaştırılır. Sonuçta hem yüksek verimde hem de saflıkta istenen peptit üretilmiş olur (Li ve Brimble, 2019).

2.6.3. Rekombinant teknikler ile üretim

Antimikrobiyal peptitler bilimsel araştırmalar ve endüstriyel kullanımı gibi birçok özelliğe sahip olmalarının yanısıra AMP'ler üzerine çalışmaları sınırlayan ana faktörler, AMP'lerin elde edilmesinin zaman alıcı ve oldukça maliyetli olmasıdır (Neshani vd., 2018). AMP'lerin doğal kaynaklardan doğrudan ekstraksiyonu uzun ve yüksek maliyetlidir ayrıca birçok canlı türüne zarar vererek ekosistemi de tehdit etmektedir. Kimyasal sentez yöntemi ise çoklu karmaşık kimyasal adımlar içerir. Artan adım sayısı, peptit dizilerinde hata riskini de arttırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi birçok yönden kimyasal ve enzimatik sentez yöntemlerine tercih edilmekte ve son yıllarda peptit üretimi için daha fazla kullanılmaktadır.

2.6.3.1. Bakteriyel ekspresyon sistemleri

AMP'lerin bakterilerde rekombinant ekspresyonu başlıca iki konakçıda, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'te gerçekleştirilir. Hızlı çoğalması ve genomik yapısının iyi bilinmesi nedeniyle AMP üretimi için tercih edilen prokaryotik ekspresyon sistemi *Escherichia coli* hücresidir (Zorko vd., 2010; Schwarz vd., 2014). *E. coli*'nin bir ekspresyon sistemi olarak, memeli hücrelerine kıyasla daha yüksek ekspresyon seviyesi ve daha düşük kültür maliyeti gibi avantajlarına rağmen, düşük verim ve ürünün bozunmasını gibi istenmeyen yan etkiler içerir. Ayrıca AMP'lerin antimikrobiyal etkisinden dolayı *E. coli* gibi bakterilerde ekspresyonu toksik etkiye sebep olabilir (Schwarz vd., 2014; Yi vd., 2015).

2.6.3.2. Bitkisel ekspresyon sistemleri

Tıpta yeni antimikrobiyal bileşenlere olan talep ve bitki hücrelerine gen aktarımındaki son gelişmeler, bitkisel konaklarda rekombinant protein üretiminin ilerlemesini hızlandırdı. AMP'lerin bitki bazlı üretimi için kullanılan gelişmekte olan bir yöntem, bitki hücresi süspansiyonlarının kullanılmasıdır. Bitkisel reaktörler yalnızca toprak, su ve ışık gereksinimi duyduklarından düşük maliyetli üretim sistemleri olarak kabul edilmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinin uygun maliyetli olması ve bitki hücrelerinin kullanılması nedeniyle, bu yöntem, AMP üretiminin güvenilir ve giderek daha fazla kullanılan bir yolu olma potansiyeline sahiptir (Chahardoli vd., 2018).

2.6.3.3. Fungal ekspresyon sistemleri

Pichia pastoris ve *Saccharomyces cerevisiae*, rekombinant protein üretimi için en çok kullanılan maya ekspresyon sistemleridir (Cao vd., 2015; Vogl ve Glieder, 2013). Prokaryotik sistemlerde ökaryotik kökenli proteinler üretildiğinde, bazı durumlarda biyolojik aktivitelerini kaybedebilir ve inklüzyon cisimcikleri oluşturabilirler. Buna karşın, ökaryotik bir ekspresyon sistemi olan mayalar, ökaryotik proteinler için kritik olan disülfid bağı oluşumu ve glikozilasyon gibi post-translasyonel değişiklikleri gerçekleştirebilirler (Cregg, 2007). Ayrıca, AMP'lerin antimikrobiyal etkisinden dolayı bakterilerde ekspresyonu toksik etkiye sebep olabileceğinden AMP'lerin ekspresyonu için mayaların kullanımı daha avantajlıdır (Schwarz vd., 2014). Bu nedenlerle, ökaryotik proteinlerin üretiminde mayalar önemli bir avantaj sunmaktadır.

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*, genetik manipölasyonların kolaylığı, memeli hücrelerine göre daha ekonomik ve basit büyüme ortamı gereksinimi, yüksek intraselüler ve ekstraselüler protein üretimi kapasitesi ve metanol katabolizmasının ilk enzimi olan *alkol oksidaz 1 (AOX1)* gen promotörünün kontrollü gen ekspresyonu sağlaması gibi avantajları nedeniyle rekombinant protein üretiminde tercih edilmektedir (Hagenson vd., 1991; Cregg vd., 1993). *P. pastoris* 'in genomunda alkol oksidaz geninin iki farklı kopyası yer almaktadır. Bu kopyalardan AOX1 promotörü, hücredeki alkol oksidaz enzim aktivitesinin yaklaşık %85'ini düzenlerken, AOX2 promotörü bu aktivitenin %15'inden sorumludur. Dolayısıyla, rekombinant protein üretiminde AOX1 promotörü daha sık kullanılmaktadır. Ayrıca, GAP enziminin promotörü da glikolitik özellikleri nedeniyle rekombinant protein üretiminde tercih edilmektedir. (Cregg, vd., 2007; Vogl ve Glieder 2013).

Etkili bir protein üretimi için konakçı sistemin özelliklerine göre kodon optimizasyonu çok önemlidir. Kodon optimizasyonu belirli bir genin ekspresyonunu artırmak amacıyla, genin DNA dizisinde yer alan kodonları, hedef organizmanın kodon kullanım tercihlerine daha uygun olanlarla değiştirmesi anlamına gelir. Bu işlem, protein sentezini hızlandırabilir ve gen ürününün miktarını artırabilir (Karaoğlu, M. ve Erden-Karaoğlu, F., 2020).

Son yıllarda rekombinant AMP üretimi için maya ekspresyon sistemlerinin kullanımı oldukça önem kazanmıştır. Mayada rekombinant AMP üretimine bir örnek, *Mytilus coruscus*'ta tanımlanan bir AMP olan Mytichitin-A'nın ekspresyonu ve saflaştırılmasıdır (Meng vd., 2016). Ayrıca, Neshani vd. (2018), Tai vd. (2021) ve Huang vd. (2020) tarafından yapılan farklı çalışmalarda TP4 peptidinin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretimi gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Primerler

Tez çalışmasında kullanılan primerler NCBI blast Input programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Primerlerin 100 µM konsantrasyonda stok solüsyonları TE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Overlap PZR kullanılan primerler

Primer	Baz Dizisi	Tm (°C)
TP4F1	AAACTCGAGAAAAGACATCACCACCATCATCACG	63.21°C
TP4R1	CCCTTGAAAGTATAGGTTCTCGTGATGATGGTG	63.16°C
TP4F2	ACTTTCAAGGGTTTATTCACCATATTATAGGCGG	60.80°C
TP4R2	CGCTTTTCCGGCGCTGAAGAGACCGCCTATAATA	66.83°C
TP4F3	CCGGAAAAGCGATCCATAGACTGATCCGACGCCG	69.24°C
TP4R3	TTTCTAGATCAACGCCTCCGGCGTCGGAT	64.35°C

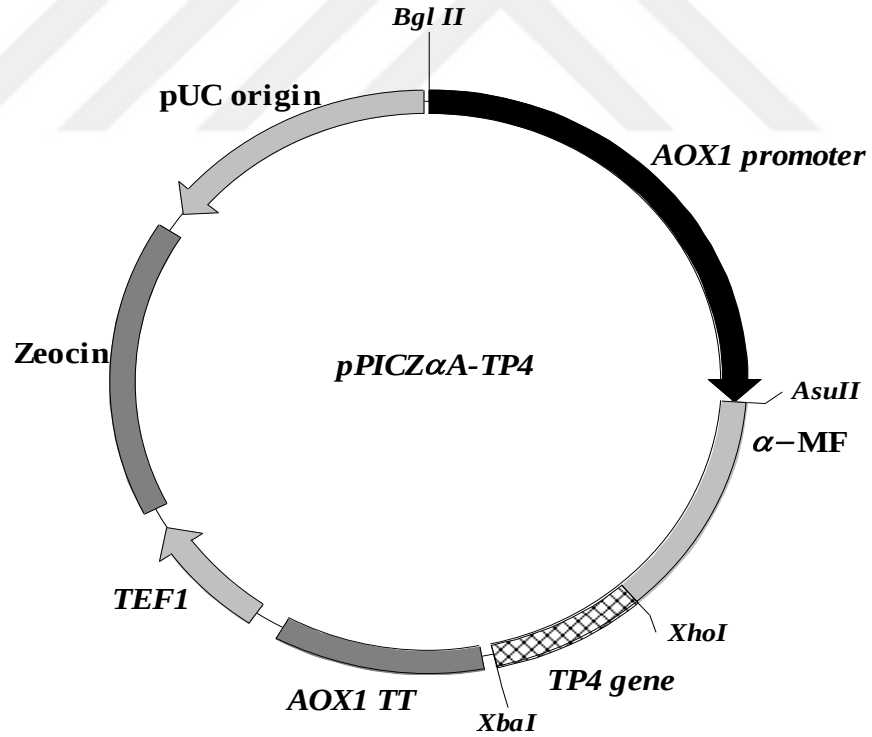
3.1.2. Mikroorganizma suşları ve besiyerleri

Klonlama ve plazmidlerin elde edilmesinde *Escherichia coli* XL1-Blue suşu kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinin çoğaltılması için LB besiyeri hazırlanmış ve uygun antibiyotiklerle desteklenmiştir. Klonlamadan sonra pozitif *E. coli* XL1-Blue hücre transformantların seçilmesi amacıyla LB agar besiyerine zeosin ilave edilmiştir. Ekspresyon için konukçu sistem olarak *Pichia pastoris* KM71H (Δ aox1::ARG4) suşu kullanılmıştır. *P. pastoris* hücrelerinin geliştirilmesinde YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 dekstrozu) besiyeri kullanılmıştır.

3.1.3. Vektör ve restriksiyon enzimleri

Rekombinant protein üretimi için ekspresyon vektörü olarak pPICZ α A plazmid (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır. pPICZ α A vektörü, metanolle indüklenen AOX1 promotörüne, rekombinant proteinlerin hücre dışına salgılanmasını sağlayan α -sekresyon sinyal faktörüne, hem *E.coli*'de hem de *P. pastoris*'de transformant seçimini sağlayan zeosin direnç genine sahiptir.

Hedef peptitleri kodlayan DNA dizilerinin pPICZ α A vektörüne bağlanması aşamasında yapışkan uçlu vektör ve DNA dizilerinin elde edilmesi amacıyla *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Restriksiyon enzimleriyle kesim yapıldıktan sonra TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerinin pPICZ α A vektörü ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon sonucunda hedef DNA dizisini içeren rekombinant plazmid elde edilmiştir. TP4 peptidini kodlayan DNA dizisini içeren plazmid pPICZ α A-TP4 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.1. pPICZ α A-TP4 ekspresyon vektörünün şematik gösterimi

3.1.4. Hücre hatları

HT-29 ve HGF-1 hücre hatları ATCC (ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.5.1. Rekombinant protein üretim deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler

10X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu: 10x TBE için 54 gr Tris, 27.5 gr borik asit 600 ml distile su ile çözülmüş ve saf HCL ile pH= 8,0'a ayarlandıktan sonra 40 ml EDTA eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

10X TAE (Tris-acetate-EDTA) tamponu: 10x TAE için 48.4 gr Tris, 11.42 ml asetat 600 ml distile su ile çözülmüş ve saf HCL ile pH= 8,3'e ayarlandıktan sonra 20 ml EDTA eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

YPD Besiyeri: *P. pastoris* KM71H suşunun geliştirilmesinde YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz) kullanılmıştır. Plakada ise koloni seçilimi için agar ve zeosin içeren YPD hazırlanmıştır.

LB Lennox: *Escherichia coli* XL1-Blue hücrelerinin büyütülmesinde zeosin içeren LB Lennox (%0,5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %0,5 NaCl) kullanılmıştır.

Restriksiyon endonükleazlar: Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Endonükleazlar kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır.

Ligasyon: Ligasyon işlemlerinde Fermentas (MD, ABD) ligasyon kitleri kullanılmıştır.

PZR analizleri: Phusion™ Hot Start II DNA Polymerase, Fermentas (MD, ABD) enzim kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Farklı şekilde belirtilmediği sürece kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından tedarik edilmiştir.

3.1.5.2. Hücre kültürü deneylerinde ve biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Dulbeco's Modified Eagle's Medium	: Serana
McCoys'5A Medium	: Biowest
Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
L-Glutamin	: Serena
Penisilin-Streptomisin	: HyClone
Tripsin-EDTA	: Serana
Cell Proliferation Kit (MTT)	: Biological Industries
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest
T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent:	Thermo Scientific™
RNA izolasyon Kiti	: RNeasy Mini Kit (50), Qiagen
RT-qPZR Kit	: Qiagen SYBR Green PCR Master Mix
cDNA sentez kiti	: iScript™ cDNA Kit, Bio-Rad
BCL-2 ELISA kit	: Cusabio
BAX ELISA kit	: Cusabio
CASP3 ELISA kit	: Cusabio
Aquaguard-1	: Vivacell Bioscience
Aquaguard-2	: Vivacell Bioscience
TAS Assay Kiti	: Rel Assay Diagnostics
TOS Assay Kiti	: Rel Assay Diagnostics

3.1.6. Yararlanılan alet ve cihazlar

Real-time PZR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex
PZR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
Floresans mikroskobu	: Olympus BX63
Işık mikroskobu	: Leica DM 4000B
Çalkalamalı inkübatör (8-60 °C)	: ISS-7200 Incubated Shaker
Soğutmalı santrifüj	: Beckman Coulter Allegra X-30R
Spektrofotometre	: Spektronic 20 Genesis
pH metre	: Radiometer meterlab PHM 210
Elektroforez tankı	: Thermo Owl Easycast B2-BP

Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	: Shimadzu ATX 120
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart
Saf su cihazı	: Nüve
Buz makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	: Hairer
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	: Haier, New Brunswick U410
Mikrodalga fırın	: Arzum
Otoklav	: Sümer SM75
Elektroporasyon Cihazı	:Bio-Rad Gene Pulser Xcell
Elektroporasyon Sistemi	
Jel görüntüleme cihazı	: Bio-Rad ChemiDoc Imaging System
Ultrasonikatör VCX750	: Sonics Vibra Cell VCX750
SDS-PAGE Elektroforez Sistemi	:Bio-Rad Mini-protean Electrophoresis System
Qubit Fluorometer	: Qubit 4 Fluorometer
ELISA okuyucu ve yıkayıcı	: Epoch Biotek
Mikroskop	: Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Kabin	: Bil-ser B2 Class II
CO ₂ inkübatörü	: Nüve EC 160
Santrifüj	: Hanil, Smart R17
Şarjlı otomatik pipet	: Isolab
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Su banyosu	: Memmert

3.2. Yöntem

3.2.1. TP4 Peptitinin *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde üretilmesi ve saflaştırılması

3.2.1.1. Biyoinformatik analizler, kodon optimizasyonu

TP4 peptitinin moleküler ağırlığı, suda çözünürlüğü ve izoelektrik noktası Protein Calculator v3.4 (<https://protcalc.sourceforge.net>) programı ile tespit edilmiştir. Protein databankasından (RSCB, PDB <https://www.rcsb.org>) ise peptitin aminoasit dizisine, membran proteini olduğuna ve 3 boyutlu yapısına ulaşılmıştır. TP4 peptitini kodlayan nükleik asit dizisine NCBI GenBank XM_002491337 erişim no'lu *P. pastoris* GS115 TP4 gen dizisi baz alınarak ulaşılmıştır.

Elde edilen nükleotid asit dizisi *P. pastoris* Genscript (NJ, USA) kodon kullanım sıklığı tablosuna göre (<https://www.genscript.com>) kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. TP4 peptitini kodlayan DNA dizisi tespit edildikten sonra dizinin uçlarına restriksiyon enzim kesim bölgeleri, stop kodonu, G-TEV Proteaz bölgesi ve C- terminal 6x His dizisi (His-tag) eklenmiştir (Şekil 3.2).

TTTATTCACCATATTATAGGCGGTCTCTTCAGCGCCGAAAAGCGATCCA TAGACTGATCCGACGCCGGAGGCGTTGA-TP4 codon optimized						
CATCACCATCACCATCAC==> His-tag CATCACCACCATCATCAC						
ENLYFQ/G-TEV	PROTEASE	SITE	==>	codon	optimized	for pichia
GAGAACCTATACTTTCAAGGG						
CTCGAG-XhoI SITE						
TCTAGA-XbaI SITE						
5-CTC GAG CAT CAG CAC CAT CAT CAC GAG AAC CTA TAC TTT CAA GGG TTT ATT CAC CAT ATT ATA GGC GGT CTC TTC AGC GCC GGA AAA GCG ATC CAT AGA CTG ATC CGA CGC CGG AGG CGT TGA TCT AGA-3						
3-GAG CTC GTA GTG GTG GTA GTA GTG CTC TTG GAT ATG AAA GTT CCC AAA TAA GTG GTA TAA TAT CCG CCA GAG AAG TCG CGG CCT TTT CGC TAG GTA TCT GAC TAG GCT GCG GCC TCC GCA ACT AGA TCT-5						

Şekil 3.2. TP4 geni, restriksiyon enzim kesim bölgeleri, stop kodonu, G-TEV Proteaz bölgesi ve C- terminal 6×His dizisini içeren optimize edilmiş nükleotid dizisi

3.2.1.2. TP4 peptidini kodlayan DNA dizisinin üretimi

TP4 peptidini kodlayan DNA dizisini elde etmek için sentetik olarak temin edilen ve birbirinin kısmen tamamlayıcısı olan 6 ayrı primer kullanılmıştır. Bu primerler overlap PZR yöntemiyle sırasıyla birleştirilmiş ve 141 bp uzunluğundaki DNA dizisi elde edilmiştir. Gradient PZR yapılmıştır ve bağlanma sıcaklığı 55-65 °C arasında dağıtılarak reaksiyondaki primerlerin bağlanması için optimum bağlanma sıcaklığı ile devam edilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen 1, 2 ve 3. PZR reaksiyonlarında hazırlanan reaksiyon karışımları ve sıcaklık döngü koşulları Tablo 3.2’ te belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Overlap PZR reaksiyon karışımları ve koşulları

1.A PZR reaksiyonu	1.B PZR reaksiyonu	1.C PZR reaksiyonu	
22 µl ddH ₂ O	22 µl ddH ₂ O	22 µl ddH ₂ O	
7 µl tampon	7 µl tampon	7 µl tampon	
1.7 µl dNTPs	1.7 µl dNTPs	1.7 µl dNTPs	
0,17 µl Taq DNA polimeraz	0,17 µl Taq DNA polimeraz	0,17 µl Taq DNA polimeraz	
1.5 µl F1 ve 1.5 µl R1	1.5 µl F2 ve 1.5 µl R2	1.5 µl F3 ve 1.5 µl R3	
Reaksiyon koşulları			
Aşama	Sıcaklık (°C)	Döngü Sayısı	Süre
İlk Denatürasyon	98	1	30 sn
Denatürasyon	98		10 sn
Bağlanma	55-65	10	30 sn
Uzama	72		10 sn
Son Uzama	72	1	30 sn

*Not: 1A (1. PZR ve A tüpündeki reaksiyon)

Tablo 3.2. Overlap PZR reaksiyon karışımları ve koşulları (Devamı)

2.PZR reaksiyonu			
63 µl ddH ₂ O			
20 µl tampon			
5 µl dNTPs	Dört tüpe ayrılmış ve her tüp 2A1 55 °C, 2A2 57 °C, 2A3 61.4 °C, 2A4 65 °C olarak numaralandırılmış ve belirtilen sıcaklıklarda gradient PZR yapılmıştır. *		
1 µl 1A PZR ürünü			
1 µl 1B PZR ürünü			
5 µl F1			
5 µl R2			
0,5 µl Taq DNA polimeraz			
Reaksiyon koşulları			
Aşama	Sıcaklık (°C)	Döngü Sayısı	Süre
İlk Denatürasyon	98	1	30 sn
Denatürasyon	98		10 sn
Bağlanma	55-65	34	30 sn
Uzama	72		10 sn
Son Uzama	72	1	30 sn
*Not: 2A1 (2. PZR ve A1 tüpündeki reaksiyon)			
3.PZR reaksiyonu			
63 µl ddH ₂ O			
20 µl tampon			
5 µl dNTPs			
1 µl 2A3			
1 µl 1C PZR ürünü	Dört tüpe ayrılmış ve her tüp 3B1 55 °C, 3B2 57 °C, 3B3 61.4 °C, 3B4 65°C olarak numaralandırılmış ve belirtilen sıcaklıklarda gradient PZR yapılmıştır. *		
5 µl F1			
5 µl R3			
0,5 µl Taq DNA polimeraz			

Tablo 3.2. Overlap PZR reaksiyon karışımları ve koşulları (Devamı)

Reaksiyon koşulları			
Aşama	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
İlk Denatürasyon	98	1	30 sn
Denatürasyon	98		10 sn
Bağlanma	55-65	34	30 sn
Uzama	72		10 sn
Son Uzama	72	1	30 sn

*Not: 3B1 (3. PZR ve B1 tüpündeki reaksiyon)

3.2.1.3. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Tez çalışmasında 2. ve 3. PZR ürünlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2 g agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1×TBE tamponu ilave edilmiştir. Mikrodalga fırın içerisinde çözündürülen bu karışım yaklaşık olarak 50-55 °C'ye soğutulup, üzerine 2 µl ethidiumbromide (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiş ve jel kalıbına dökülüp tarak takıldıktan sonra jel katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşmanın ardından jel 600 ml 1×TBE tamponu ile doldurulan elektroforez tankına alınmıştır. Jelin kuyucuklarına 5 µl marker (1000 bp aralıklı), DNA yükleme boyası ile 5 µl karıştırılan PZR ürünleri yüklenmiş ve 100 V'da 75 dk yürütülmüştür. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra PZR ürünleri cihazda görüntülenmiştir. 1. Jel Elektroforezi sonucu jelde en iyi olan 2. PZR ürünü seçilmiş (2A3) ve 3. PZR'a geçilmiştir. 2. Jel Elektroforezi sonucu jelde en iyi olan (3B1 ve 3B2 birleştirilmiştir) ve TP4 peptidini kodlayan 141 bç lik DNA dizisine ait 3. PZR ürünleri ticari saflaştırma kiti (Jel ve PZR Pürifikasyon Kiti, Hydra Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Tablo 3.3. Jel elektroforezi reaksiyon karışımları ve koşulları

1.Agaroz jel elektroforezi
Yükleme sırası
Marker (5 µl), 1A (5 µl), 1B (5 µl), 2A1 (5 µl), 2A2 (5 µl), 2A3 (5 µl), 2A4 (5 µl), marker (5 µl)
2.Agaroz jel elektroforezi
Yükleme sırası
Marker (5 µl), 1A (5 µl), 1B (5 µl), 1C (5 µl), 2A3 (5 µl), 3B1 (5 µl), 3B2 (5 µl), 3B3 (5 µl), 3B4 (5 µl), marker (5 µl)



Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforez düzeneği

3.2.1.4. Rekombinant ekspresyon plazmidinin elde edilmesi

TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerine ait saflaştırılmış PZR ürünleri (141 bç) ve pPICZαA vektörü (3593 bç), *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Kesilen DNA dizileri saflaştırma kiti (Jel ve PZR Pürifikasyon Kiti, Hydra Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak saflaştırılmıştır. pPICZαA vektörü ise %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenerek 90 V'da 50 dk yürütülmüştür. Daha sonra hedef bantlar UV ışınlarından korunarak agaroz jelden kesilmiş ve jelden DNA ekstraksiyon protokolü uygulanarak Genejet Gel Extraction kiti (Fermentas, MD, ABD) ile saflaştırılmıştır. Böylece hedef DNA dizileri ve pPICZαA vektörü ligasyona hazır hale getirilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesim yapıldıktan sonra TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerinin pPICZαA vektör DNA'sına bağlanması için ligasyon reaksiyonu karışımı hazırlanmıştır. Ligasyon sonucunda hedef DNA dizisini içeren rekombinant plazmid elde edilmiştir.

Tablo 3.4. TP4 geninin ve pPICZαA vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesimi

TP4 için reaksiyon bileşenleri	Miktar
ddH ₂ O	102 µl
10X fast digest buffer	15 µl
Gen (PZR pürifikasyon ürünü)	30 µl
<i>XhoI</i>	1.5 µl
<i>XbaI</i>	1.5 µl
Toplam Hacim	150 µl
Vektör için Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
ddH ₂ O	67 µl
10× fast digest buffer	10 µl
pPICZαA vektörü	20 µl
<i>XhoI</i>	1.5 µl
<i>XbaI</i>	1.5 µl
Toplam Hacim	100 µl

TP4 peptitini kodlayan yapışkan uçlu DNA fragmentlerinin (insert DNA) pPICZαA vektörüne ligasyonu 20 µl hacimdeki ligasyon karışımı içerisinde gerçekleştirilmiştir. Petrideki zeosin kontrolü için ligasyon yapılmamış sadece plazmid içeren reaksiyon hazırlanmıştır.

Tablo 3.5. Ligasyon reaksiyon bileşenleri

Ligasyon Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
ddH₂O	13 µl
T4 ligasyon tamponu	2 µl
pPICZαA vektörü	1 µl
Gen (insert DNA)	3 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam Hacim	20 µl
Kontrol (sadece vektör) Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
ddH₂O	16 µl
T4 ligasyon tamponu	2 µl
pPICZαA vektörü	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

3.2.1.5. *E. coli* XL1-Blue ve *P. pastoris* KM71H hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

E. coli XL1-Blue hücreleri CaCl₂ yöntemi ile kompetent hale getirilmiştir. LB Agar besiyerinden alınan tek bir koloni, 5 ml LB sıvı besiyerine eklenmiş ve 37°C'de 220 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde 18 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin optik yoğunluğu ölçülmüş ve 150 ml LB sıvı besiyerine 0,01 OD değeri ile başlatılacak şekilde aktarılmıştır. Hücreler, 37°C'de 220 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde 0,35 OD seviyesine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Bu seviyeye ulaştıklarında, hücreler buz üzerinde 20 dk bekletilmiş ve ardından 3000×g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti, 20 ml soğuk (buz üzerinde soğutulmuş) 0,1 M CaCl₂ çözeltisi ile süspanse edilmiş ve 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra tekrar santrifüj edilerek, elde edilen hücre peleti %15 gliserol içeren 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde (5 ml) çözülmüş ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100'er µl olarak dağıtılmıştır. Hazırlanan kompetent hücreler -80°C'de saklanmıştır.

P. pastoris KM71H hücreleri, lityum asetat yöntemine göre transformasyona uygun hale getirilmiştir (Wu ve Letchworth 2004). Agar plakadan alınan tek bir koloni, 5 ml YPD sıvı besiyerine eklenmiş ve 28°C'de 225 rpm hızında çalkalanarak gece boyunca inkübe edilmiştir. Gelişen kültürden, başlangıç hücre yoğunluğunu 0,1 OD olacak şekilde 50 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve hücreler 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 1,5 OD seviyesine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Bu OD seviyesine ulaşıldığında, kültür 3000×g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti, 10 ml resüspansiyon çözeltisinde (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) çözündürülmüş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, hücreler santrifüjlenmiş ve soğuk (buz üzerinde soğutulmuş) 1 ml 1 M sorbitol çözeltisinde çözülmüştür. Sorbitol ile yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Son aşamada, santrifüj ile elde edilen hücre peleti, %20 gliserol içeren 1 M sorbitol çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 80 µl'lik hacimlerde bölüştürülerek -80°C'de saklanmıştır.

3.2.1.6. Rekombinant plazmidin kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu

pPICZαA-TP4 rekombinant plazmidinin kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu için -80 °C'de muhafaza edilen kompetent *E. coli* XL1-Blue kültüründen 2 tüp alınmıştır ve işlemler buzun üzerinde yapılmıştır. Hücrelerin üzerine daha önceden hazırlanmış ligasyon karışımından ve sadece pPICZαA vektörü içeren kontrolden 7'şer µl eklenip hafifçe karıştırılmış ve bu karışımlar tekrardan buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre tamamlandıktan sonra karışımlara 42°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerinde 1 dk ısı şok uygulanmıştır. Daha sonra bu karışımlar buz

üzerine alınmış ve 5 dk burada bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımların üzerine oda sıcaklığında bekletilen LB sıvı besiyerinden 200 µl eklenip hafifçe karıştırılmış ve ardından 37°C’de 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra bu karışımlardan 100 µl alınarak 50 µg/ml oranında zeosin içeren LB agar petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C’deki inkübatörde 18-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra rekombinant plazmid olan petride oluşan koloniler arasında birkaçı seçilerek 100×’lik zeosin içeren LB-lennox sıvı besiyerine alınmıştır. Tüpler 37°C ve 120 rpm’deki çalkalamalı inkübatörde 18 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

3.2.1.7. *E. coli* XL1-Blue transformantlarının doğrulanması

E. coli XL1-Blue transformantlarından plazmid DNA izolasyonunda GeneJET Plazmid Miniprep Kit (Fermentas, MD, ABD) kullanılmış ve üretici protokolüne göre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Plazmid DNA Agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. Bu amaçla her bir koloniden elde edilen saflaştırılmış plazmidler için agarozaya yüklenecek reaksiyonlar hazırlanmıştır. Reaksiyon için; 20 µl dH₂O, 3 ul green buffer (10×), 1 µl *Asu*II ve 1 µl *Sal*I eklenip 25 µl’ lik reaksiyonlar hazırlanmıştır. 25 µl lik reaksiyonların tamamı sırayla %1,5’luk agaroz jele yüklendikten sonra 1×TAE tamponu ile 80 V’da 1 saat yürütülmüştür. Plazmid ve TP4 gen parçaları agaroz jelde görüntülenmiştir. Zeosinli LB sıvı besiyerinde geliştirilen pozitif transformantlar %45 gliserol içeren stok kültürlerine alınarak ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.8. Kompetent *P. pastoris* KM71H hücrelerine transformasyon

Lineer hale getirilmiş plazmidlerin *P. pastoris* KM71H hücrelerine transferleri elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kompetent maya hücreleri buz üzerinde çözdürülmüş ve *Sac*I enzimi ile kesilip lineer hale getirilmiş plazmidlerden ~10-15 µl kadar eklenmiştir. Hücreler, buz üzerinde soğutulmuş 2 mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Elektroporasyon cihazında 1980 V gerilim ve 5 ms süre ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. İşlemin ardından, hücreler buz üzerinde bekletilmiş ve üzerine soğutulmuş 1 M sorbitol çözeltisinden 1 ml eklenmiştir. Sorbitol içeren hücreler, 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 30°C’de 1 saat inkübe

edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında, 200 µl hücre karışımı zeosin içeren YPD seçici besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 3 gün boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir.

3.2.1.9. *P. pastoris* KM71H transformantlarının doğrulanması

TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerinin *P. pastoris* KM71H hücrelerinin genomuna entegre olup olmadığının doğrulanması amacıyla ilk olarak transformantlardan DNA'lar izole edilmiştir. Ardından hedef DNA dizilerine spesifik F1 ve R3 primerleri ile amplifiye edilmiştir. DNA izolasyonu ve PZR basamakları aşağıdaki gibidir.

- *P. pastoris* KM71H transformantlarından YPD agarda gelişen koloniler 5 ml'lik YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 250 rpm'de 28 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- YPD sıvı besiyerinde geliştirilen hücreler 2 ml lik tüplere alınmış ve 14.000×g'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant döküldükten sonra tüplere 250 µl Yeast DNA Extraction Buffer eklenip vortekslenmiştir.
- Tüpler -80 °C'de 30 dk bekletilmiş ardından 95 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- Sonra oda ısısında 5-10 dk bekletilmiş ve tüplere 250 µl kloroform eklenerek güçlü bir şekilde vortekslenmiştir.
- 14.000×g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üstteki açık renkli sıvılardan 200 µl 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır.
- Tüplere 500 µl %100 izopropanol eklenmiş ve nazikçe karıştırılmıştır.
- Tüpler 4 °C de 18000×g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant dökülmüştür.
- Tüplere 500 µl %75'lik etanolden eklenmiş ve 18000×g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısmı dökülmüş kalan sıvı kısımla pipetaj yapıp kuruyana kadar bekletilmiştir.
- Son olarak örnek başına 30 µl TE buffer 1 µl Rnase A koy ve 37 °C de 15-18 saat bekletilmiştir.
- Konsantrasyonu belirlenen DNA'lar -20° C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.6’da belirtilen kořullara göre amplifikasyon gerçekleştirildikten sonra amplifikasyon ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütölmüřtür.

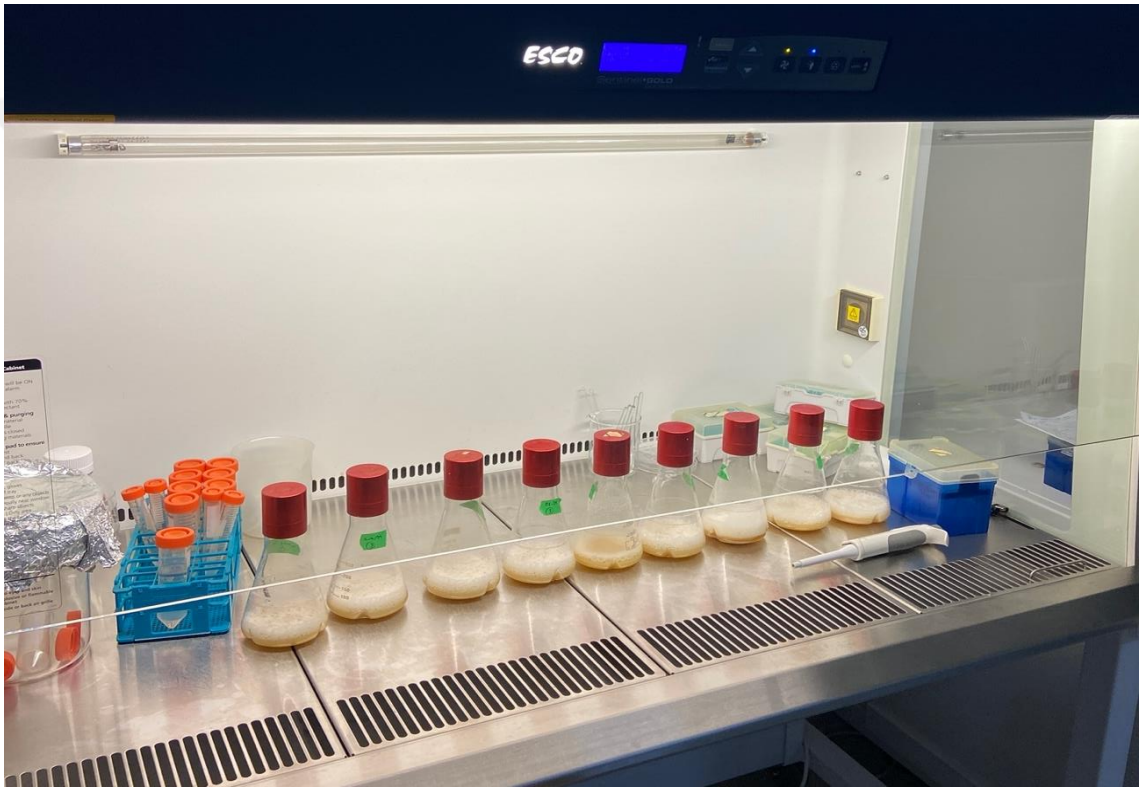
Tablo 3.6. Aktarılan TP4 geninin PZR ile validasyonu

PZR Reaksiyonu			
63 µl ddH ₂ O			
20 µl tampon			
5 µl dNTPs			
1 µl DNA			
5 µl F1			
5 µl R3			
0,5 µl Taq DNA polimeraz			
Aşama	Sıcaklık (°C)	Döngü Sayısı	Süre
İlk Denatürasyon	98	1	30 sn
Denatürasyon	98		10 sn
Bağlanma	53	34	30 sn
Uzama	72		10 sn
Son Uzama	72	1	30 sn

3.2.1.10. Rekombinant TP4’ün ekspresyonu

Pozitif *P. pastoris* transformantları seçildikten sonra rekombinant TP4’ün üretimi için hücreler zeosinli (200 µg/ml) YPD agara çizilerek 30°C’de 48-72 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerden tek bir tane alınarak ön geliştirme için 200 ml BMGY besiyerine (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 gliserol, %1,34 YNB, 100 mM pH 6 fosfat) inoküle edilmiştir. Kültür ortamı çalkalamalı inkübatörde 28 °C’de ve 250 rpm’de OD₆₀₀ değeri

2-6 aralığına gelinceye kadar 18 saat inkübe edilmiştir. İstenilen OD₆₀₀ değerine ulaştıktan sonra hücreler 1200 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan pelet 200 ml BMMY besiyeri (BMGY dan farklı olarak gliserol yerine %1 metanol bulunan besiyeridir) içerisinde çözündürülerek başlangıç OD₆₀₀ değeri 1.0'e eşitlenmiştir. İndüksiyon fazı sırasında hem karbon kaynağı hem de indükleyici olarak görev yapan metanol, 216 saat boyunca %1'lik nihai konsantrasyona kadar her 24 saatte bir besiyerine ilave edilmiştir. İndüksiyon fazının sonunda kültürün hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ölçülmüş ve saflaştırma analizi için süpernatant numunesi toplanmıştır.



Şekil 3.4. *P. pastoris* hücrelerinde ekspresyon çalışmaları

3.2.1.11. Rekombinant TP4'ün saflaştırılması

Bu çalışmada rekombinant TP4, C terminaline bağlanan polihistidin (6×His) etiketi ile sentezlenmiştir. Bir histidin etiketinin, özellikle 6×His etiketinin (0,84 kDa) kullanılması, küçük boyutu, fizyolojik pH'ta proteinin katlanmasına neden olmaması ve proteinin yapısına veya işlevine etki etmemesi nedeniyle avantajlıdır (Carson vd., 2007). Ayrıca histidin etiketli proteinler için kullanılan immobilize metal afinite kromatografisine

(IMAC) saflaştırma yöntemi, proteinlerin yüksek verimle saflaştırmasını sağlar. Bu teknikte ilgili protein, histidin etiketi yoluyla bir reçine matrisi üzerinde immobilize edilen geçiş metali iyonlarına (bu örnekte nikel) seçici olarak bağlanır ve onu süpernatanttaki diğer etiketlenmemiş proteinlerden etkili bir şekilde ayırır. Daha sonra rekombinant protein, bağlanma bölgeleri için histidin etiketi ile rekabet eden imidazol kullanılarak reçineden ayrıştırılır (Spriestersbach vd., 2015)

Üretilen 6×His etiketli TP4 peptiti, Ni-NTA reçinesi kullanılarak saflaştırılmıştır. Reçine 20 mM imidazol içeren 1×PBS pH 7,4 ile 3 kez yıkanmıştır ve reçineye bağlanan TP4 peptiti, farklı konsantrasyonlarda imidazol (50, 100 ve 200 mM) içeren 1×PBS pH 7,4 elüsyon tamponundan 3 kez geçirilmiştir. Saflaştırma işleminin farklı kısımlarındaki protein numuneleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Toplam protein miktarı, Coomassie Bradford Plus Protein Tahlil Kiti kullanılarak kit protokolüne göre belirlenmiştir.

3.2.1.12. Rekombinant TP4'ün SDS-PAGE ile doğrulanması

Saflaştırma adımlarından alınan proteinlerin analizi için Schägger (2006) tarafından yayınlanan trisin SDS-PAGE protokolü optimize edilerek uygulanmıştır (Schägger, 2006). Örnekler 22.5 µl'lik 4×SDS jel yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 70°C'de 10 dk denatüre edilmiştir. Daha sonra peptitler, iki fazdan oluşan SDS-PAGE jelinde elektroforez ile ayrılmıştır. İki fazlı jel %4 poliakrilamid içeren bir yükleme jeli ve %16 poliakrilamid içeren bir ayırma jelinden oluşmaktadır.

Elektroforez, Anot (0,1 M Tris, 0,0225 M HCL pH 8,9) ve Katot (0,1 M Tris, 0,1 M Trisin, %0,1 SDS, pH 8,25) tamponunda 80 V'de 30 dk, 120 V'de ise 100 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Jel, Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanmış ve daha sonra boyayı çıkarmak için renk giderici bir çözelti (%10 asetik asit, %50 metanol ve %40 saf su) ile muamele edilmiş ve elde edilen SDS-PAGE jeli ChemiDoc MP görüntüleme cihazında (Bio-rad) görüntülenmiştir.



Şekil 3.5. SDS-PAGE jel elektroforez düzeneği

3.2.1.13. Rekombinant TP4'ün antimikrobiyal testler ile analizi

Minimum inhibitör konsantrasyon testi (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi (MBK), rekombinant TP4'ün antimikrobiyal aktivite seviyelerini değerlendirmek için kullanılan yöntemlerdir. MİK ve MBK değerleri *Escherichia coli*-ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*-ATCC BAA-1744 (gram negatif) ve *Bacillus subtilis*-ATCC 23857, *Micrococcus luteus*-ATCC 4698 (gram pozitif) bakterileri üzerinde belirlenmiştir.

Bakteriler, 37°C 200 rpm'de steril Tryptic Soy Broth (TSB) içeren Erlenmeyer şişelerinde yoluyla aktive edilmiştir. Daha sonra 100 µl kültür tripton soya agar (TSA) plakalarına yayma ekim yolu ile ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Plakadan tek bir koloni seçilerek steril TSB içeren Erlenmeyer şişelerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 12 saat inkübe edilmiştir.

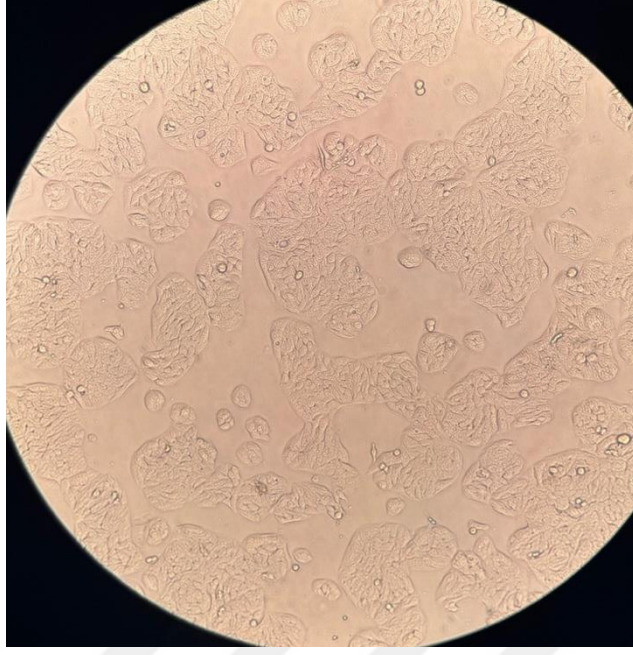
MİK ve MBK'yi belirlemek için Mikrotitre Broth Seyreltme Yöntemi kullanılmıştır. TP4 peptiti 7 farklı konsantrasyonda (50-25-12.5-6.25-3.125-1.56-0.78 µg/ml), dört farklı

bakteri içeren 96 kuyucuklu plakalara 5 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. 37 °C'de farklı sürelerde (6-12-18-24 saat) inkübasyonun ardından bakteri büyümesi, ELISA plate cihazı (Epoch Biotek) ile 600 nm'de absorbans ölçülere değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak TP4 içermeyen bakteri kültürleri kullanılırken, pozitif kontrol olarak 50 µg/ml kanamisin kullanılmıştır. Starter kültürü 5 ml TSB içerisinde hazırlanıp 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır, daha sonra starter kültür 1/100 oranında 100 ml TSB içeren erlene inoküle edilmiş ve 37°C'de çalkalayıcıda 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede 600 nm'deki hücre yoğunluğu 0,5 OD'ye geldiğinde bakterilerden 50 µl'si, aseptik koşullar altında 96 kuyucuklu plakaya 5 tekrarlı olacak şekilde aktarılmıştır. İnkübasyonun ardından canlı hücre sayımları 600 nm'deki absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır.

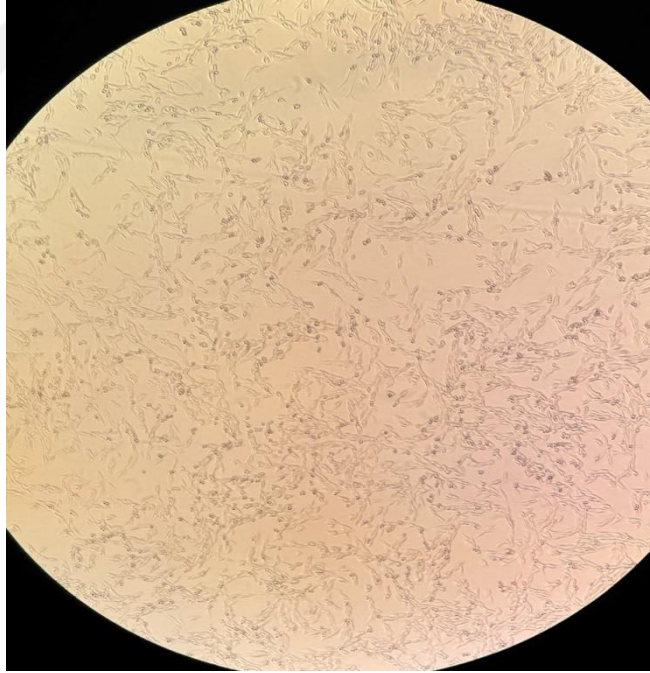
3.2.2. Hücre kültürü deneyleri ve biyokimyasal analizler

3.2.2.1. Hücre kültürü koşulları

HT-29 kolon kanseri hücre hattı; %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren McCoy's 5A besiyerinde kültive edilmiştir. HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücre hattı ise; %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde kültive edilmiştir. İnkübasyon, 37°C ve %5 CO₂ içeren steril hava sağlayan bir inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Karbon dioksit inkübatörünün alt kısmındaki haznede otoklavlanmış saf suya %1 oranında Aquaguard-1 karışımı eklenerek inkübasyon ortamının %95 nem oranında ve steril tutulması sağlanmıştır. Laminar kabin içinde yapılan hücre kültürü çalışmaları, her kullanım öncesi ve sonrasında UV ışınları ile sterilize edilip, %70 etanol ile temizlenerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. HT-29 kolon kanseri hücre hattının mikroskop görüntüsü

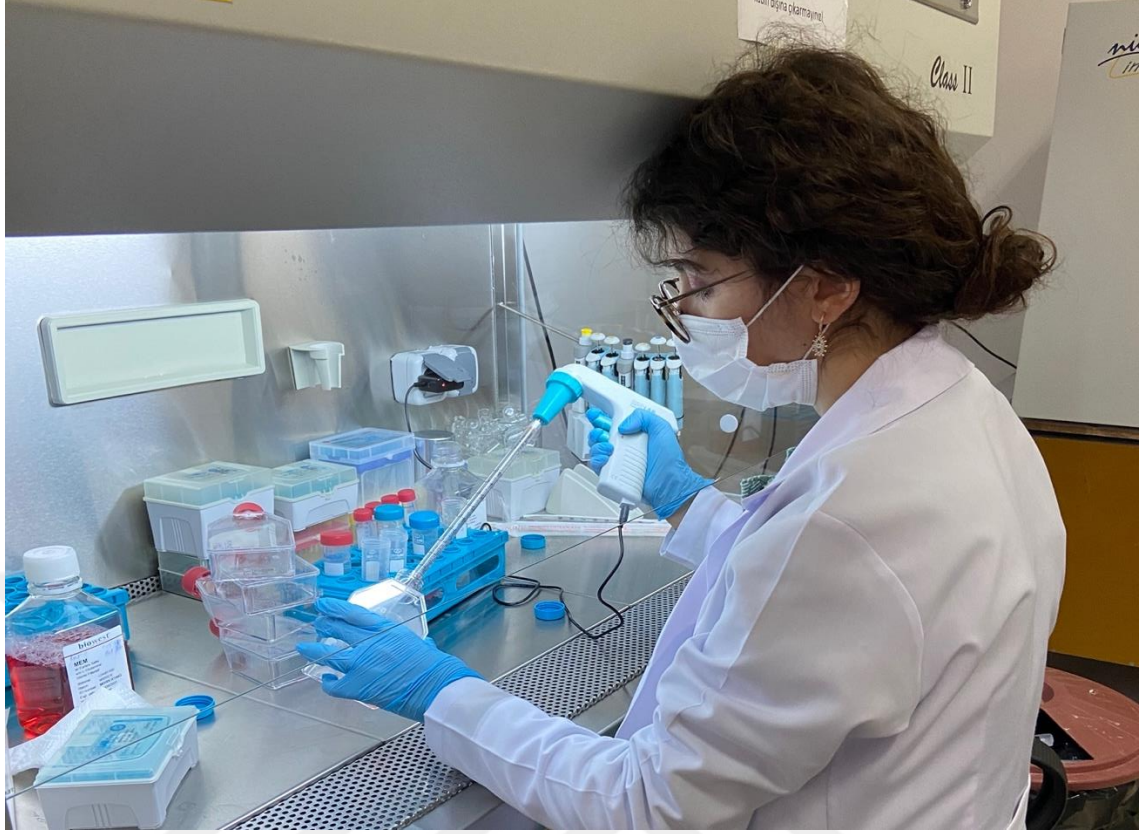


Şekil 3.7. HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücre hattının mikroskop görüntüsü

3.2.2.2. Hücre kültürünün pasajlanması

İnkübasyon süresince kültürdeki hücre gelişimi her gün takip edilmiş ve besiyeri her iki günde bir değiştirilmiştir. Besiyeri değişiminde, 75 cm²'lik T-flasktan besiyeri otomatik pipet ile çekilmiş ve ardından 5 ml DPBS kullanılarak yavaşça yıkanmıştır. DPBS flasktan uzaklaştırıldıktan sonra, 10 ml taze besiyeri eklenerek değişim sağlanmıştır. Hücreler T-flask yüzeyinin yaklaşık %90'ını kaplayana kadar bu yıkama işlemi tekrarlanmıştır. HT-29 hücre hattının 75 cm²'lik T-flaskın yüzeyini doldurması 3-4 gün sürerken, HGF-1 hücresinde bu süre 1-2 gündür.

Hücreler yeterli doluluğa ulaştığında, TC-treated yüzeyden ayırmak için %0,25 Tripsin-%0,02 EDTA solüsyonu (8 ml) eklenmiş ve 8-10 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler tamamen ayrıldıktan sonra, tripsin etkisini nötralize etmek için 25 ml besiyeri eklenmiştir. Kültür, 50 ml'lik steril falkon tüplerine aktarılmış ve 800xg'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Hücre peleti, 12 ml besiyeri ile süspanse edilmiş ve otomatik pipet kullanılarak tamamen homojen hale getirilmiştir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, hücreler 2 veya 3'e bölünerek 75 cm²'lik T-flasklara pasajlanmış ve besiyerleri 10 ml'ye tamamlanmıştır.



Şekil 3.8. Steril kabin içerisinde hücrelerin pasajlanması

3.2.2.3. Hücre kültürünün stoklanması

Pasajlanarak çoğaltılan HT-29 ve HGF-1 hücre hatları devam eden çalışmalarda kullanılmak üzere düzenli olarak dondurularak -80°C 'de stoklanmışlardır. Hücre dondurma işlemi, T-flasklara hücre pasajlama basamaklarına benzer şekilde gerçekleştirilmiş ve hücreler $800 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek süpernetant kısım uzaklaştırılmıştır. Her bir kriyo tüp için aseptik koşullarda $900 \mu\text{l}$ FBS ve $100 \mu\text{l}$ DMSO karışımı hazırlanmıştır. Bu dondurma süspansiyonu aseptik koşullarda hücre peletinin üzerine eklenmiştir. Pipetaj ile homojenize edilen hücreler, 2 ml 'lik kriyo tüplere alikütlendirilmiştir ve hızlı bir şekilde -80°C dolabına yerleştirilmiştir.

3.2.2.4. Dondurulan hücrelerin açılması

Aseptik koşullarda 37°C su banyosunda çözölen dondurulmuş HT-29 ve HGF-1 hücreleri 37°C 'ye ısıtılmış 25 ml besiyeri içeren falkon tüplere ilave edilerek hücreler üzerindeki

DMSO'nun toksik etkisi nötralize edilmiştir. Bu işlemin ardından, hücreler $800 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. HGF-1 hücre peletine DMEM, HT-29 hücre peletine ise 10 ml McCoy's 5A eklenmiş ve pipetaj yapıldıktan sonra 75 cm²'lik T-flasklara aktarılmıştır. Hazırlanan hücre kültürleri tekrar aynı koşullarda karbondioksit inkübatöründe inkübe edilmiştir.

3.2.2.5. Hücre sayımı

Aynı protokol ile büyütülen hücreler ve santrifüj ile toplanmış ve pelet üzerine 5 ml besiyeri eklenerek pipetaj ile homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 10 µl thoma lamına aktarılmış ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı, DMEM hacmi ve thoma lamındaki sıvı hacminin 1 ml'nin dörtte biri olması nedeniyle 10^4 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

3.2.2.6. Sitotoksikite çalışmaları

3.2.2.6.1. Uygulanacak TP4 peptitinin hazırlanması

Üretilip saflaştırılan 14,8 mg TP4 tartılıp steril ependorf tüpe alınmıştır. TP4'ün üzerine 296 µl ultra saf su eklenerek vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandıktan sonra peptitin stok çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Ana stok konsantrasyonu 50 µg/µl'dir. Deney sırasında kullanılmak üzere stoklar -20 °C'de ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.2.2.6.2. Hücre canlılık testi

HT-29 ve HGF-1 hücrelerinin her biri için hücre ekimi 96 kuyucuklu TC-treated platelerin her bir kuyucuğuna besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde inokülasyon yapılarak 24 saat 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için TP4 3, 6, 9 ve 12 saatleri için farklı konsantrasyonlarda (100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,78 µg/ml) 5 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri eklenirken pozitif kontrol olarak 200 µM konsantrasyonda H₂O₂ uygulanmıştır. 3, 6, 9 ve 12 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılığını belirlemek için her kuyucuğa 100 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) reaktifi eklenmiş ve 2,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, hücre canlılığının yüzdesini hesaplamak için 570

nm'de ELISA mikropate okuyucuda kullanılarak absorbanslar ölçülmüştür. AA Bioquest IC50 hesaplama programı (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) kullanılarak HT-29 ve HGF-1 hücreleri için IC50 değerleri hesaplanmıştır.

HT-29 için IC50 değeri 6 saatlik inkübasyon süresi için 15 µg/ml olarak bulunmuş olup sonraki bütün hücre kültürü deneyleri 3.7.'de belirtilen deney setindeki madde ve konsantrasyonlar kullanılarak yapılmıştır.

Tablo.3.7. Deney seti kodları

Kodlar	Uygulanan Madde
Negatif Kontrol	Sadece besiyeri
Pozitif Kontrol	200 µM H ₂ O ₂
1	7.5 µg/ml
2	15 µg/ml
3	30 µg/ml

3.2.2.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

HT-29 ve HGF-1 hücreleri üzerinde TP4 peptidinin kanserli ve sağlıklı hücreler üzerindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu moleküler seviyede değerlendirebilmek için peptit uygulanan hücrelerin RNA'ları saflaştırılarak biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Deney setinde belirtilen 5 farklı grubun (HT-29 için belirlenen IC50 değeri-15 µg/ml, üst-30-µg/ml ve alt-7.5 µg/ml konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol (200 µM H₂O₂)) her biri için dört tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere yaklaşık petri başına 10 ml besiyerinde 1×10^6 hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra petrilere belirlenen konsantrasyonlarda peptit ve pozitif kontrol uygulanmıştır. 6 saatlik peptitle inkübasyonun ardından aseptik koşullarda steril falkon tüplere alınan hücreler 800 ×g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Peletler üzerine RNA kompozisyonunun sabit kalması için RNA koruma solüsyonu ilave edilmiş ve pipetaj yapılarak homojenize edilen hücre süspansiyonları, buz üzerinde 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 800 ×g'de 5 dk

santrifüj edilen hücrelerin süpernatant kısmı atılarak RNeasy Mini Kit (50), Qiagen protokolü uygulanmıştır. Hücrelerin parçalaması ve total RNA'ların saflaştırılma basamakları aşağıda verilen basamaklar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- Hücreler 2 ml'lik steril ependorflara aktarılmış ve 800 ×g de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atıldıktan sonra pelet 1.5 ml PBS ile yıkanarak santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür.
- Peletin üzerine 350 µl buffer RLT karışımından (3000 mikrolitre RLT + 30 µl Betamerkaptoetanol) eklenmiş 2 kez 1 dk vortekslenmiştir.
- %70'lik etanolden 350 mikrolitre eklenip pipetaj yapılmıştır.
- Total miktar RNeasy kolona aktarılmış ve 15 sn 8000 ×g de santrifüj edilmiştir. Altta kalan süpernatant kısım dökülmüştür.
- Kolona 700 µl W1 buffer eklenmiş ve 15 sn 8000 ×g de santrifüj edilmiştir, Altta kalan süpernatant kısım dökülmüştür.
- Kolona 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 15 sn 8000 ×g de santrifüj edilmiştir, Altta kalan süpernatant kısım dökülmüştür.
- Kolona 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 2 dk 8000 ×g de santrifüj edilmiştir, Altta kalan süpernatant kısım dökülmüştür.
- Boş halde maksimum hızda 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon 1,5 ml'lik nükleazlardan uzaklaştırılmış steril toplama tüpüne aktarılmıştır.
- Kolona 50 µl RNeaz dan uzaklaştırılmış su eklenmiş ve 1 dk. 24 °C'de inkübe edilmiştir.
- 8000 ×g'de 1 dk santrifüj edilerek alt kısımda toplanan saflaştırılmış RNA saflık konsantrasyon tayini yapılmasının ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RNA saflaştırma işleminden sonra, iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, ABD) protokolü kullanılarak cDNA sentezi yapılmış ve elde edilen cDNA'lar RT-qPZR çalışmaları için -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2.7. RNA ve cDNA'nın konsantrasyon ve saflık değerlendirmesi

RNA ve DNA'nın saflık ve konsantrasyonları ELISA mikropate okuma cihazı ile ölçülmüştür. 260 nm, 280 nm ve 320 nm dalga boylarında numunelerin absorbans

değerleri belirlenmiştir. RNA miktarı (ng/μl), (OD₂₆₀) seyreltme faktörü ve 40 katsayısı ile çarpılarak elde edilmiştir. DNA miktarı (ng/μl), (OD₂₆₀) seyreltme faktörü ve 50 katsayısı ile çarpılarak elde edilmiştir. 260 nm'deki absorbans RNA moleküllerine, 280 nm'deki absorbans proteinlere ve 320 nm'deki absorbans ise partiküllere bağlı olarak değerlendirilmiştir. RNA ve DNA'nın saflıkları, aşağıdaki kriterlere göre belirlenmiştir:

RNA; $OD_{260}/OD_{280} \geq 2.0$

DNA; $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$

3.2.2.8. RT-qPZR deneyi

Tez çalışmasında HT-29 için belirlenen IC₅₀ değeri referans alınarak, deney setinde belirlenen 5 farklı grubun HT-29 ve HGF-1 hücre hatlarının *BAX*, *BCL-2* ve *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada *ACTB* (beta-aktin) geni referans gen olarak kullanılmıştır.

HT-29 ve HGF-1 hücre hatlarından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra Tablo 3.8.'deki protokole göre Qiagen SYBR Green Master Mix kiti kullanılarak RT-qPZR analizi yapılmıştır.

Tablo 3.8. RT-qPZR protokolü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyonu	95 °C	20 sn	1
Bağlanma	54 °C	20 sn	45
Uzama (Floresans tayin)	60 °C	30 sn	
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.2.9. Protein ifade düzeyinin belirlenmesi

HT-29 ve HGF-1 hücreleri üzerinde TP4 peptitinin kanserli ve sağlıklı hücrelerde apoptotik genlerdeki etkisini protein ifade düzeyinde belirleyebilmek için peptit uygulanan hücrelerden proteinler saflaştırılarak biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Deney setinde 5 farklı grubun (HT-29 için belirlenen IC₅₀ değeri, üst ve alt

konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol (200 μ M H₂O₂)) her biri için dört tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere yaklaşık petri başına 10 ml besiyerinde 1×10^6 hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 1×10^6 hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra petrilere belirlenen konsantrasyonlarda peptit ve pozitif kontrol uygulanmıştır. 6 saatlik inkübasyon süresinin ardından, aseptik koşullarda petrilere üzerine 1 ml T-PER tamponu eklenip 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra kazıyıcı kullanılarak hücreler yüzeyden kazınıp aseptik koşullarda falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpündeki hücreler, buz üzerinde 21 Gauge'luk steril şırınga ile 7 kez çekilip püskürtülerek lizis işlemi tamamlanmıştır. Örnekler +4°C'de 2000 $\times$ g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant kısmı ayrı steril ependorf tüplerine alınarak -80°C'de saklanmıştır. TP4 uygulanan HT-29 ve HGF-1 hücrelerinde BAX, BCL-2 ve CASP3 protein ekspresyon seviyeleri ticari sandviç ELISA kitleri kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2.10. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) testleri bir biyolojik örnekte bulunan tüm antioksidanların ve oksidanların toplam kapasitesini ölçer. Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olan bileşiklerken oksidanlar hücresel yapıları hasara uğratabilen ve hastalıklara yol açabilen reaktif moleküllerdir. TAS ve TOS aktivitelerini belirlemek için ticari olarak satın alınan Rel Assay Diagnostik TAS-TOS Assay Kitleri kullanılmıştır. Numune olarak deney setinde belirtilen konsantrasyonlarda TP4 uygulanmış hücrelerden saflaştırılan ve kullanılmak üzere -80 °C ye kaldırılan proteinler kullanılmıştır. TAS için deney aşağıda belirtilen kit protokolüne göre 4 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 96 kuyucuklu plate kuyucuklara numuneler, standart, ultra saf su, L1 ve L2 dört tekrarlı olacak şekilde 18 μ l eklenmiştir.
- Üzerlerine 300 μ l R1 eklenip pipetaj yapılmıştır.
- 30 sn oda ısında bekleyip ELISA Reader'da 660 nm'de okuma yapılmıştır.
- Üzerlerine 45 μ l R2 eklenip pipetaj yapılmıştır.
- 5 dk 37 °C' de inkübe edilip ELISA Reader'da 660 nm'de okuma yapılmıştır.

TAS testinin okuma prensibi, bir numunedeki antioksidan moleküllerin koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) çözeltilisini renksiz ABTS formuna dönüştürmesine dayanır. Bu dönüşüm, spektrofotometrik olarak 660 nm dalga boyunda ölçülür. Değişen renk yoğunluğu, numunedeki toplam antioksidan miktarıyla ilişkilidir. TAS ölçümleri, E vitamini analogu olan Trolox kullanılarak kalibre edilir ve sonuçlar mmol Trolox Equivalent/Litre cinsinden ifade edilir.

TOS için deney aşağıda belirtilen kit protokolüne göre 4 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 96 kuyucuklu plate numuneler, standart, ultra saf su, L1 ve L2 dört tekrarlı olacak şekilde 45 µl eklenmiştir.
- Üzerlerine 150 µl R1 eklenip pipetaj yapılmıştır.
- 30 sn oda ısında bekleyip ELISA Reader'da 530 nm'de okuma yapılmıştır.
- Üzerlerine 15 µl R2 eklenip pipetaj yapılmıştır.
- 5 dk 37 °C' de inkübe edilip ELISA Reader'da 530 nm'de okuma yapılmıştır.

TOS numunedeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi prensibine dayanır. Ferrik iyonlar, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Bu renkli kompleksin yoğunluğu, spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda ölçülür ve numunedeki toplam oksidan miktarıyla ilişkilidir. TOS ölçümü, hidrojen peroksit kullanılarak kalibre edilir ve sonuçlar mikromolar hidrojen peroksit equivalent/Litre olarak ifade edilir.

3.2.2.11. Malondialdehid (MDA) tayini

Malondialdehid (MDA), lipidlerin peroksidasyon ürünüdür ve oksidatif stresin artışıyla birlikte MDA düzeyi yükselir. Bu nedenle, MDA miktarı oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Malondialdehid miktarı, Hammode ve arkadaşlarının yöntemine göre spektrofotometrik analiz ile belirlenmiştir. Bu yöntemde, MDA sıcak ve asidik ortamda tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer MDA ve renkli bir kompleks oluşturur. TBA-MDA'nın meydana getirdiği renkli kompleksin 532 nm'de verdiği absorbansla MDA'nın konsantrasyonu belirlenmiş olur (Hammode vd., 1995). Deney basamakları aşağıdaki gibidir.

- İlk olarak %10'luk TCA (trikloroasetik asit) ve %0,675'lik TBA hazırlanmıştır.
- Numuneler 5 kat seyreltilmiştir ve 300 µl numune ile çalışılmıştır.
- Kör için 300 µl dH₂O kullanılmıştır.
- Kör ve numuneler tüplere alınmış üzerlerine 1500 µl %10'luk TCA eklenip vortekslenmiştir.
- 90 °C'de 15 dk benmaride inkübe edilmiştir. Ardından buzlu suda bir süre soğutulmuştur.
- 3000 rpm'de 10 dk +4'te santrifüjlenmiştir.
- Süpernatantlardan 300 µl örnek farklı tüplere alınmıştır.
- Üzerine 600 µl TBA eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 90 °C'de 15 dk benmaride inkübe edilmiştir (pembe renk alır).
- Buzlu suda bir süre soğutulmuştur.
- 532 nm'de absorbansı ölçülmüştür.

3.2.2.12. İstatistiksel hesaplamalar

Gen ifade düzeylerini karşılaştırmak için Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen 2- $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, hedef genin ifade düzeyini referans (housekeeping) genle normalize ederek, iki farklı örnek arasındaki relatif gen ekspresyonunu belirler (Livak ve Schmittgen, 2001). Tez çalışmasında ikincil normalizasyon, ACTB genini referans olarak kullanarak *BAX*, *BCL2* ve *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir.

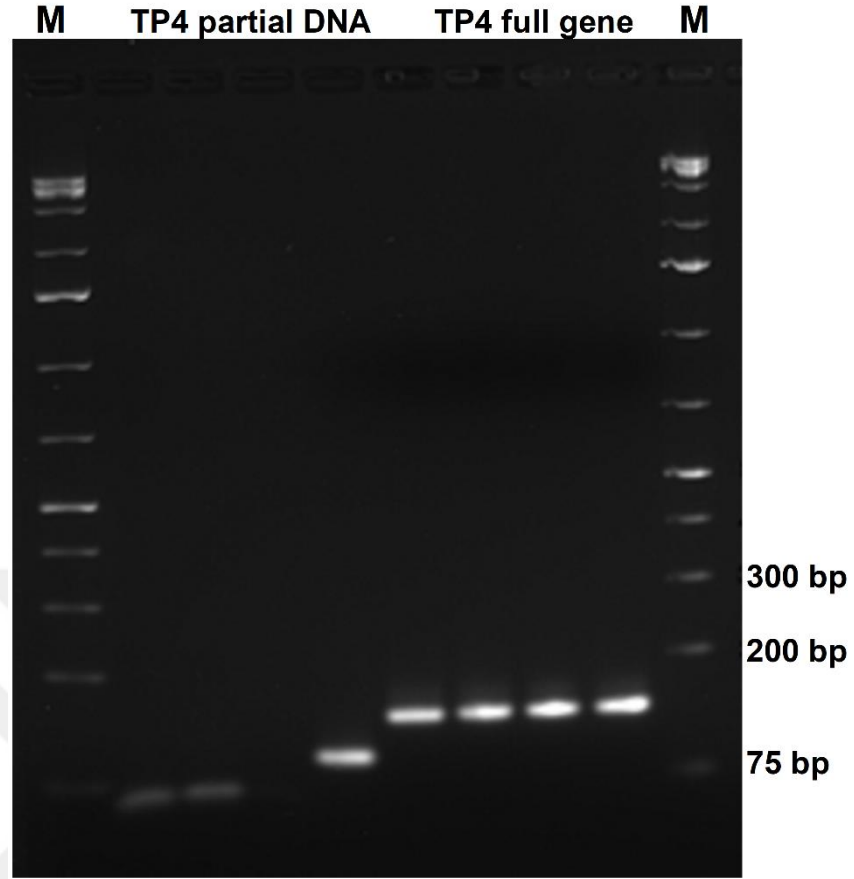
Bu tezin istatistiksel analizleri SPSS 22.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama ve standart sapma değerlerinin hesaplanmasında tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. Ölçümler arasında anlamlı farklılık olup olmadığının belirlenmesinde One-Way ANOVA testi kullanılmıştır. Sonuçların anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmasında, Nile Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) kaynaklı Tilapia Piscidin 4 (TP4) peptidi, *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine klonlanıp *P. pastoris* KM71H konak hücrelerinde eksprese edilmiştir. *P. pastoris* KM71H'de ifade edilen rekombinant TP4 peptidinin bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. TP4'ün HT-29 kolorektal kanser hücrelerine ve HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki etkileri incelerken aynı parametreler ve deneyler HGF-1 hücrelerine de uygulanarak etkileri kıyaslanmıştır. Bulgular aşağıda verilmiş olup TP4'ün hem antimikrobiyal hem de antikanser potansiyeli olduğunu göstermektedir.

4.1. TP4 Peptidini Kodlayan DNA Dizisinin Eldesi

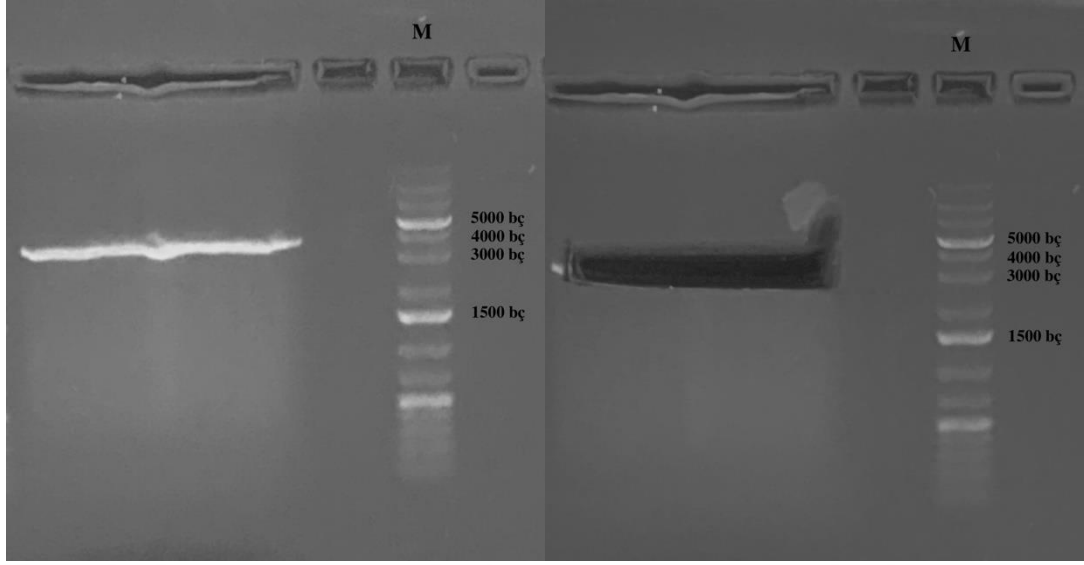
Sentetik olarak temin edilen ve birbirinin kısmen tamamlayıcısı olan primerler kullanılarak overlap PZR yöntemi ile *TP4* genini içeren 141 bç'lik DNA dizisi elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Agaroz jel görüntüsünde *TP4* genini içeren DNA dizisinin beklendiği gibi 141 bç uzunluğunda PZR ürünleri ürettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.1. TP4 geninin overlap PZR ile elde edilmesi (M: 1kb DNA ladder, Fermentas; 1-4: Kısmi TP4 DNA fragmanları; 5-8: TP4 geninin tam yapısı)

4.2. Rekombinant Ekspresyon Plazmidinin Elde Edilmesi

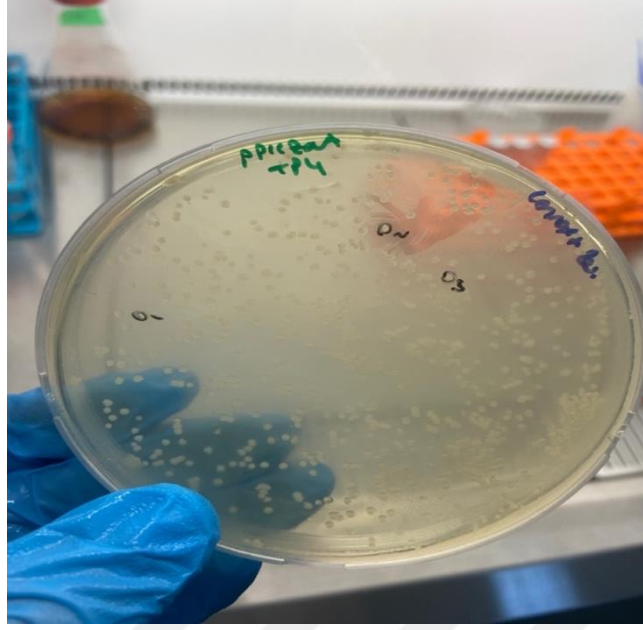
TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerine ait saflaştırılmış PZR ürünleri (141 bç) ve pPICZαA vektörü (3593 bç), *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Kesilen DNA dizileri saflaştırma kiti ile pPICZαA vektörü ise agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra iki enzim arasındaki 87 bç'lik kısım düşürülmüştür ve vektör kesilerek saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır (Şekil 4.2). Böylece hedef DNA dizileri ve pPICZαA vektörü ligasyona hazır hale getirilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesim yapıldıktan sonra TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerinin pPICZαA vektör DNA'sına bağlanması için ligasyon reaksiyonu karışımı hazırlanmıştır. Ligasyon sonucunda hedef DNA dizisini içeren rekombinant plazmid elde edilmiştir.



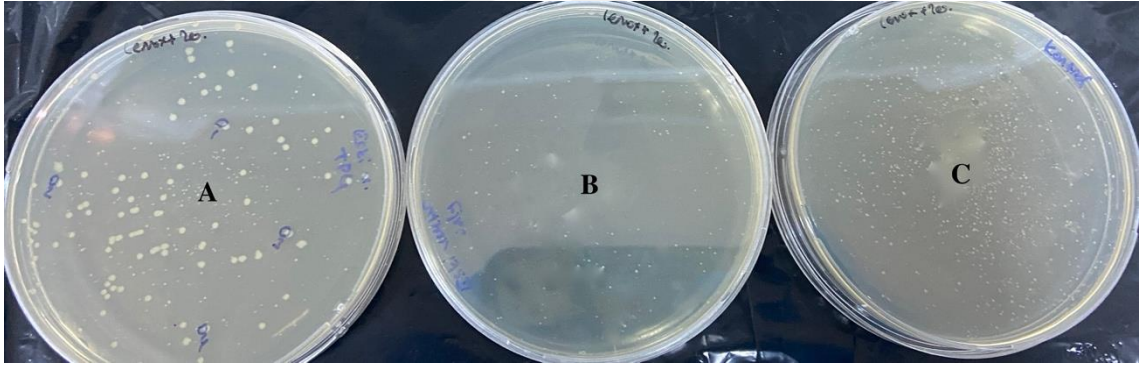
Şekil 4.2. *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile 87 bç'lık kısım düşürülmüş pPICZαA plazmidinin jelden kesilmesi

4.3. Rekombinant Plazmidin Kompetent *E. coli* XL-1 Blue Hücrelerinde Klonlanması

Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant plazmidler kompetent *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine ısıl şok ile transforme edilmiştir. *E. coli* XL-1 Blue hücreleri içerisine pPICZαA vektörünün dahil olması ile zeosine direnç kazanan transformantların zeosinli LB agar besiyerinde gelişmesi mümkün olmuştur (Şekil 4.3). Zeosinli LB agar besiyerinde gelişen koloniler, pPICZαA-TP4 rekombinant plazmidini içeren pozitif *E. coli* XL-1 Blue transformantları olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Zeosin içeren LB agar besiyerinde gelişmesi pozitif *E. coli* XL-1 Blue transformantları



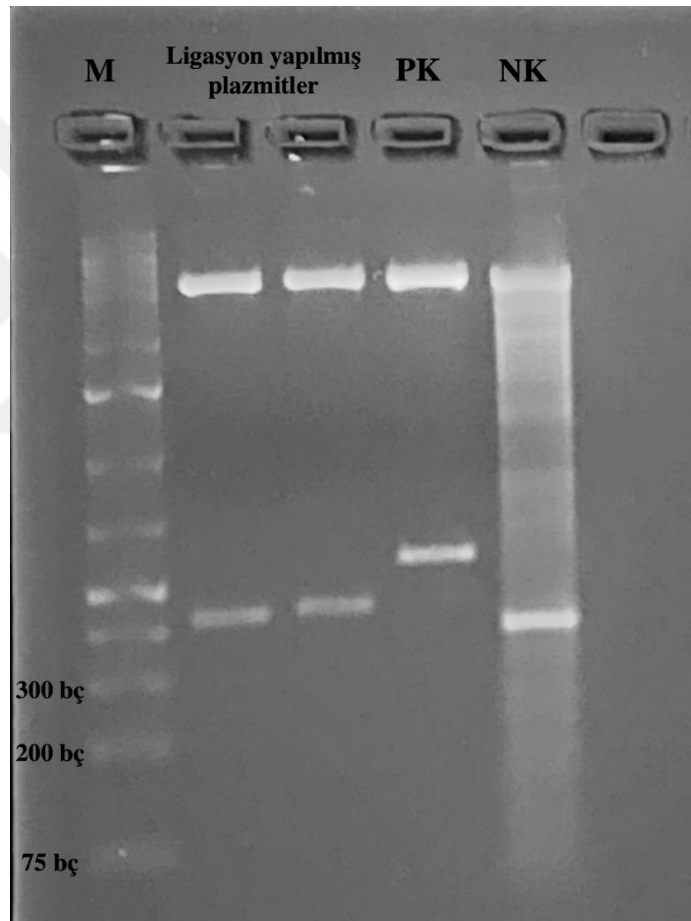
Şekil 4.4. Zeosin içeren LB agar besiyerinde *E. coli* XL-1 Blue hücrelerinin gelişimi A) gelişen pozitif *E. coli* transformantları B) gen bölgesini içermeyen sadece lineer vektörleri içeren gelişmemiş hücreler C) negatif kontrol: sadece *E. coli* hücreleri gelişme göstermemiştir

4.4. Pozitif *E. coli* XL-1 Blue Transformantlarının Doğrulanması

Zeosinli LB agar besiyerinde gelişen kolonilerin hedef DNA dizilerini içerip içermediklerinden emin olmak için kolonilerden rastgele seçim yapılarak pPICZaA-TP4 (3635 bp) plazmidini içeren *E. coli* XL-1 Blue transformantlarından plazmid DNA

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından ekspresyon vektörünün ve klonlanan genin doğruluğu *AsuII* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile doğrulanmıştır. Enzimler vektörü iki noktadan kesecek şekilde seçilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece 3593 bç'lik pPICZαA vektörü kullanılmıştır.

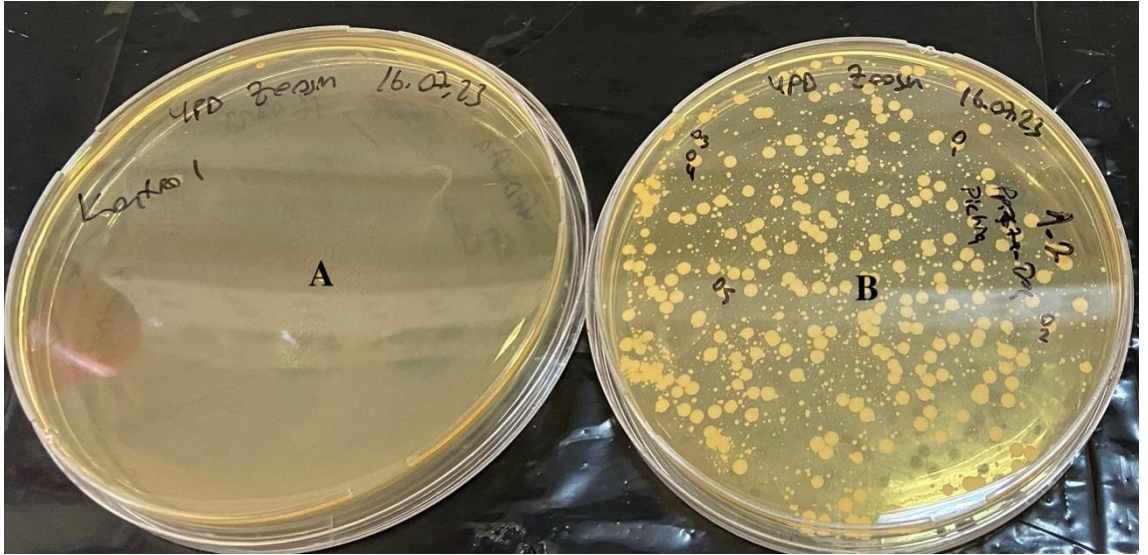
Negatif kontrolde TP4 geni içermediğinden 381 bç'lik kısım düşmüştür. TP4 içeren plazmidde ise 423 bç'lik kısım düşmüştür. DNA fragmanları agaroz jel üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.5). Sonuç olarak 1 ve 2. kolonide ligasyonun başarılı bir şekilde yapıldığı tespit edilip bu kolonilerle çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.5. Ligasyon yapılmış plazmidlerin *AsuII* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrolü (M: 1kb DNA ladder, Fermentas; 1-2: Ligasyon yapılmış plazmidler; 3: Pozitif kontrol, 4: Negatif kontrol)

4.5. Rekombinant Plazmidin *P. pastoris* KM71H Hücrelerine Transformasyonu

Hedef DNA dizilerini taşıyan *E. coli* XL-1 Blue transformantlarından izole edilen pPICZαA-TP4 plazmidi kompetent *P. pastoris* KM71H hücrelerine transforme edilmeden önce *SacI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile lineer hale getirilmiş ve elde edilen ürünler saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Lineerize edilen rekombinant plazmidler elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* KM71H hücrelerine transforme edilmiştir. Transforme edilen *P. pastoris* KM71H hücreleri zeosin direnç geni içeren ekspresyon vektörünün genomuna dahil olmasıyla birlikte zeosin içeren kültür ortamında gelişebilme özelliği kazanmıştır. Bu nedenle YPD plakalarında gelişen koloniler pozitif, yani hedef DNA dizisini içeren *P. pastoris* KM71H transformantları olarak kabul edilmiştir.



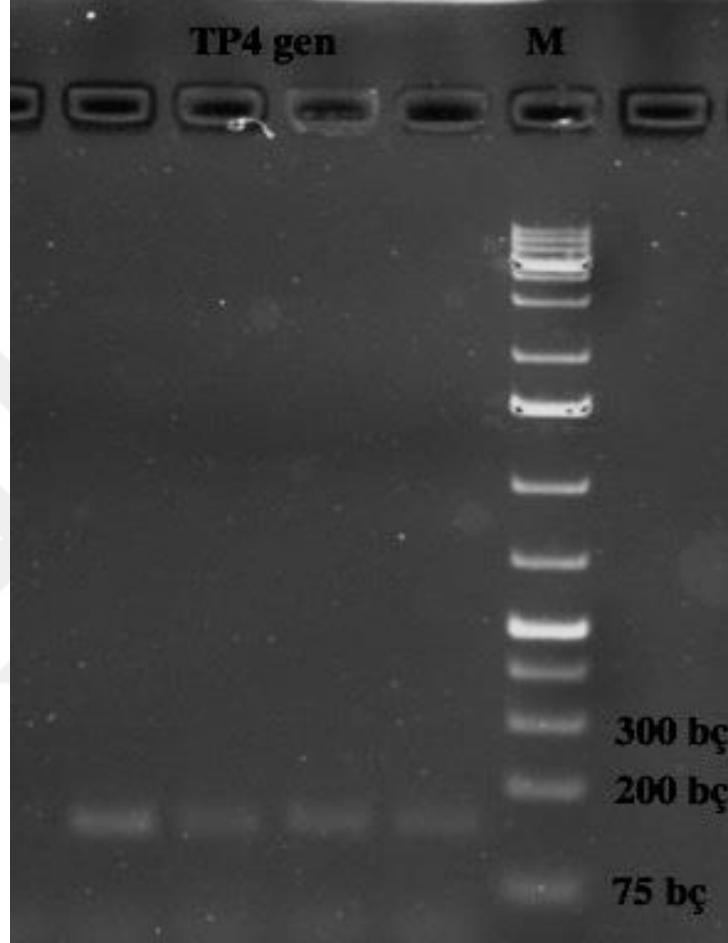
Şekil 4.6. Zeosin içeren YPD agar besiyerinde *P. pastoris* KM71H hücrelerin gelişimi

A) negatif kontrol: rekombinant plazmid aktarılmamış gelişme göstermemiştir. B) pozitif *P. pastoris* KM71H transformantları

4.6. Pozitif *P. pastoris* KM71H Transformantlarının Doğrulanması

Pozitif *P. pastoris* KM71H transformantlarının doğrulanması için zeosin içeren YPD agar plakada gelişen koloniler sıvı besiyerinde overnight geliştirilmiş ve DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar öncelikle TP4 peptidini kodlayan DNA dizilerine spesifik primerler ile amplifiye edilmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önceden

overlap PZR ile belirlenen hedef DNA dizisi, negatif kontrol olarak ise transformasyon yapılmamış *P. pastoris* KM71H suşunun saflaştırılan DNA'sı kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve oluşan bantlar marker ile kıyaslanarak pozitif *P. pastoris* KM71H transformantları tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



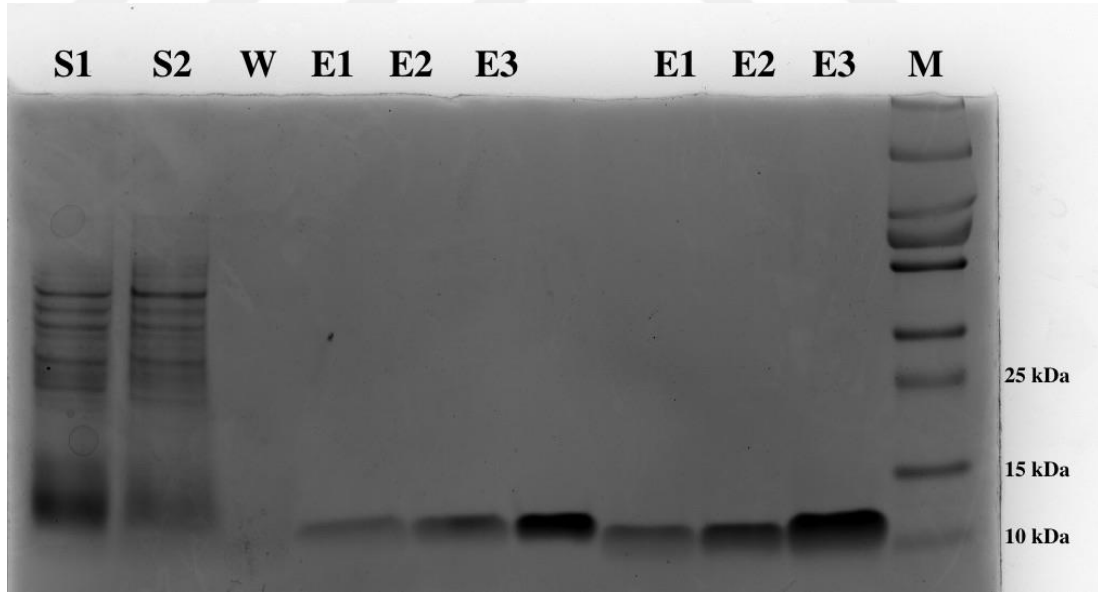
Şekil 4.7. *P. pastoris* KM71H'ye aktarılan TP4 geninin PZR ile doğrulanması. (M: 1kb DNA ladder, Fermentas; 1-4: Kısmi TP4 geninin tam yapısı)

4.7. TP4'ün Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Elektroföresi ile Doğrulanması

Ekspresyon vektörünün, lityum-asetat yöntemiyle kompetent hale getirilen *P. pastoris* KM71H suşuna transformasyonunun ardından, seçilen klon YPD besiyerinde 28°C'de gece boyunca geliştirilmiştir. Hücreler, 200 ml BMGY besiyeri içeren shake-flaska aktarılmış ve 28°C'de 250 rpm hızında 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj edilerek pelet haline getirilmiş ve elde edilen pelet, 200 ml BMMY

ortamında yeniden süspanse edilmiştir. İndüksiyon fazında, metanol hem karbon kaynağı hem de indükleyici olarak kullanılmış ve 216 saat boyunca, her 24 saatte bir ortamda %1'lik nihai konsantrasyona ulaşacak şekilde eklenmiştir. İndüksiyon fazının sonunda kültürün hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ölçülmüş ve saflaştırma analizi için süpernatant numunesi toplanmıştır.

Ekstraselüler TP4 peptidinin saflaştırılması için toplanan süpernatant numuneleri kullanılmıştır. Numune konsantre edilmiş ve 10 mM imidazol içeren 1×PBS pH 7,4 ile nötralize edilmiş ve Ni-NTA reçinesi içeren kolona yüklenmiştir. Spesifik olmayan bağlanmanın ortadan kaldırılması için kolon, 20 mM imidazol içeren 1×PBS tamponu kullanılarak yıkanmıştır. Daha sonra kolon, his etiketli TP4 proteininin elüsyonu için farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 200 mM) imidazol içeren 1×PBS tamponu ile muamele edilmiştir. Saflaştırılmış ekstraselüler TP4'ün varlığı, trisin SDS-PAGE jel analiziyle belirlenmiştir (Şekil 4.8). Rekombinant TP4 proteini içeren elüsyonlar toplanmış ve 1×PBS tamponuna karşı diyaliz edilmiştir ve elde edilen saflaştırılmış 14,8 mg TP4 tartılıp steril ependorf tüpe alınmıştır.



Şekil 4.8. TP4 proteininin saflaştırma adımlarının SDS-PAGE analizi (M: Protein ladder; S1-2: Süpernatant; W: Yıkama (20 mM imidazol içeren 1 x PBS), 2 tekrarlı E1-3: Elüsyon (sırasıyla 50, 100, 200 mM imidazol içeren 1 x PBS)

4.8. Rekombinant TP4'ün Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

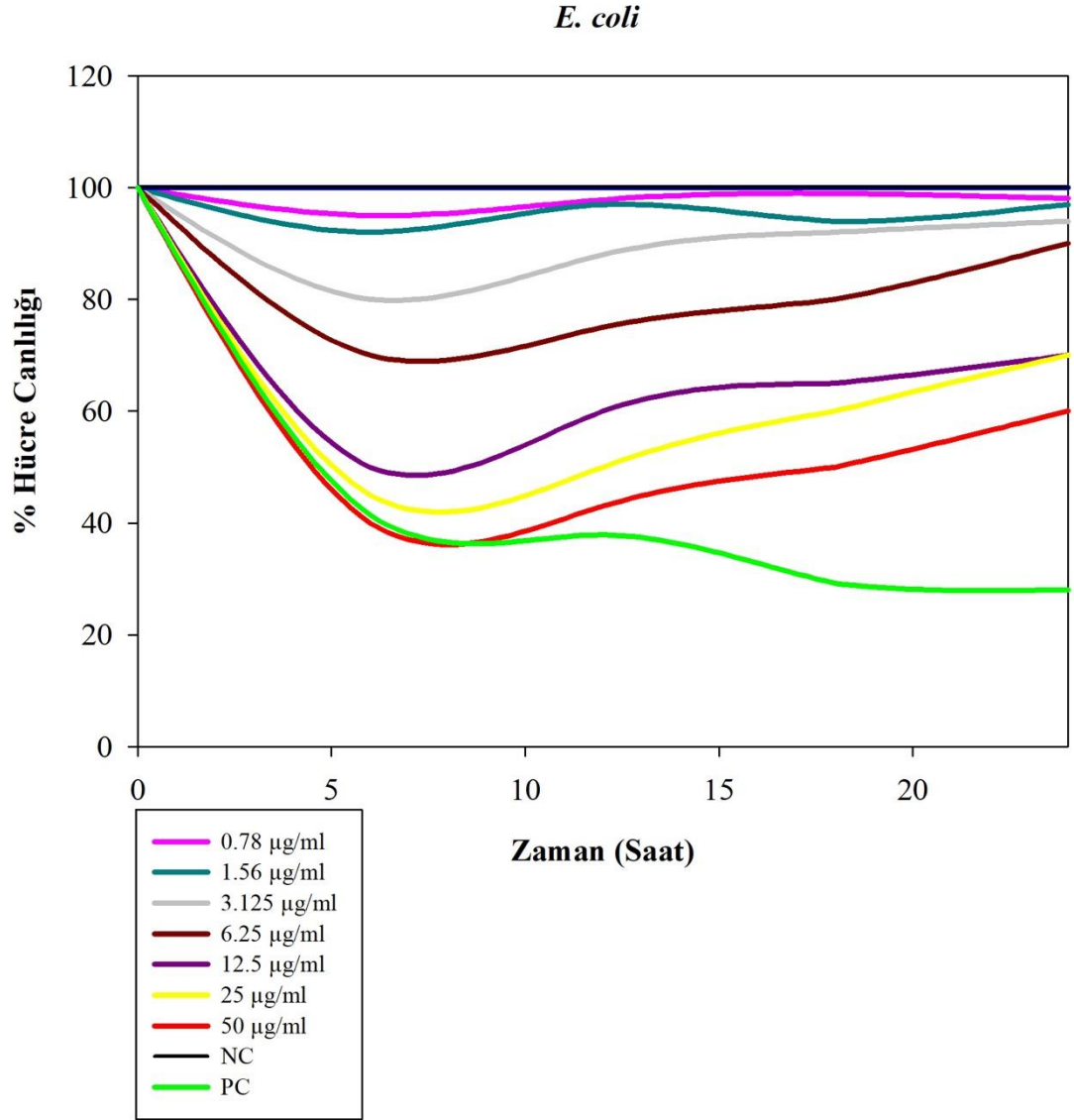
Rekombinant TP4'ün antibakteriyel etkisi MİK ve MBK değerleri değerlendirilerek belirlenmiştir. MİK ve MBK'yi belirlemek için Mikrotitre Broth Seyreltme Yöntemi kullanılmıştır. TP4 peptiti 7 konsantrasyonda (50-25-12.5-6.25-3.125-1.56-0.78 µg/ml) 5 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak 200 µM H₂O₂, negatif kontrol olarak yalnızca besiyeri uygulanmıştır. Tablo 4.1 ve 4.2.'de verilen sonuçlarda görüldüğü gibi TP4 peptidinin *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa* ve *B.subtilis* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

Tablo 4.1. MİK (µg/ml) değerleri

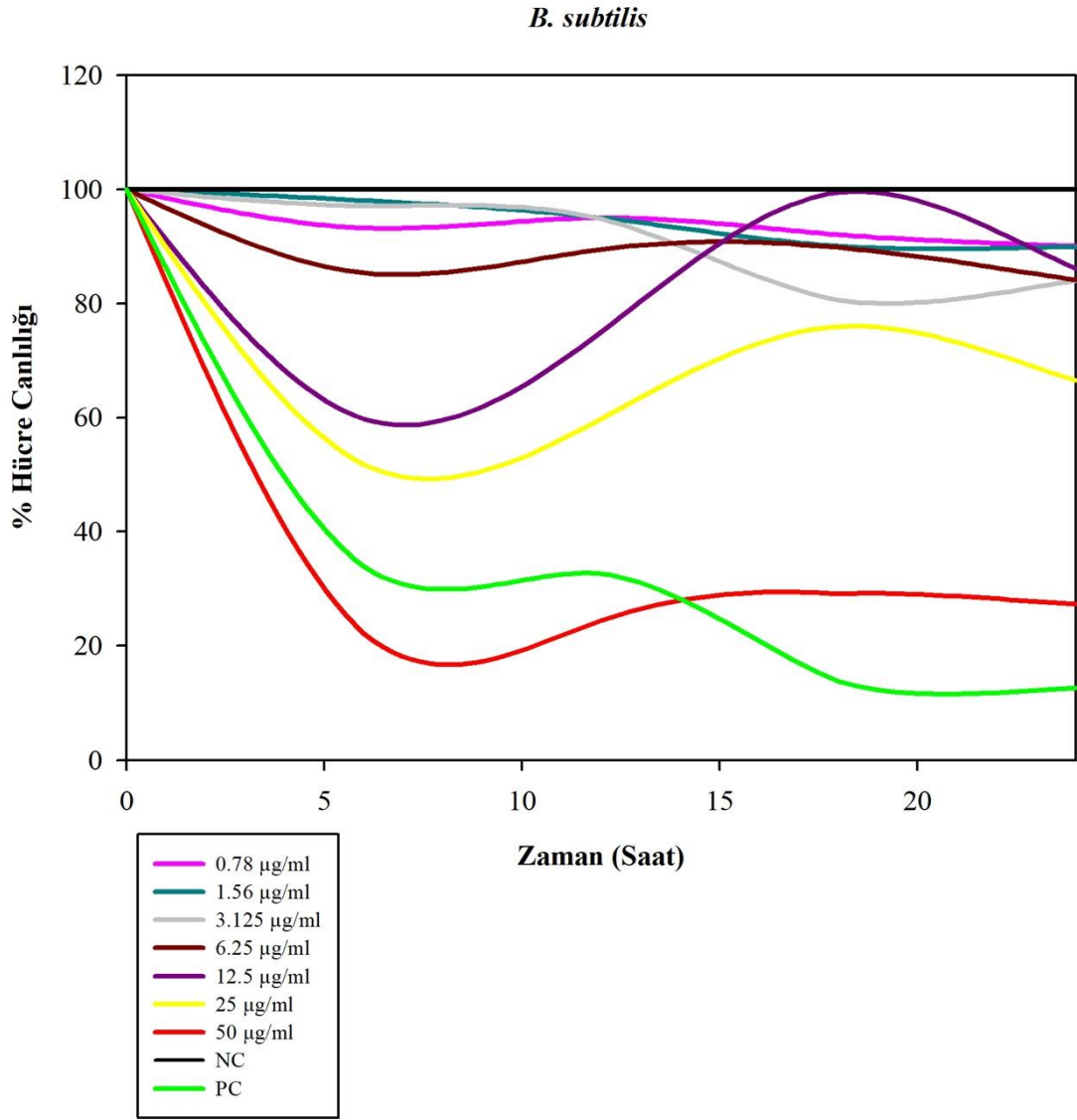
Saat	<i>Escherichia coli</i> MİK (µg/ml)	<i>Bacillus subtilis</i> MİK (µg/ml)	<i>Micrococcus luteus</i> MİK (µg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MİK (µg/ml)
6	3.125	6.25	0.78	0.78
12	3.125	3.125	6.25	1.56
18	6.25	1.56	6.25	1.56
24	6.25	1.56	6.25	1.56

Tablo 4.2. MBK (µg/ml) değerleri

Saat	<i>Escherichia coli</i> MBK (µg/ml)	<i>Bacillus subtilis</i> MBK (µg/ml)	<i>Micrococcus luteus</i> MBK (µg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MBK (µg/ml)
6	12.5	12.5	6.25	12.5
12	12.5	12.5	12.5	25
18	25	25	25	50
24	50	25	50	50

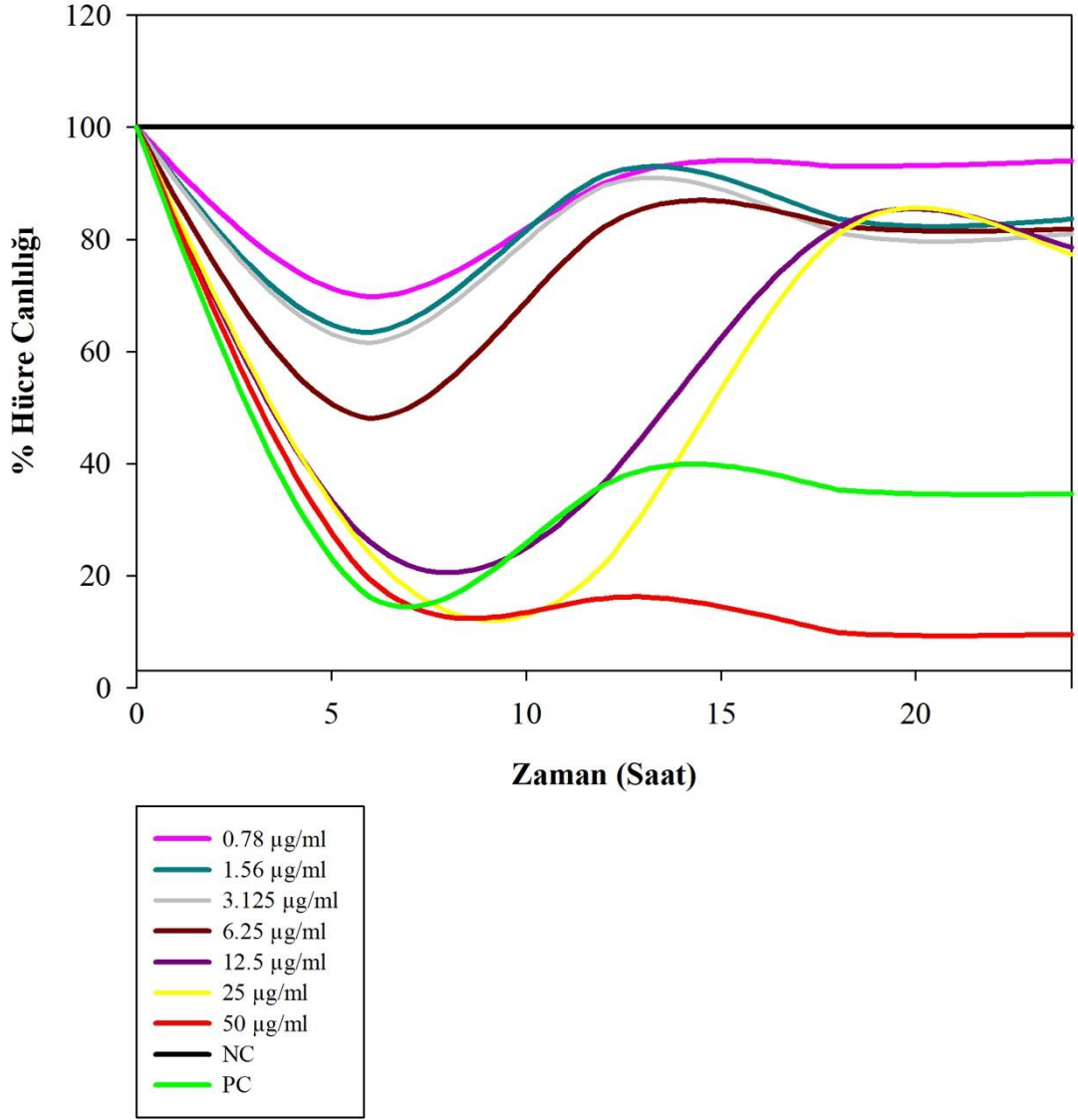


Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün *E. coli* hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi

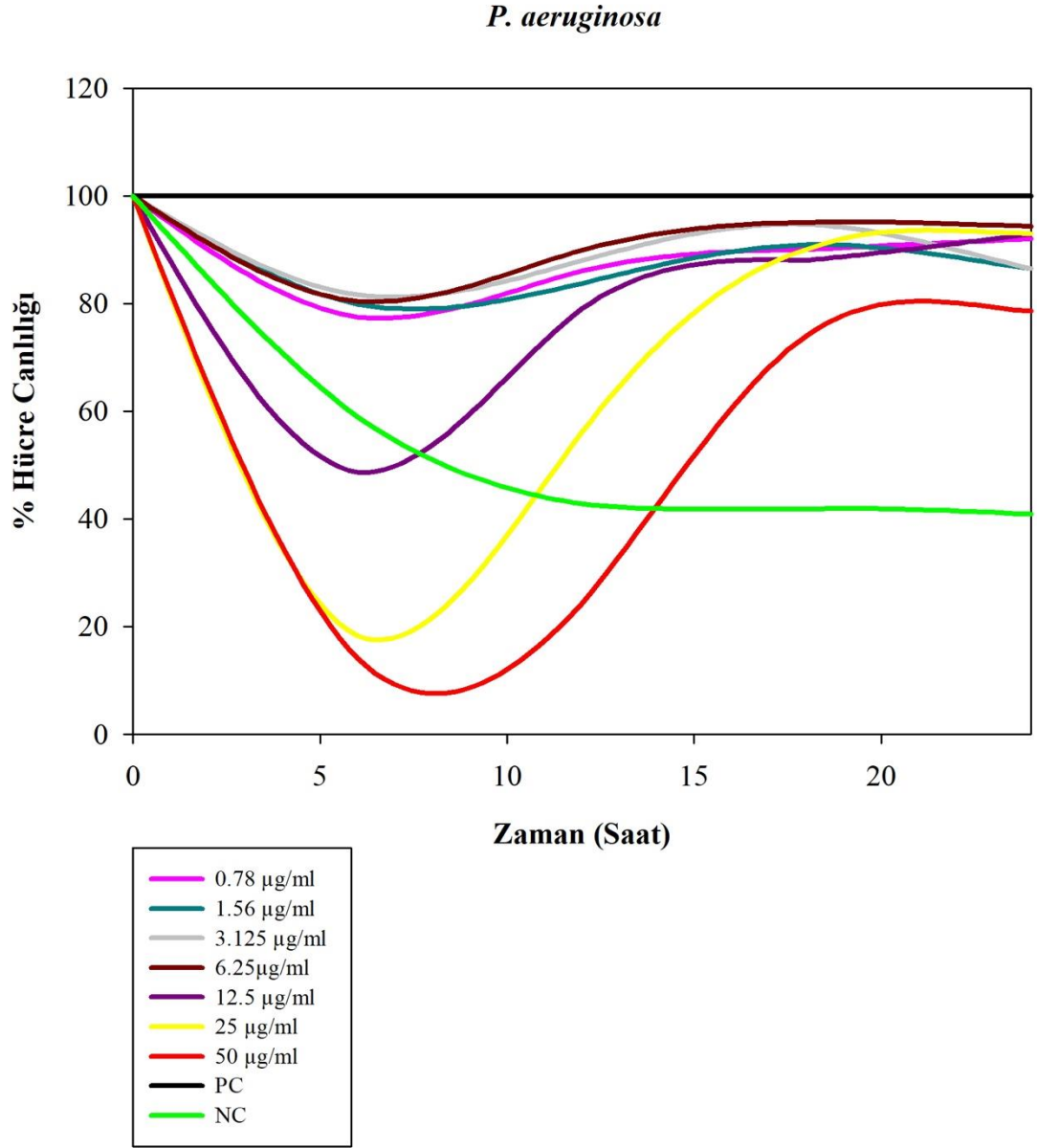


Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün *B. subtilis* hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi

M. Luteus



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün *M. luteus* hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi

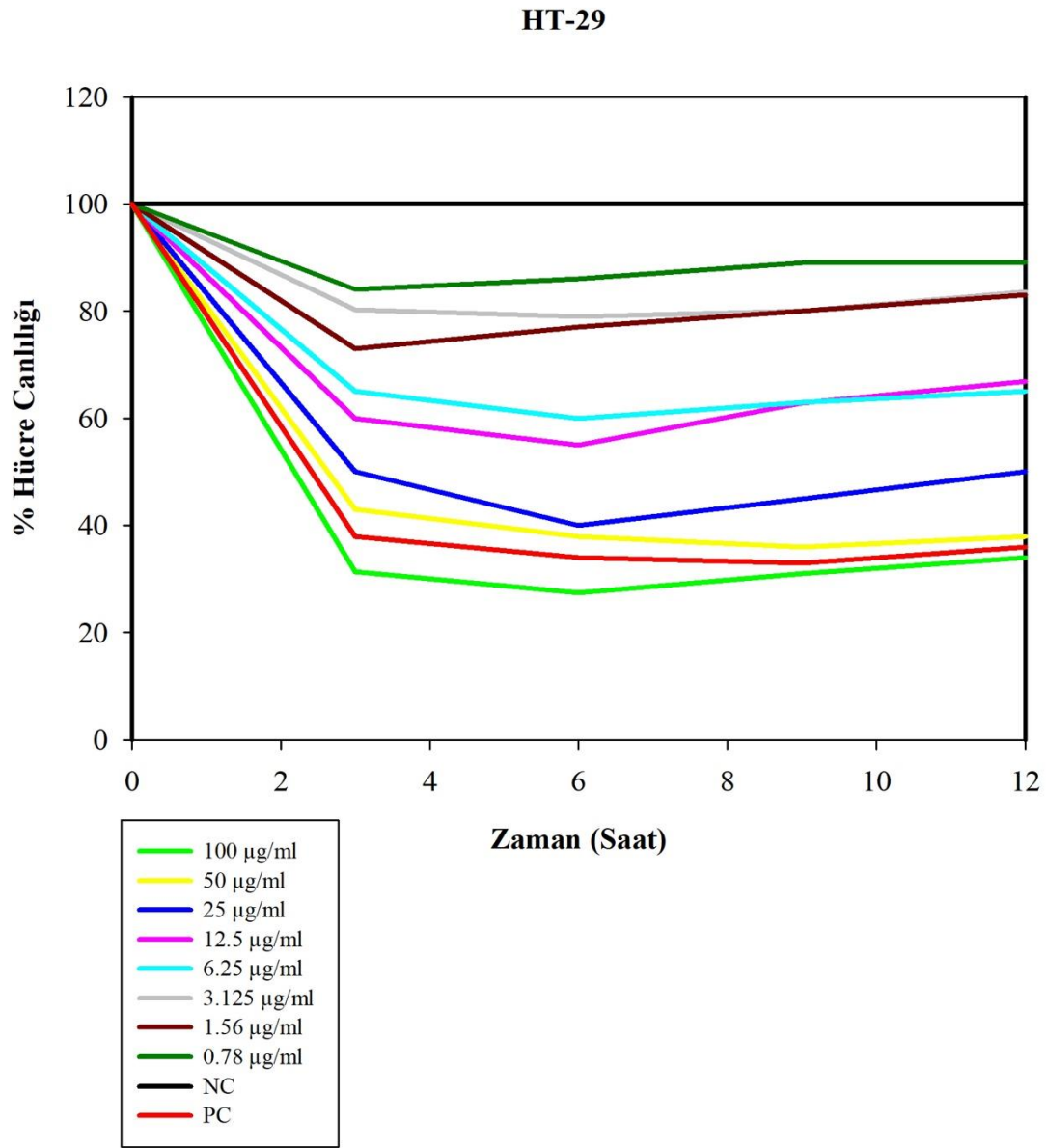


Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlardaki TP4'ün *P. aeruginosa* hücreleri üzerindeki antibakteriyel etkisi

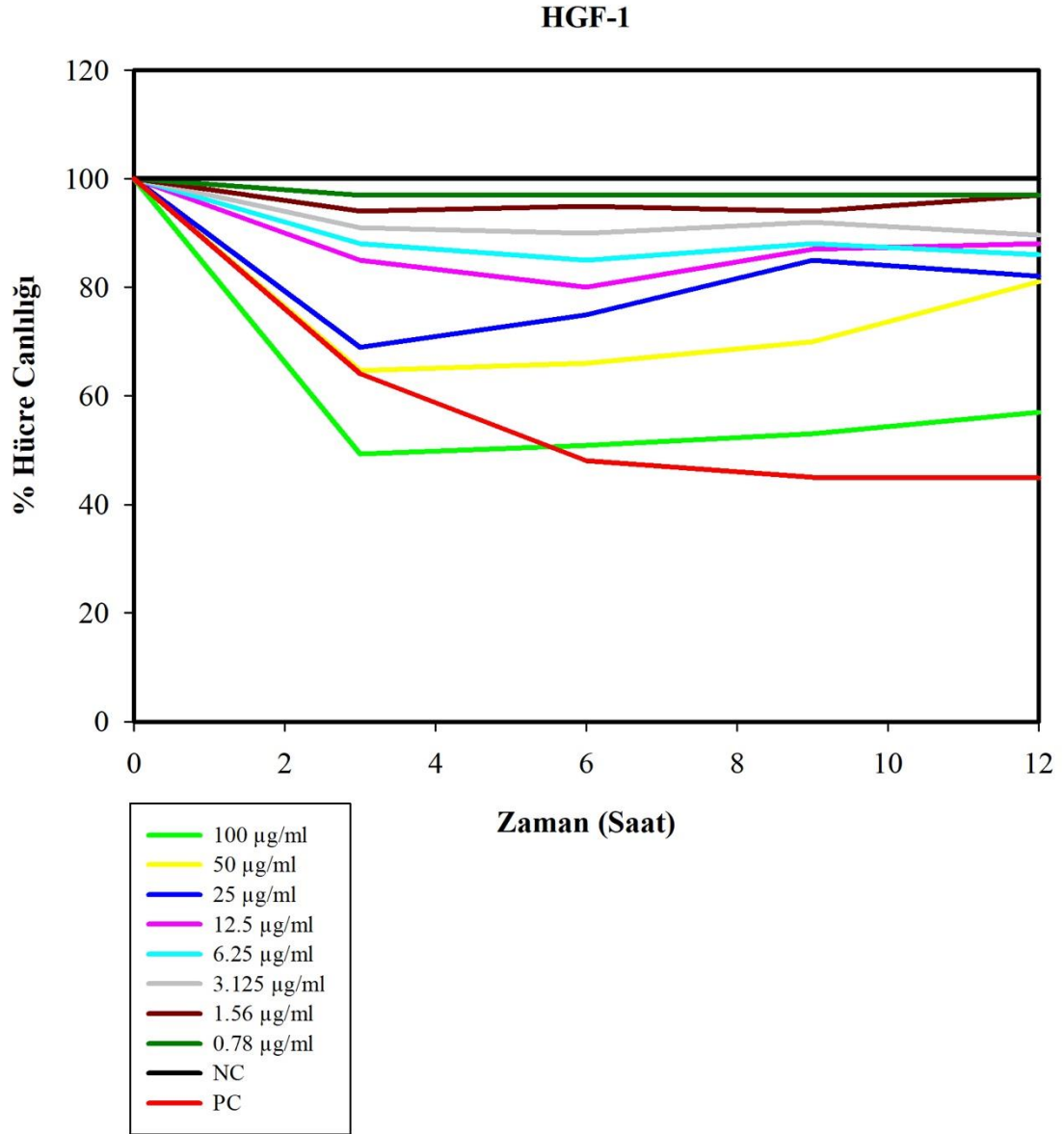
4.9. MTT Testi ile TP4'ün HT-29 ve HGF-1 Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

TP4'ün HT-29 kolon kanseri ve HGF-1 sağlıklı dişeti hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlenmiştir. 3, 6, 9 ve 12 saatleri için her iki hücre tipine de 8 konsantrasyonda (100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,78 µg/ml) TP4 uygulanmış ve hücreler 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında inkübe edilmiştir. AA

Bioquest IC50 hesaplama programı kullanılarak HT-29 ve HGF-1 hücreleri için IC50 değerleri hesaplanmıştır. HT-29 hücrelerinde, 6 saatlik inkübasyon süresinde IC50 değeri 15 µg/ml olarak bulunmuştur. HGF-1 hücrelerinde ise aynı sürede IC50 değeri 25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Doğru bir kıyaslama yapabilmek için her iki hücre tipide IC50 15 µg/ml olarak çalışılmıştır. Ayrıca alt ve üst konsantrasyondaki etkileri de analiz etmek amacıyla tüm çalışma boyunca her iki hücre hattında da deney setinde belirtilen konsantrasyonlarda (30-15-7,5 µg/ml) rekombinant TP4 peptiti uygulanmıştır. Sitotoksik etkiler aşağıdaki grafiklerde verilmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13. TP4'ün HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

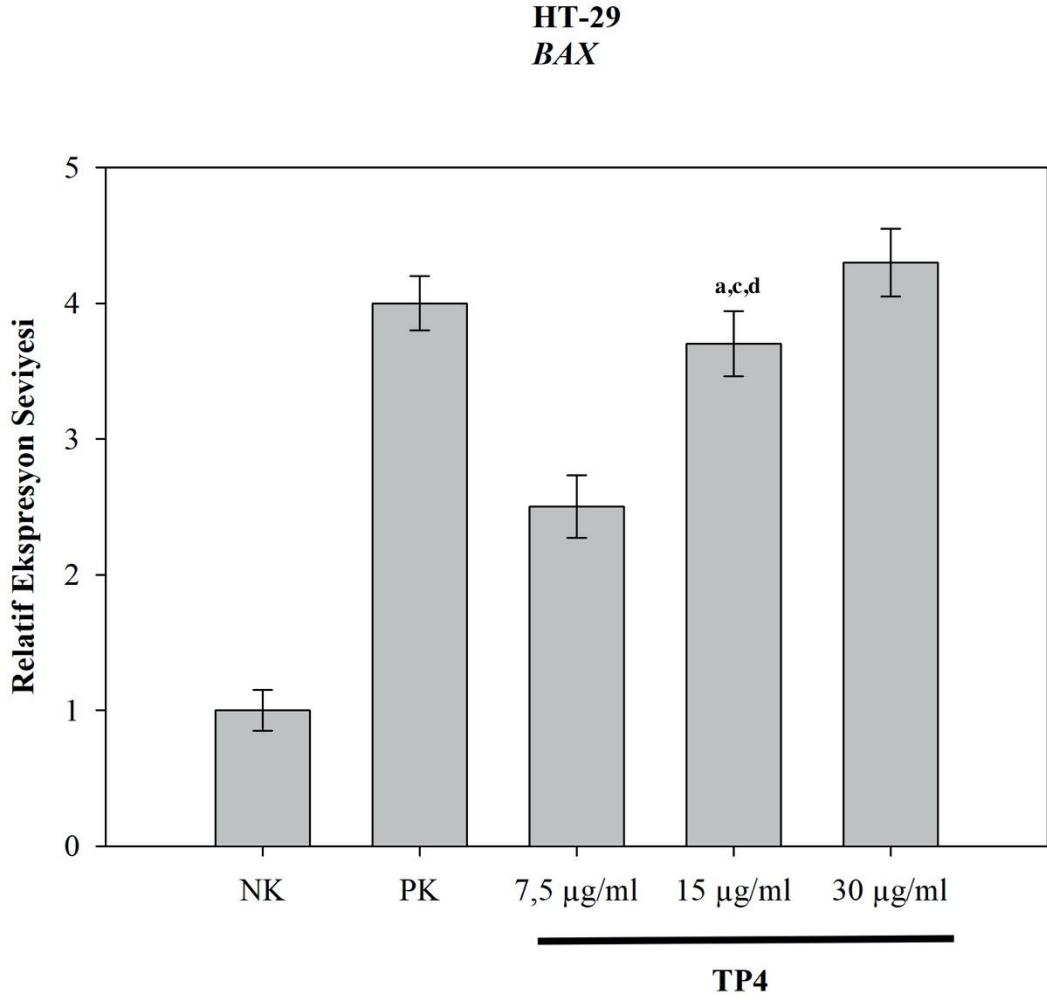


Şekil 4.14. TP4'ün HGF-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

4.10. TP4'ün HT-29 ve HGF-1 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Genlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

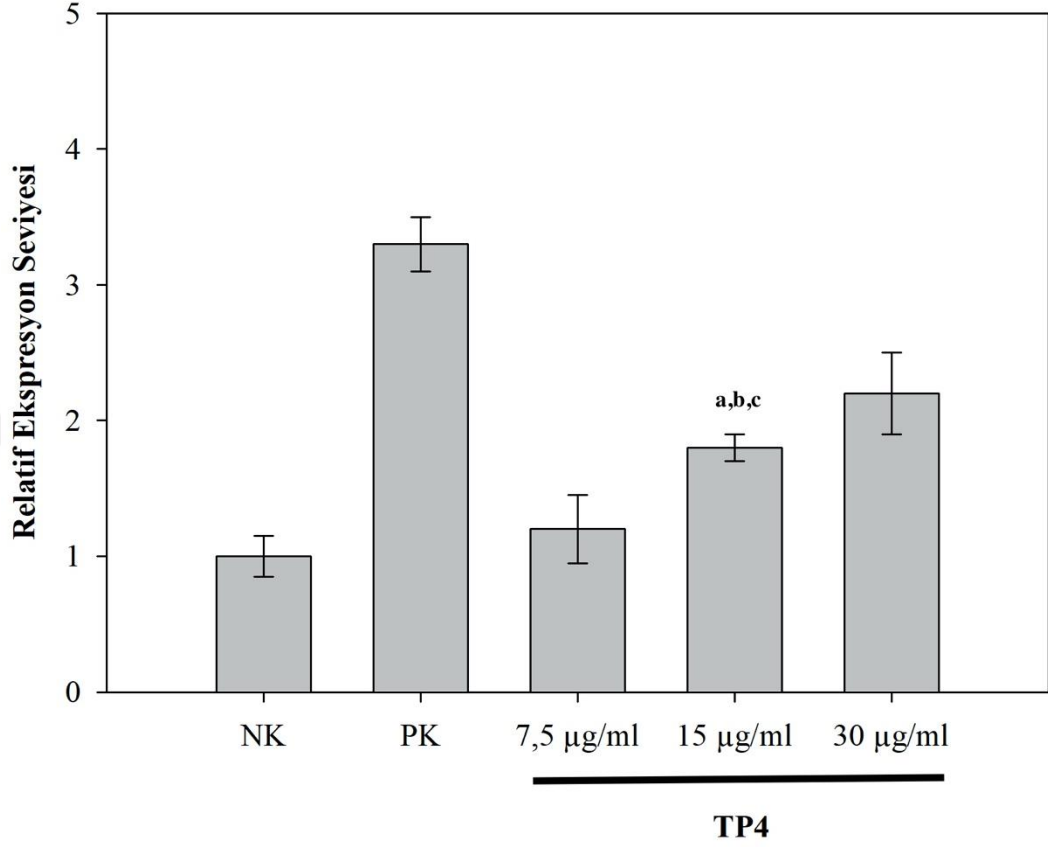
Tez çalışmasında her iki hücre hattı içinde deney setinde belirtilen konsantrasyonlar uygulanmış proteinler *BAX*, *BCL-2* ve *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri RT-qPCR ile belirlenmiştir. Gen ekspresyon analizi sonucunda 7,5-15-30 µg/ml TP4 uygulanan HT-29 hücrelerinde pro-apoptotik olan *BAX* ve *CASP3* gen ekspresyonunu önemli ölçüde arttığı HGF-1 hücrelerinde ise bu genlerin kanserli hücreler kadar artmadığı belirlenmiştir. Anti-apoptotik *BCL-2*'nin gen ekspresyon seviyesi HT-29 hücrelerinde

negatif kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı HGF-1 hücrelerinde ise bu genin kanserli hücrelerdeki kadar azalmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



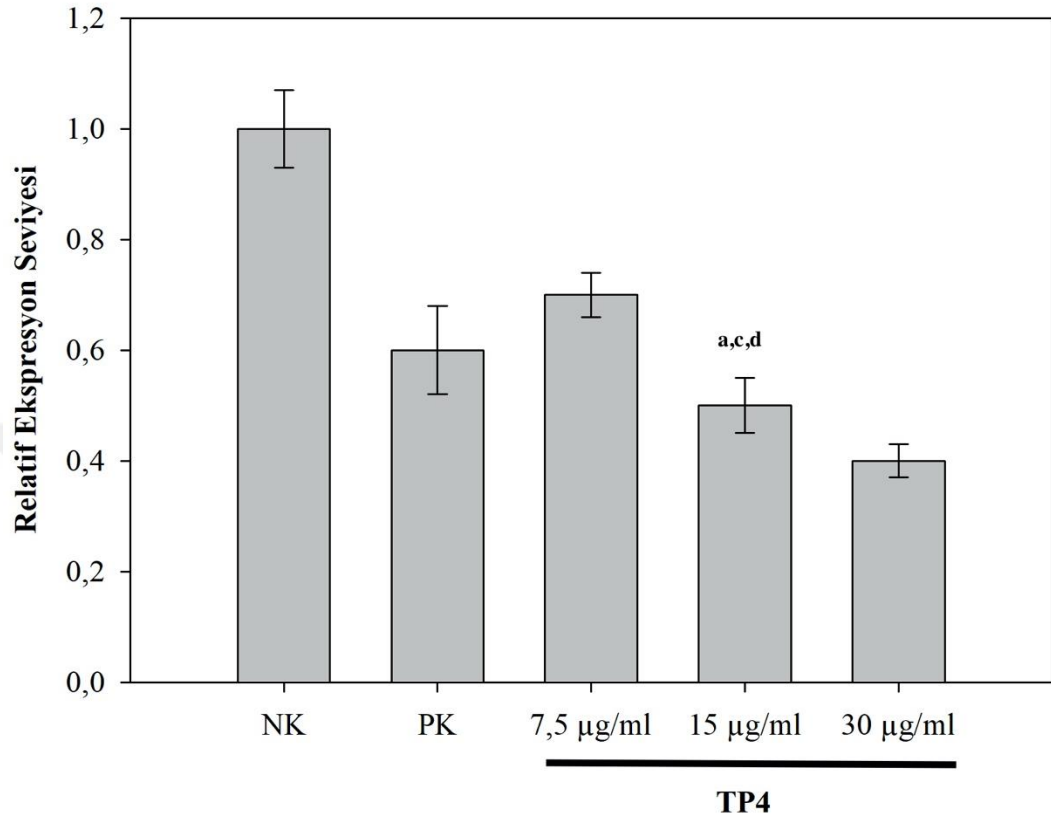
Şekil 4.15. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki BAX seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

**HGF-1
BAX**



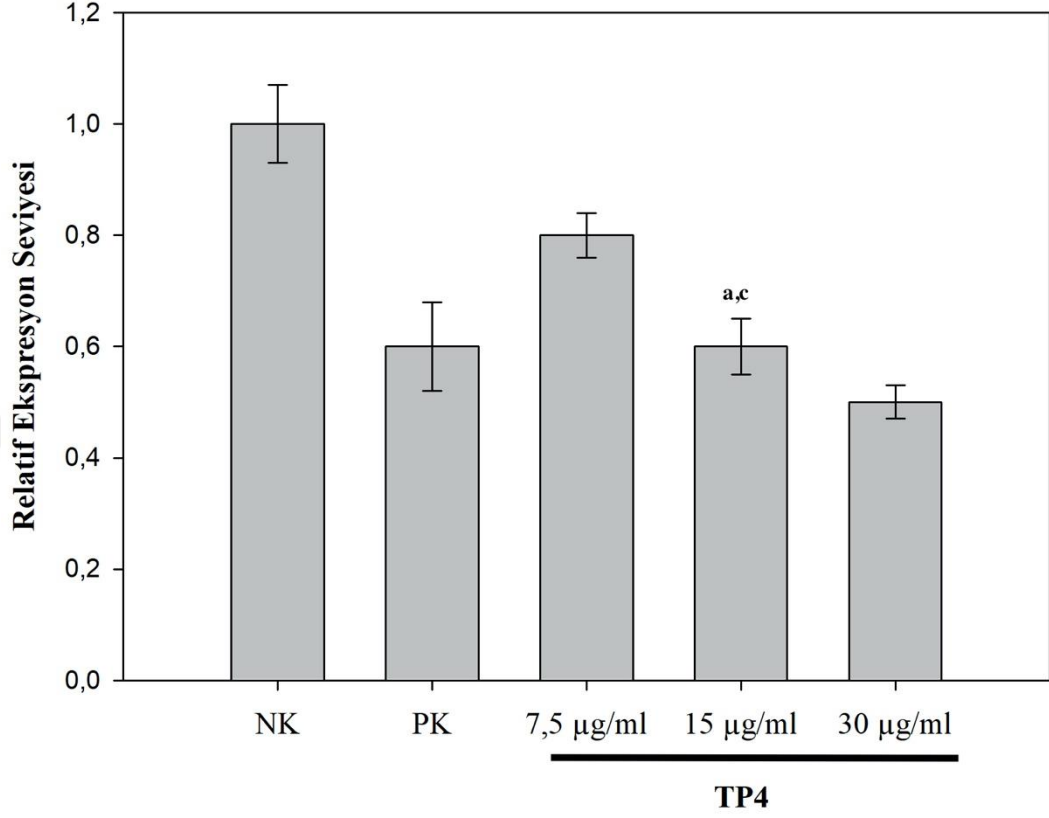
Şekil 4.16. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki BAX seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^ap<0,05 negatif kontrol grubuna göre, ^bp<0,05 pozitif kontrol grubuna göre, ^cp<0,05 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^dp<0,05 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

HT-29
BCL-2



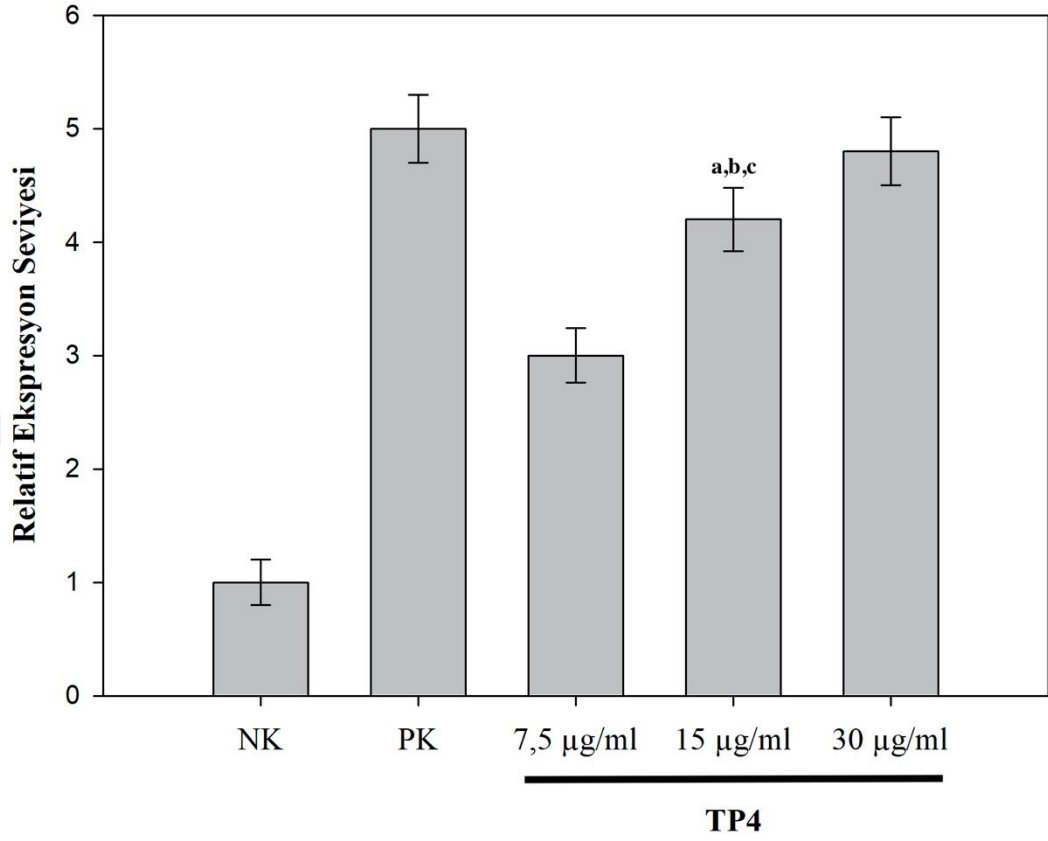
Şekil 4.17. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki *BCL-2* seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

**HGF-1
BCL-2**



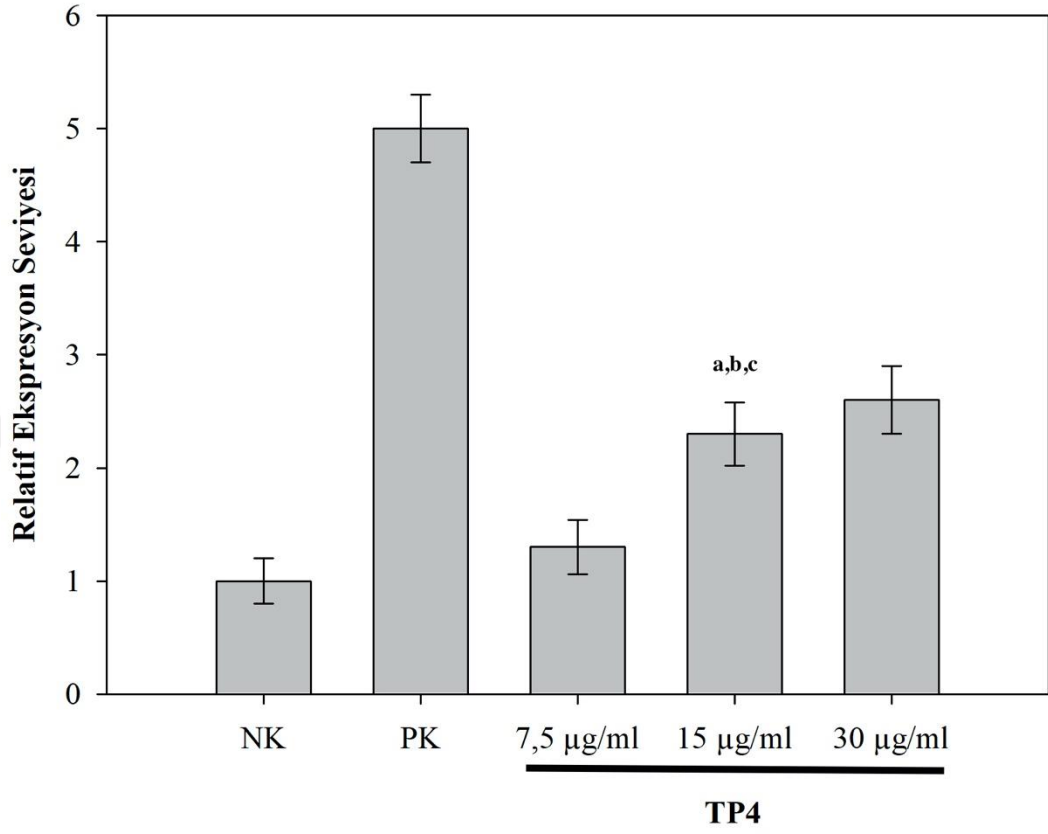
Şekil 4.18. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki *BCL-2* seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

HT-29
CASP3



Şekil 4.19. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki *CASP3* seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

**HGF-1
CASP3**



Şekil 4.20. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki CASP3 seviyesi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

4.11. Apoptotik Genlerin Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

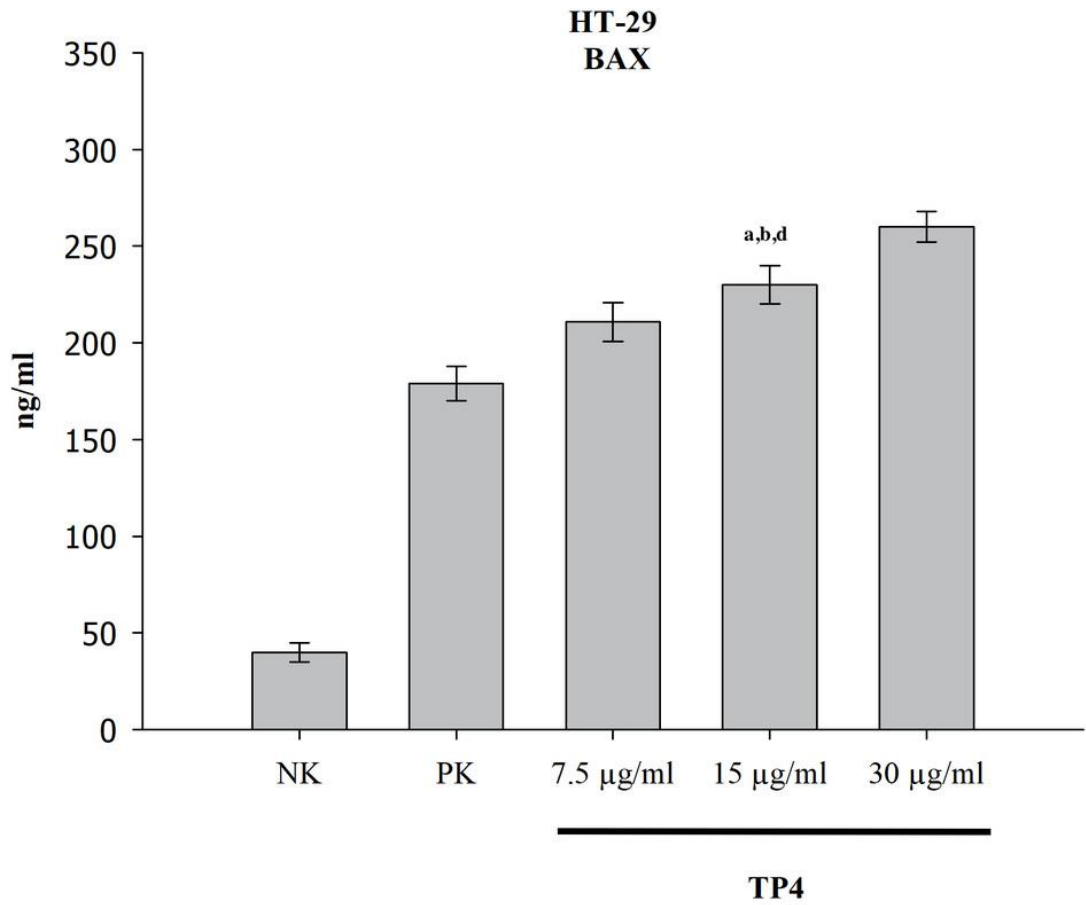
Aynı konsantrasyonlarda TP4 uygulanan hücrelerde, BAX, BCL-2 ve CASP3 protein miktar düzeylerine etkileri belirlenmiştir. Protein ekspresyon seviyeleri gen ekspresyon seviyeleri ile kıyaslandığında sonuçların paralel olduğu belirlenmiştir.

Her iki hücre hattında da pro-apoptotik bir protein olan BAX seviyeleri incelendiğinde, TP4 konsantrasyonu arttıkça hem pozitif kontrolde hem de TP4 uygulanmış hücrelerde BAX seviyesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Kanserli HT-29 hücrelerinde, negatif kontrol grubunda BAX seviyesi 40 ng/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan hücrelerde bu seviye 220 ng/ml'ye çıkmıştır. Bu, BAX protein miktarının yaklaşık 7 kat arttığını göstermektedir (Şekil 4.21). Sağlıklı HGF-1 hücrelerinde ise, negatif kontrol grubunda BAX seviyesi 40 ng/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan hücrelerde bu seviye 80 ng/ml'ye yükselmiştir, bu da yaklaşık 2 kat artışa işaret etmektedir (Şekil 4.22). Sonuç olarak, aynı dozlarda TP4 uygulanan kanserli HT-29 ve sağlıklı HGF-1 hücrelerinde, TP4'ün sağlıklı hücrelere kıyasla kanserli hücrelerde daha fazla apoptoza neden olduğu gözlemlenmiştir.

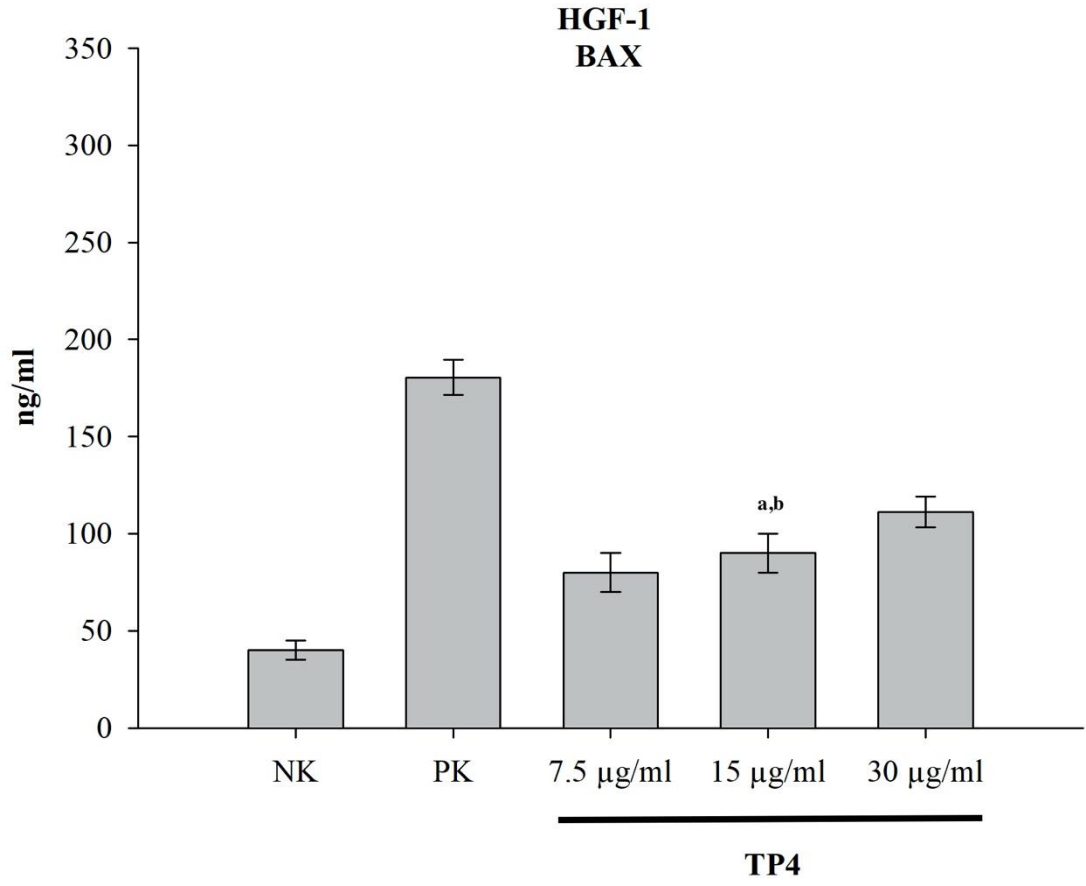
Anti-apoptotik bir protein olan BCL-2 seviyeleri incelendiğinde, TP4 konsantrasyonu arttıkça hem pozitif kontrolde hem de TP4 uygulanmış hücrelerde BCL-2 seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Kanserli HT-29 hücrelerinde, negatif kontrol grubunda BCL-2 seviyesi 2750 U/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan hücrelerde bu seviye 1250 U/ml'ye düşmüştür. Bu, BCL-2 protein miktarının yaklaşık 2,5 kat düştüğünü göstermektedir (Şekil 4.23). Sağlıklı HGF-1 hücrelerinde ise, negatif kontrol grubunda BCL-2 seviyesi 2750 U/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan hücrelerde bu seviye 2250 U/ml'ye düşmüştür (Şekil 4.24). Sonuç olarak, aynı dozlarda TP4 uygulanan kanserli HT-29 ve sağlıklı HGF-1 hücrelerinde, TP4'ün sağlıklı hücrelere kıyasla kanserli hücrelerde apoptoza engelleyen proteinlerin oldukça düştüğünü ve kanserli daha fazla apoptoza neden olduğu gözlemlenmiştir.

Pro-apoptotik bir protein olan CASP3 seviyeleri incelendiğinde, TP4 konsantrasyonu arttıkça hem pozitif kontrolde hem de TP4 uygulanmış hücrelerde CASP3 seviyesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Kanserli HT-29 hücrelerinde, negatif kontrol grubunda CASP3 seviyesi 5 ng/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan

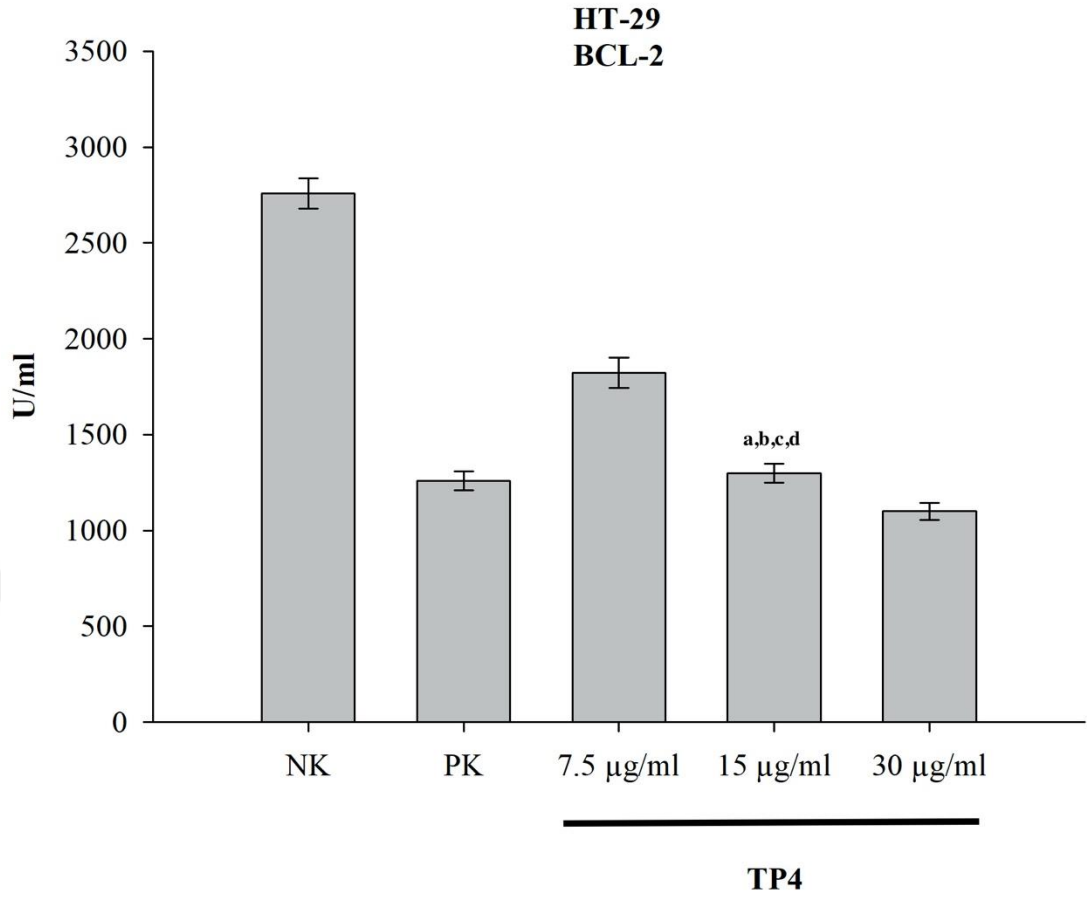
hücrelerde bu seviye 22 ng/ml'ye çıkmıştır. Bu, CASP3 protein miktarının yaklaşık 4,5 kat arttığını göstermektedir (Şekil 4.25). Sağlıklı HGF-1 hücrelerinde ise, negatif kontrol grubunda CASP3 seviyesi 5 ng/ml iken, IC50 (15 µg/ml) konsantrasyonunda TP4 uygulanan hücrelerde bu seviye 11 ng/ml'ye yükselmiştir, bu da yaklaşık 2 kat artışa işaret etmektedir (Şekil 4.26). Sonuç olarak, aynı dozlarda TP4 uygulanan kanserli HT-29 ve sağlıklı HGF-1 hücrelerinde, TP4'ün sağlıklı hücrelere kıyasla kanserli hücrelerde daha fazla apoptoza neden olduğu gözlemlenmiştir.



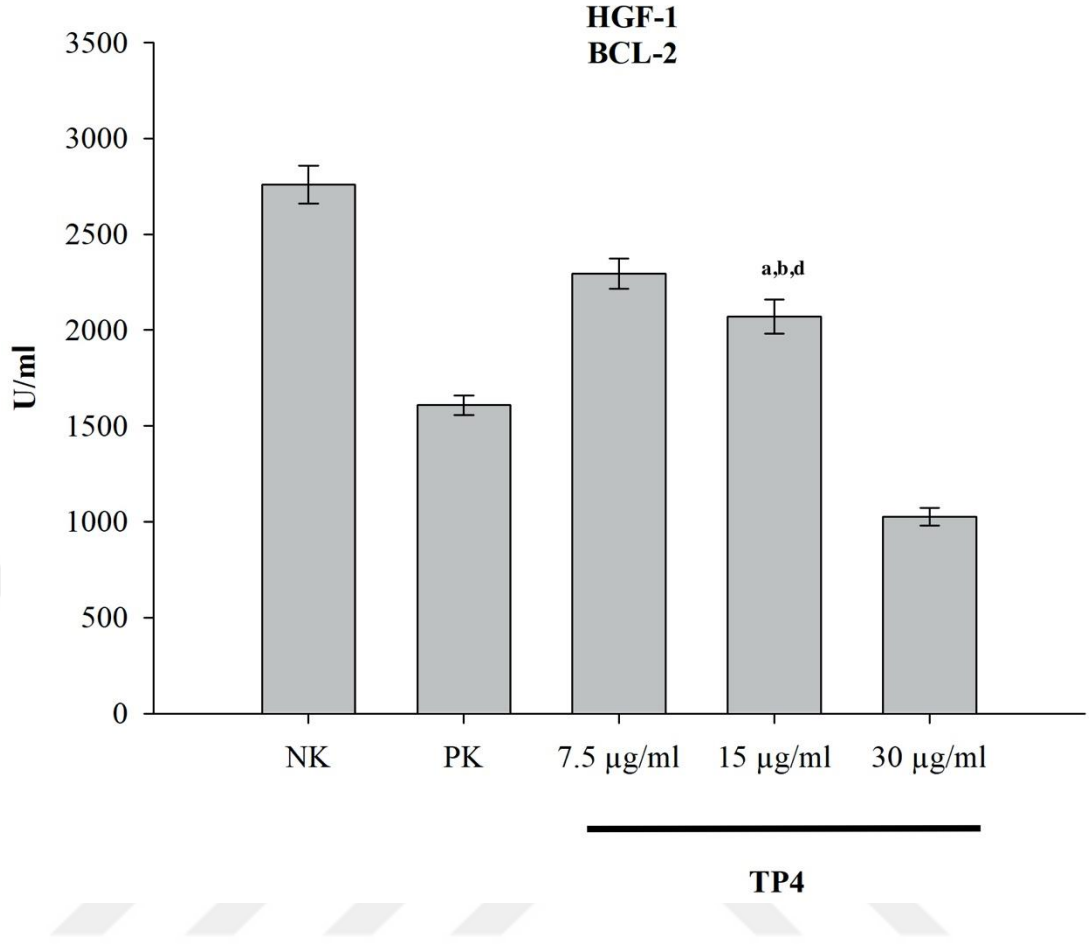
Şekil 4.21. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki BAX protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.



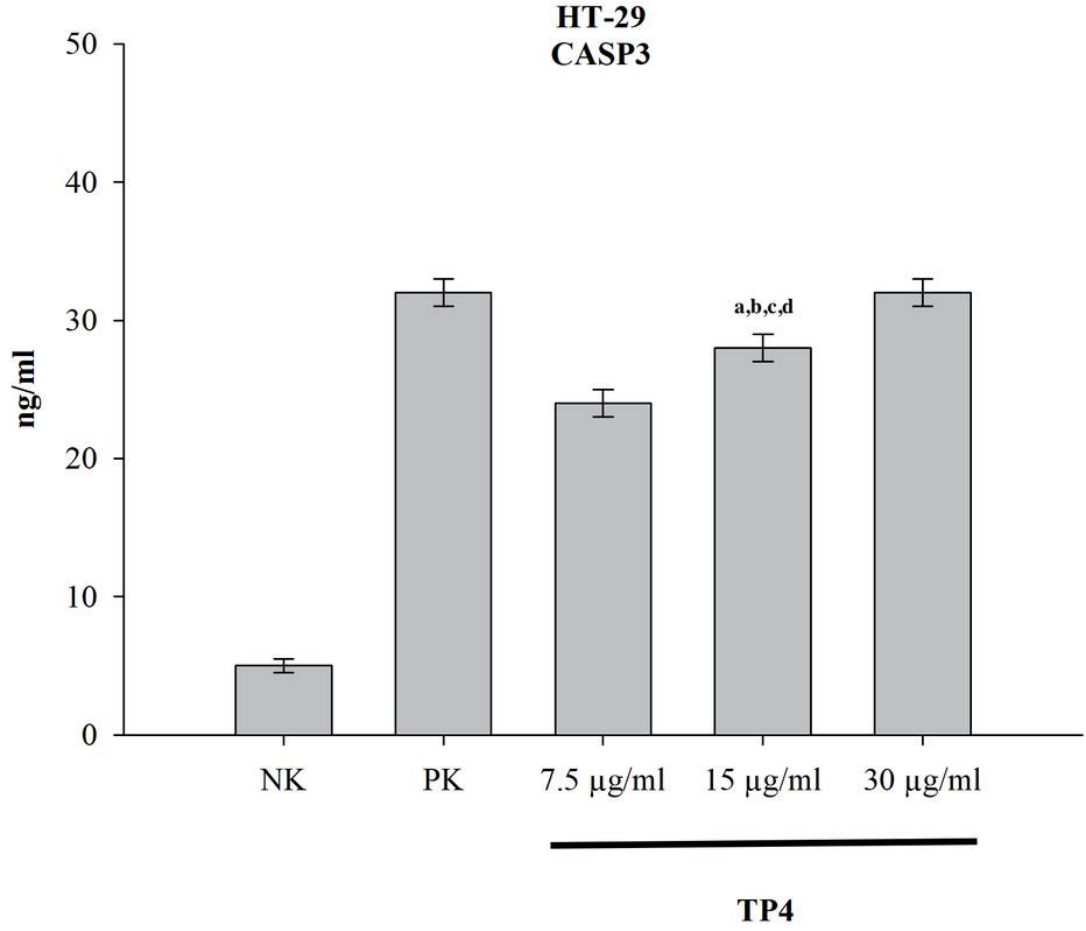
Şekil 4.22. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki BAX protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 $\mu\text{g/ml}$ TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.



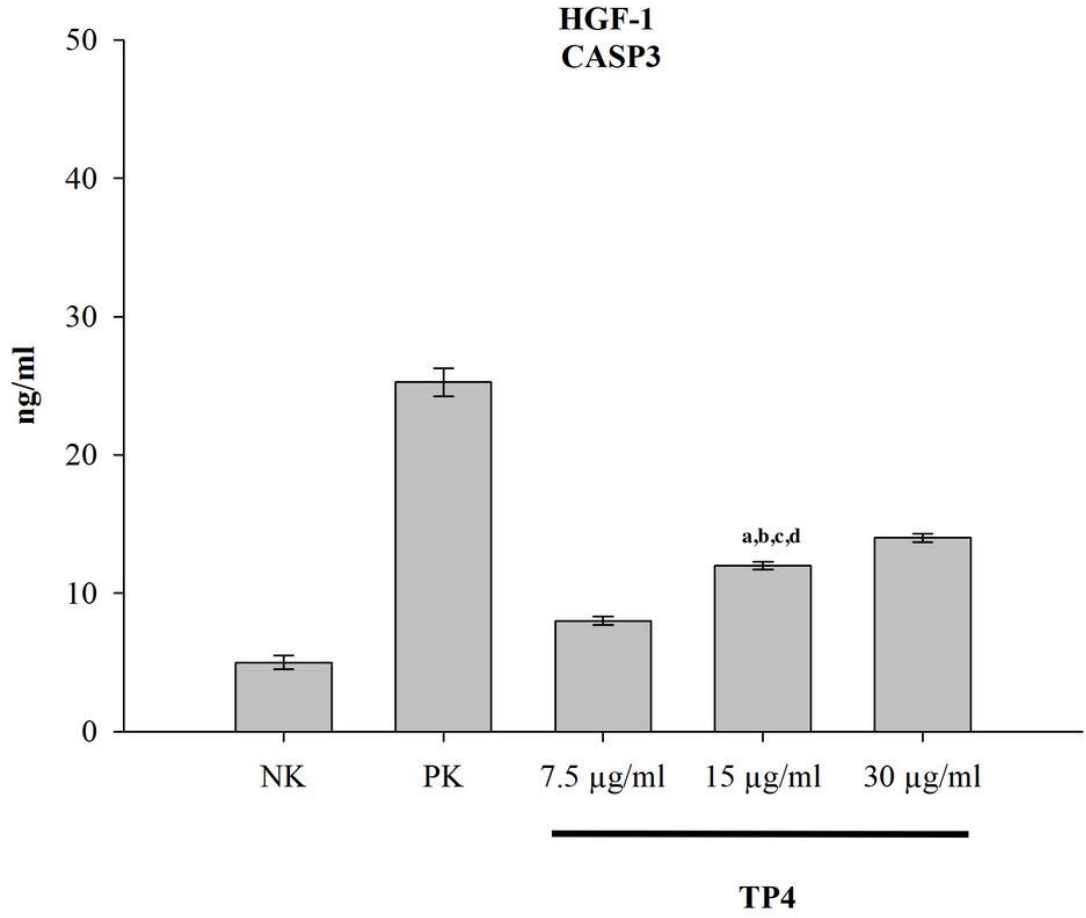
Şekil 4.23. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki BCL-2 protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.



Şekil 4.24. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki BCL-2 protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^ap<0,05 negatif kontrol grubuna göre, ^bp<0,05 pozitif kontrol grubuna göre, ^cp<0,05 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^dp<0,05 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.



Şekil 4.25. TP4 uygulanmış HT-29 hücrelerindeki CASP3 protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.



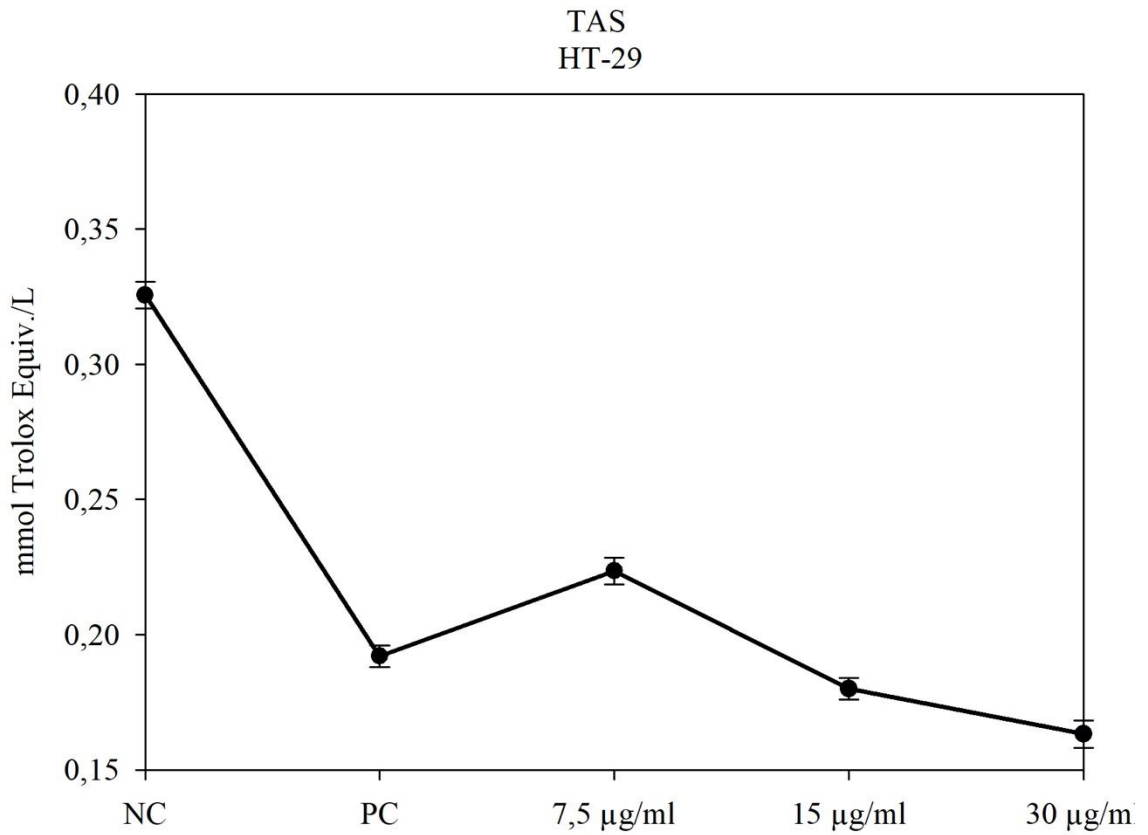
Şekil 4.26. TP4 uygulanmış HGF-1 hücrelerindeki CASP3 protein düzeyi. Değerler $\pm$ ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. ^a $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre, ^b $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre, ^c $p < 0,05$ 7,5 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre, ^d $p < 0,05$ 30 µg/ml TP4 uygulanan gruba göre ifade edilmiştir.

4.12. TP4'ün Hücrelerde Meydana Getirdiği Antioksidan ve Oksidan Düzeylerin Belirlenmesi

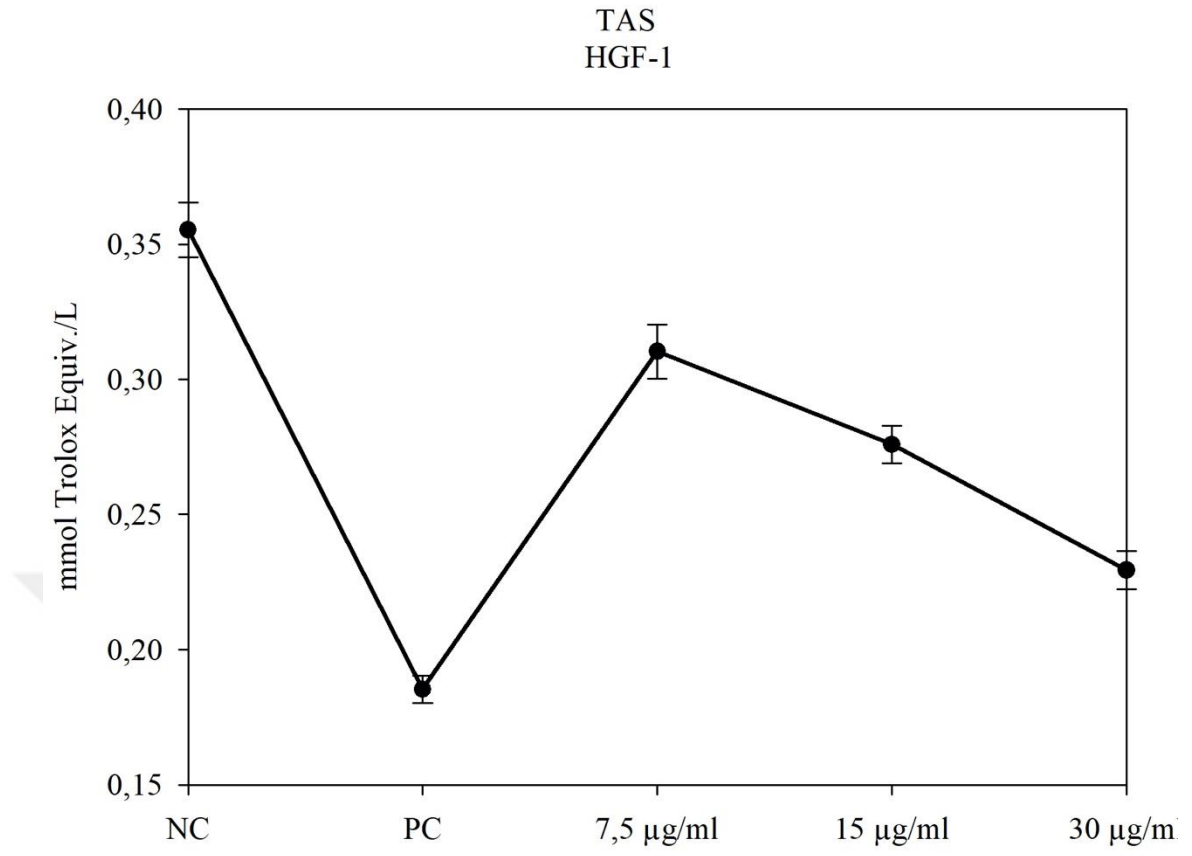
Hücrelerde meydana gelen antioksidan durumlar, TAS ve TOS ELISA kitleri kullanılarak saflaştırılmış proteinler üzerinde belirlenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde görüldüğü gibi şu şekildedir: HT-29 hücrelerinde total antioksidan seviye negatif kontrolde yüksek iken pozitif kontrolde düşmüştür. TP4 uygulanmış hücrelerde, antioksidan seviyesinin negatif kontrole göre anlamlı derecede düştüğü ve konsantrasyon arttıkça bu düşüşün daha da belirginleştiği gözlemlenmiştir. HGF-1 hücrelerinde ise total antioksidan seviye

negatif kontrole göre düşmüş, ancak en yüksek konsantrasyonda bile pozitif kontrole göre daha az düşmüştür (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).

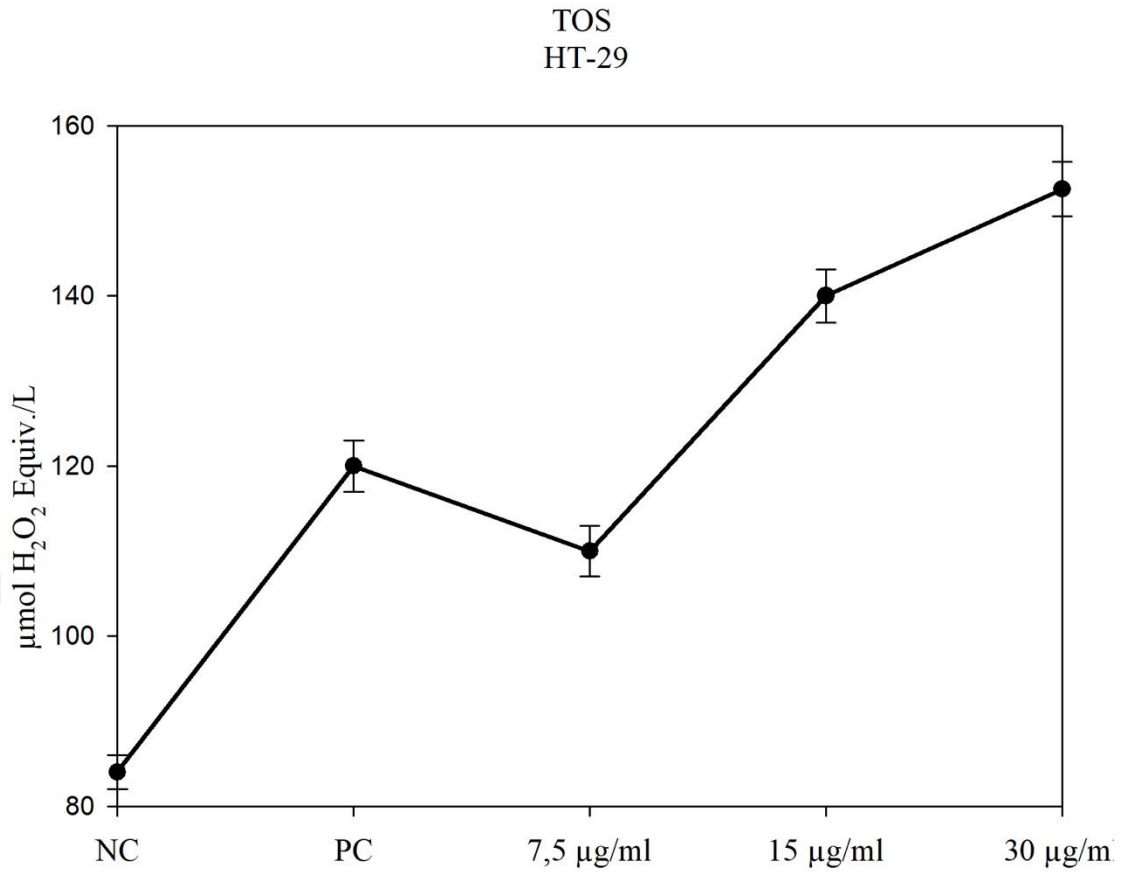
Total oksidan durum incelendiğinde, HT-29 hücre hattında toplam oksidan seviye negatif kontrolde düşükken, pozitif kontrolde yükselmiştir. TP4 konsantrasyonu arttıkça, oksidan seviye hem negatif kontrole hem de pozitif kontrole göre belirgin şekilde artmıştır. HGF-1 hücrelerinde ise total oksidan seviye pozitif kontrolde, negatif kontrole göre oldukça yüksek bulunmuştur. TP4 uygulanmış hücrelerde, konsantrasyon artışı ile oksidan seviye artarken, bu değer pozitif kontrole göre düşük kalmıştır (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.27. HT-29 hücreleri üzerindeki TAS

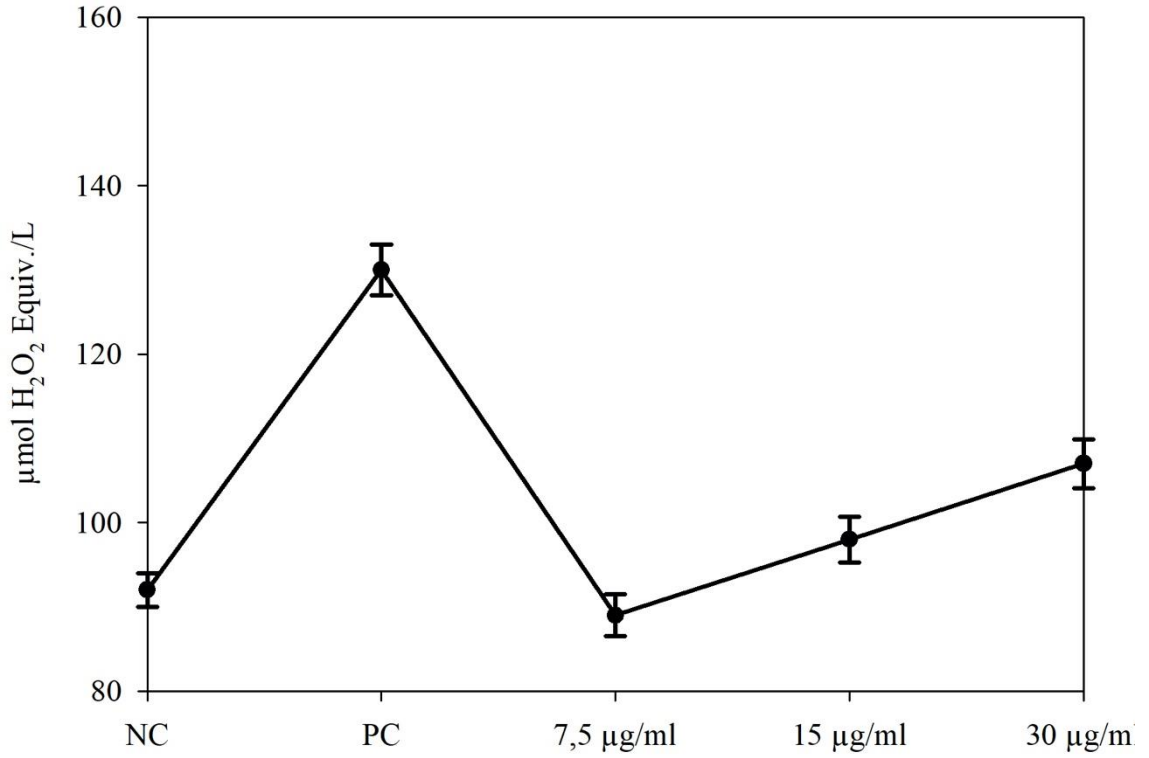


Şekil 4.28. HGF-1 hücreleri üzerindeki TAS



Şekil 4.29. HT-29 hücreleri üzerindeki TOS

TOS HGF-1



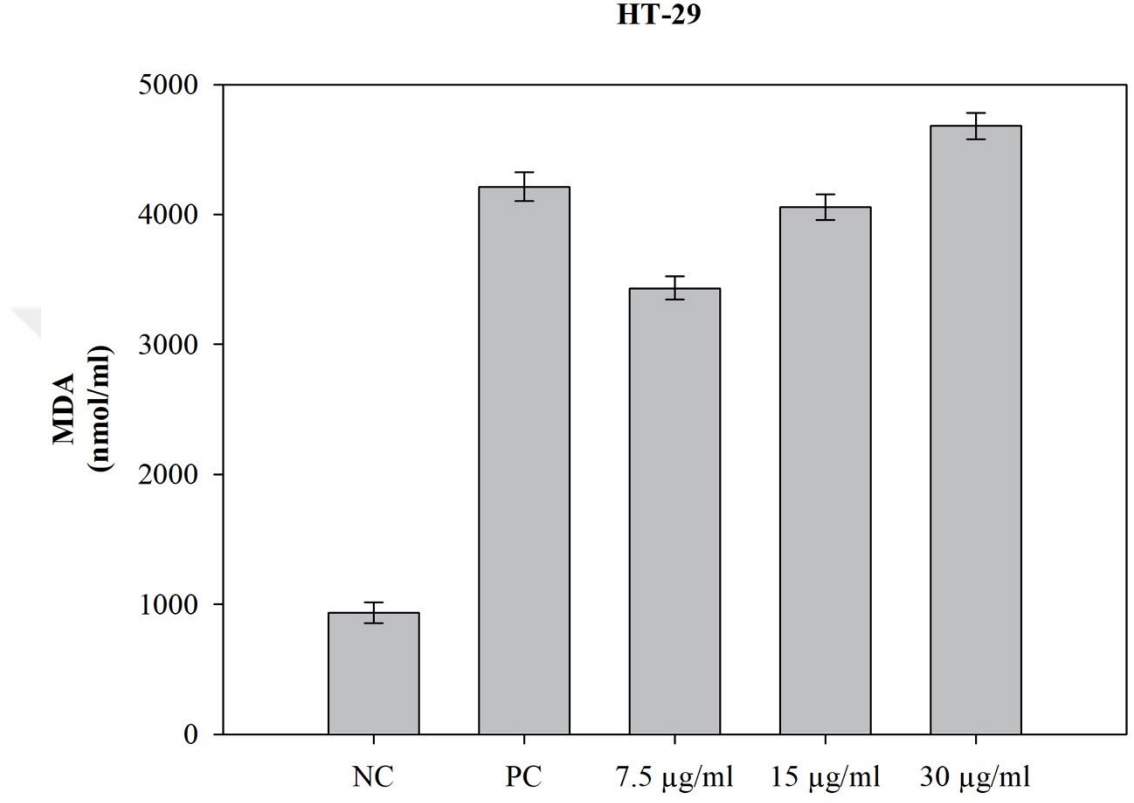
Şekil 4.30. HGF-1 hücreleri üzerindeki TOS

4.13. MDA Tayini

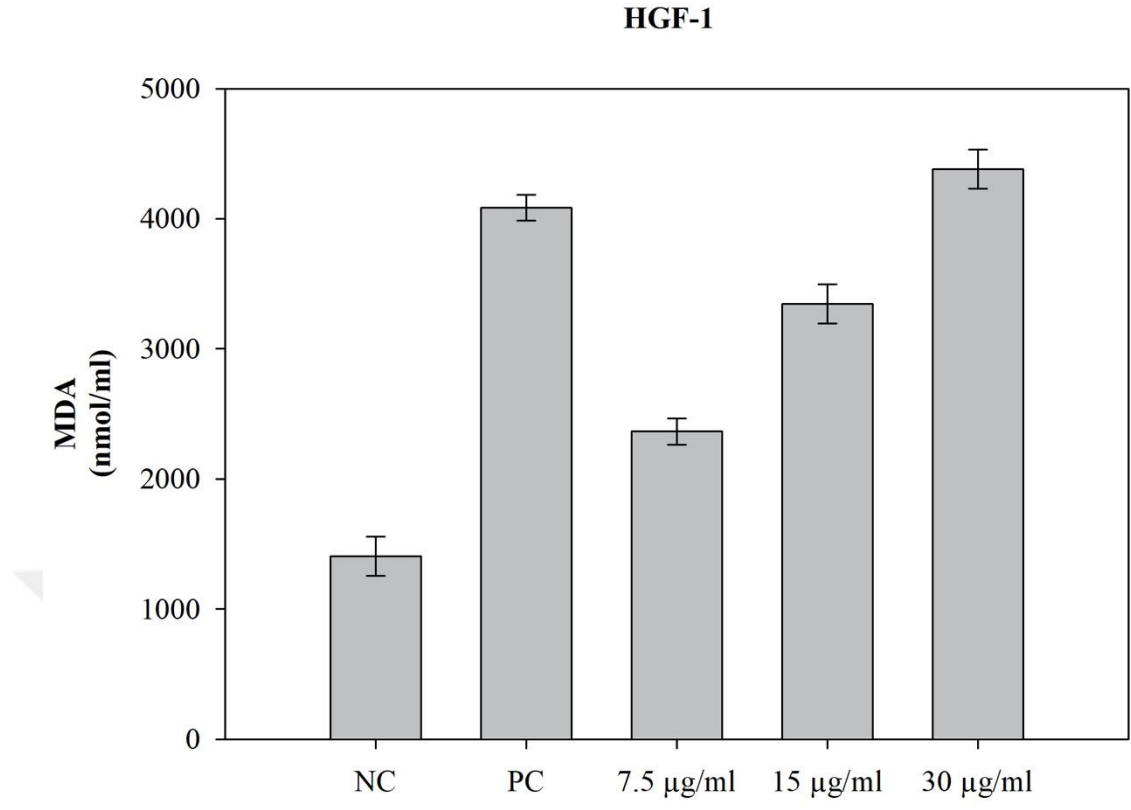
Deney setinde belirtilen konsantrasyonlarda TP4 uygulanan hücrelerde, membran hasarı lipid peroksidasyonu ile oluşan yan ürün MDA seviyesi üzerinden değerlendirilmiştir. MDA seviyeleri, hücre peletlerinden belirlenmiştir. TP4 konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, HT-29 hücre hattında MDA seviyesi negatif kontrole kıyasla artış göstermiştir. Negatif kontrolde MDA seviyesi yaklaşık 1000 nmol/ml olarak belirlenirken, IC50 değerindeki (15 μg/ml) TP4 konsantrasyonunda bu seviye yaklaşık 4000 nmol/ml'ye ulaşmıştır. Bu durum, hücre hasarında yaklaşık dört kat artışa işaret etmektedir (Şekil 4.31).

HGF-1 hücre hattında, negatif kontrolde MDA seviyesi yaklaşık 1400 nmol/ml iken IC50 değerindeki (15 μg/ml) TP4 konsantrasyonunda bu seviye yaklaşık 3300 nmol/ml'ye

yükselmiştir. Bu, hücre hasarında yaklaşık 2,5 kat artışa işaret etmektedir. Sonuç olarak, aynı dozlarda TP4 uygulanan kanserli HT-29 ve sağlıklı HGF-1 hücrelerinde, TP4'ün sağlıklı hücelere kıyasla kanserli hücrelerde daha fazla hücre hasarına yol açarak hücrelerin apoptoza gitmesine neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.31. HT-29 hücrelerindeki MDA miktarı



Şekil 4.32. HGF-1 hücrelerindeki MDA miktarı

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Tez çalışmasında TP4 peptiti *P. pastoris* KM71H ekspresyon sisteminde güçlü ve indüklenebilir bir promotör olan AOX1 promotörünü içeren pPICZαA ekspresyon vektörü kullanılarak eksprese edilmiştir. Rekombinant TP4 peptiti, Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmasından sonra TP4'ün antikanser aktivitesi HT-29 kolorektal karsinoma hücrelerinde araştırılmıştır. Ayrıca TP4 aynı parametreler ve deneyler ile HGF-1 sağlıklı dişi fibroblast hücrelerine de uygulanmış ve sağlıklı ve kanserli hücrelerde nasıl etki ettiği kıyaslanmıştır. KM71H suşunda eksprese edilen rekombinant TP4'ün antikanser etkisi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Elde edilen veriler ve mevcut literatür göz önünde bulundurularak değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, rekombinant TP4 peptidinin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretiminin benzer metotlar ile gerçekleştirildiği görülmektedir (Neshani vd., 2018; Tai vd., 2021 ve Huang vd., 2020). Neshani vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada TP4 geni pPIC9 vektörüne klonlanmış ve TP4 proteini *P. pastoris* GS115 suşunda eksprese edilmiştir. Tai vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada ise TP4 geni pPICZαA vektörüne klonlanmış ve TP4 proteini *P. pastoris* X-33 suşunda eksprese edilmiştir. Benzer şekilde, Huang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada da TP4 geni pPICZαA vektörüne klonlanmış ve TP4 proteini *P. pastoris* X-33 suşunda eksprese edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada ise TP4 geni pPICZαA vektörüne klonlanmış ve literatürden farklı olarak TP4 peptiti *P. pastoris* KM71H suşunda eksprese edilmiştir. *P. pastoris* suşlarının büyük bir kısmı Mut⁺ (metanol kullanımı pozitif fenotip) olup metanol indüksiyonu ile çok hızlı gelişir. Çok az kısmı Mut^s ve Mut⁻ genotipine sahiptir yani bir veya iki AOX geni de silinmiştir. KM71H suşu Mut^s olup AOX1 geni silinmiştir ve AOX2 geni nedeniyle metanolü çok yavaş metabolize eder. Bazen AOX genleri silinmiş suşlar, rekombinant protein üretiminde doğal tip suşlardan daha üstün performans gösterebilmektedir (Karaoğlu, 2012). Ayrıca Mut^s suşu daha az metanol gerektirmesinden dolayı büyük ölçekli fermentasyonlarda maliyetin düşmesi ve metanol indüksiyonu kaynaklı kontaminasyon riskinin azalması gibi avantajlara sahiptir.

Rekombinant olarak üretilen TP4'ün antibakteriyel etkisi MİK ve MBK değerleri değerlendirilerek belirlenmiştir. Bakterilerin hücre zarı anyonik özelliğe sahiptir bu özelliğinden dolayı katyonik AMP'ler elektrostatik etkileşimler yoluyla bakterilerin hücre zarına bağlanarak işlevlerini bozar ve ölümüne neden olurlar (Zhong vd., 2020). MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi için TP4 peptidi gram pozitif olarak *E. coli*, *M. luteus* bakterilerine gram negatif olarak ise *P. aeruginosa* ve *B. subtilis* bakterilerine uygulanmıştır. Sonuç olarak TP4'ün düşük miktarı bile yüksek antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde rekombinant olarak üretilen TP4'ün antibakteriyel aktivitesi benzer bir yöntem kullanılarak araştırılmıştır (Neshani vd., 2018). Elde edilen sonuçlar literatürle kısmen uyumlu olsa da aynı bakteride dahi literatüre göre daha yüksek MİK ve MBK değerlerinin bulunmasının deney sırasındaki parametrelerdeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde yer alan TP4'ün kanserli hücreler üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarında şu sonuçlara varılmıştır. Su vd. (2021) tarafından yapılan hücre canlılık testi çalışmasında sentetik TP4 peptidi SW982 ve AsKaSS insan sinovyal sarkomu hücrelerine uygulanmıştır. Deney sonucunda TP4'ün SW982 ve AsKa-SS hücrelerindeki IC50 değerleri sırasıyla 29.20 ve 32.41 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ting vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise sentetik TP4 peptidi MDA-MB231, MDA-MB453 ve MCF7 meme kanseri ve sağlıklı memeli epitel M10 hücrelerine uygulanmıştır. Deney sonucunda TP4'ün meme kanseri hücrelerindeki IC50 değerleri 15 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı doz sağlıklı M10 hücre hattına uygulandığında çok az etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Su vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada ise sentetik TP4 peptidi U87MG ve U251 glioblastoma ve sağlıklı endotel HUVEC ve N27 hücrelerine uygulanmıştır. Deney sonucunda TP4'ün glioblastoma hücrelerindeki IC50 değerleri 20 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı doz sağlıklı HUVEC ve N27 hücrelerine uygulandığında 50 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Yani literatürdeki sonuçlar TP4'ün kanserli hücreler üzerinde daha toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında TP4'ün HT-29 kolon kanseri hücreleri ve HGF-1 sağlıklı dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT hücre proliferasyonu analizi ile belirlenmiştir. HT-29 ve HGF-1 hücre hatlarında MTT deney sonuçlarına göre HT-29 kanserli hücrelerde IC50 değeri 15 µg/ml iken HGF-1 sağlıklı hücrelerde 25 µl olarak belirlenmiştir. Yani TP4'ün kanserli hücrelerdeki sitotoksik etkisi sağlıklı hücrelere göre

yaklaşık 2 katıdır. Bu sonuç literatürde belirtilen sonuçlarla paralel olup katyonik bir antimikrobiyal peptit olan TP4'ün hücre zarının dışında negatif yük miktarı fazla olan kanser hücresine göre negatif yük miktarı düşük olan sağlıklı hücrelerde daha fazla etki ettiği ve kanserli hücrelerin hücre zarı morfolojisini bozarak apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca literatürde farklı hücre hatlarında test edilen TP4 sentetik olarak üretilip satın alınarak uygulanmıştır ancak bu tez kapsamında ilk kez rekombinant üretilen TP4 akabinde hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmanın diğer bir özgünlüğü ise TP4 peptiti ilk kez HT-29 kolon kanseri hücrelerinde antikanser etkisinin araştırılmış olmasıdır.

Çalışma boyunca anlamlı bir kıyaslama yapabilmek için HT-29 ve HGF-1 hücreleri HT-29 için belirlenen IC50 konsantrasyonunda çalışılmıştır. Ayrıca sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi için IC50 değerinin alt ve üst konsantrasyon değerleri de (7.5, 15, 30 µg/ml) aynı parametreler ile çalışılmıştır.

Antimikrobiyal peptitler, hücre zarı bozulması, mitokondriyal disfonksiyon, ROS üretimi ve DNA hasarı gibi çeşitli mekanizmalarla kanser hücrelerini hedef alarak nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklerler (Deslouches ve Di, 2017; Kuo vd., 2018; Su vd., 2019). Hücre hasar gördüğü zaman hücredeki pro-apoptotik (*BAX* ve *CASP3*) veya anti-apoptotik (*BCL-2*) genler aktive olur ve bu genler apoptozun kontrolünde önemli rol oynarlar (Kiraz vd., 2016; Portt vd., 2011). Kuo vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada TP4 stok solüsyonu (MSP-4) MG63 osteosarkom kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Çalışmada, MSP-4 peptidinin *BCL-2* gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerini düşürdüğü ve pro-apoptotik protein olan *BAX* ve *BİD*'in doz bağımlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, *CASP9* ve *CASP3* protein seviyelerinin sürekli olarak arttığı gözlemlenmiştir. MSP-4 kaynaklı apoptozis mekanizmasının, hem içsel yol (mitokondriyal apoptotik yol) hem de dışsal yol (reseptör aracılı apoptotik yol) tarafından aktive edildiği belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında TP4'ün HT-29 ve HGF-1 hücreleri üzerindeki apoptoz analizi *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genleri ve bu genlerin eksprese ettiği *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* proteinleri üzerinde incelenmiştir ve sonuçlar gen ve protein olarak karşılaştırılmıştır. RT-qPCR ile gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi için 6 saat 7,5-15,30 µg/ml TP4 uygulanan HT-29 hücrelerinde *BAX* ve *CASP3* gen ekspresyonu önemli ölçüde arttığı HGF-1 hücrelerinde ise bu artışın kanserli hücreler kadar olmadığı

belirlenmiştir. *BCL-2*'nin gen ekspresyon seviyesinin HT-29 hücrelerinde önemli ölçüde düştüğü HGF-1 hücrelerinde ise bu azalışın kanserli hücreler kadar olmadığı belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonda TP4 uygulanan hücrelerde, BAX, BCL-2 ve CASP3 proteininin ELISA bulguları gen ekspresyon sonuçlarıyla paralel olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular artan pro-apoptotik ve azalan anti-apoptotik sinyallerin ikili etkisi, TP4'ün özellikle kanserli hücrelerde güçlü bir apoptotik etkisi olduğunu göstermiştir.

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olan bileşiklerken oksidanlar hücresel yapıları hasara uğratabilen ve hastalıklara yol açabilen reaktif moleküllerdir. Su vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada TP4'ün reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini başlattığını ve ayrışan protein-2, süperoksit dismutaz SOD-1 ve SOD-2 gibi antioksidan proteinleri düşürerek Aska-SS ve SW982 hücre hatlarında nekrotik hücre ölümüne neden olabileceğini gösterilmiştir. Tez çalışmasında HT-29 ve HGF-1 hücrelerindeki total antioksidan ve oksidan durum sırasıyla TAS ve TOS ELISA kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TP4'ün HT-29 ve HGF-1 hücrelerinde oksidatif denge üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. HT-29 hücrelerinde TP4 konsantrasyonunun artmasıyla negatif kontrole göre TAS azalması, TP4'ün hücrelerde oksidatif stresi indükleyerek oksidan düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Negatif kontrole kıyasla TP4 uygulanan hücrelerde TOS' ta gözlemlenen azalma, TP4'ün ya mevcut antioksidanları tüketiyor olabileceğini ya da hücresel antioksidan savunma mekanizmalarını inhibe ediyor olabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, oksidatif stresin hücrenin savunma sistemleri tarafından yeterince yönetilememesi durumunda hücresel hasara sebep olabilecek TP4'ün potansiyel pro-oksidan rolünü vurgulaması açısından kritik öneme sahiptir. Öte yandan, TP4 uygulanan hücrelerin oksidan seviyelerindeki artış, TP4'ün reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini uyarabileceğini veya hücrenin bu türleri nötralize etme yeteneğini bozabileceğini düşündürmektedir. Aynı parametreler HGF-1 hücreleri için değerlendirildiğinde antioksidant seviyenin kanserli hücreler kadar artmadığı oksidan seviyenin ise yine kanserli hücreler kadar azalmadığı görülmektedir. Bu durumun sebebi TP4'ün kanserli hücrelerde oluşturduğu oksidatif stresin ve hücre hasarının sağlıklı hücrelere göre yüksek olmasıdır. Genel olarak bu çalışma, uzun vadeli oksidatif stresin, TP4'ün potansiyel antikanser uygulamaları için kanser hücresinde apoptoza yol açabileceğini göstermiştir.

Lipid peroksidasyonu, hücre membranlarına zarar veren reaktif oksijen türlerinin neden olduğu bir süreçtir. MDA, bu sürecin bir yan ürünü olarak ortaya çıkar ve hücre hasarının bir göstergesi olarak kullanılır. HT-29 hücrelerinde TP4 konsantrasyonu arttıkça MDA seviyesinin arttığı görülmüştür. HGF-1 hücrelerinde de MDA artış durumu benzerdir fakat HT-29 kadar yüksek değildir. TP4'ün hücrelerde lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla MDA seviyelerini artırması, hücrelerde meydana gelen oksidatif stres mekanizmasını işaret eder. Önceki sonuçları destekleyecek şekilde TP4'ün sağlıklı hücrelerde oluşturduğu oksidatif stresin daha düşük olmasından dolayı MDA seviyesi kanserli hücrelere göre düşük olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip TP4 peptidinin rekombinant yöntemle üretimi gerçekleştirilmiştir ve rekombinant TP4'ün insan HT-29 hücre hattında güçlü antikanser aktivite gösterdiği ilk kez gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışma rekombinant TP4'ün HT-29 kanserli hücrelerdeki terapötik potansiyelini anlamak için önemlidir. Yapılan tez çalışması rekombinant TP4'ün, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek özellikle geleneksel tedavilerin yeterli apoptotik yanıtı tetikleyemediği durumlarda etkili bir anti-kanser ajanı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. İlerleyen çalışmalarda rekombinant TP4'ün bu apoptotik yolları modüle ettiği ayrıntılı moleküler mekanizmaları açıklamaya ve bunun çeşitli hücre tipleri ve in vivo modellerdeki etkilerini değerlendirmeye odaklanmalıdır. Ek olarak, TP4'ün diğer anti-kanser ajanlarıyla potansiyel sinerjistik etkilerinin araştırılması, yan etkileri en aza indirirken etkinliği artıran kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi için değerli bilgiler sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Antimicrobial Peptide Database. "Classification of Antimicrobial Peptides" <https://aps.unmc.edu>. Son erişim tarihi: 06.04.2023
- Boohaker, R. J., Lee, M.W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M. ve Khaled A. R. (2012) "The Use of Therapeutic Peptides to Target and to Kill Cancer Cells" **Current Medicinal Chemistry**, 19, 3794-3804.
- Brunelle, J.K. and Letai, A. (2009) "Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family." **J Cell Sci.**,122(4),437–41.
- Bulet, P. and Stöcklin, R. (2005) "Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation." **Protein Pept Lett.**, 12,3–11.
- Cao, X. et al. (2015). "Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against Staphylococcus aureus." **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99 (6), 2649–2662.
- Carson, M. et al. (2007) "His-tag impact on structure. Acta Crystallographica Section D" **Structural Biology**, 63(3) 295-301.
- Chahardoli, M., Fazeli, A., Ghabooli, M., (2018) "Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system." **Plant Physiol. Biochem.**, 123, 414–421.
- Chauhan, S. et al. (2021) "Antimicrobial peptides against colorectal cancer-a focused review" **Pharmacological Research.**,
- Chen, X. et al. (2018) "A novel antimicrobial peptide, Ranatuerin-2PLx, showing therapeutic potential in inhibiting proliferation of cancer cells" **Bioscience Reports**, 38.
- Chen, Y., Wu, J.J. and Huang, L. (2010) "Nanoparticles targeted with NGR motif deliver c-myc siRNA and doxorubicin for anticancer therapy." **Mol Ther.**, 18(4),828–34.
- Chen, Z.Y. et al. (2012) "Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats." **Int J Nanomedicine**. 7, 3803–11.
- Cregg, J.M. (2007) "Pichia Protocols Methods in Molecular Biology Series" **Humana Press Inc.**, 389(2), 1-10.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993) "Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris." **Bio/Technol.**, 11, 905– 910.
- Deslouches, B. and Peter Di, Y. (2017) "Antimicrobial Peptides with Selective Antitumor Mechanisms: Prospect for Anticancer Applications." **Oncotarget**, 8(28), 46635-46651.

- Dyshlovoy, S.A. and Honecker, F. (2020) “Marine Compounds and Cancer: Updates 2020” *Marine Drugs*, 18, 643.
- Emelianova, A.A. et al. (2018) “Anticancer Activity of the Goat Antimicrobial Peptide ChMAP-28” *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1501.
- Fahraeus, R. et al. (1998) “Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule.” *Oncogene*, 16(5),587–96.
- Gaspar, D., Veiga, A.S. and Castanho, M.A. (2013) “From antimicrobial to anticancer peptides. A review.” *Front Microbiol.*, 4,294.
- Gross, A., McDonnell, J.M, Korsmeyer, S.J. (1999) “BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.” *Genes Dev.*, 13(15),1899–911.
- Hagenson, M.J. (1991) “Production of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.” *Bioprocess Technol.*, 12, 193-212.
- Hammod, R.M.A., Khalil, M.M.M., Salem, A. (1995) “Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates.” *Clin Chem.*, 41,1315–24.
- Hazam, P.K. and Chen, J.Y. (2020) “Therapeutic utility of the antimicrobial peptide Tilapia Piscidin 4 (TP4)” *Aquaculture Reports*, 17.
- Huang, H.N. et al. (2020) “Dietary supplementation of recombinant tilapia piscidin 4-expressing yeast enhances growth and immune response in Lates calcarifer” *Aquaculture Reports*, 16.
- Hughes, P.E., Caenepeel. S., Wu, L.C. (2016) “Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer.” *Trends Immunol.*, 37(7),462–76.
- Jia, F. et al. (2023) “Optimized Antimicrobial Peptide Jelleine-I Derivative Br-J-I Inhibits *Fusobacterium Nucleatum* to Suppress Colorectal Cancer Progression” *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 1469.
- Kashiwagi, H. et al. (2007) “TAT-Bim induces extensive apoptosis in cancer cells.” *Ann Surg Oncol.*, 14(5),1763–71.
- Karaoğlu, M. (2012) “*Pichia pastoris* Alkol Oksidaz (AOX1 ve AOX2) Genlerinin İnaktif Edilmesi ve Elde Edilen Suşun Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılması” (Yüksek Lisans), *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antalya, 15-19.
- Karaoğlu, M. and Erden-Karaoğlu, F. (2020) “Effect of codon optimization and promoter choice on recombinant endo- polygalacturonase production in *Pichia pastoris*.” *Enzyme and Microbial Technology*, 139, 109589.
- Kiraz, Y. et al. (2016) “Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis” *Tumor Biol.*, 37, 8471–8486.

Kuo, H.M. et al. (2018) "MSP-4, an Antimicrobial Peptide, Induces Apoptosis via Activation of Extrinsic Fas/FasL- and Intrinsic Mitochondria-Mediated Pathways in One Osteosarcoma Cell Line" *marine drugs*, 16,8.

Lau, J.L. and Dunn, M.K. (2018) "Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions" *Bioorg. Med. Chem.*, 26(10), 2700-2707.

Li, F.F. and Brimble, M.A. (2019) "Using chemical synthesis to optimise antimicrobial peptides in the fight against antimicrobial resistance" *Pure Appl. Chem.* 91(2), 181–198.

Li, Y. (2011) "Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review." *Protein Expr Purif.* 80:260-67.

Li, Y. et al. (2012) "Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application" *Peptides*, 37,207–215.

Liang, J.F. and Yang, V.C. (2005) "Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity" *Bioorg Med Chem Lett.*, 15(22),5071–5.

Lien, S. and Lowman, H.B. (2003) "Therapeutic peptides." *Trends Biotechnol.*, 21(12),556–62.

Liu, Y.S., Shepherd, E.G., Nelin, L.D. (2007) "MAPK phosphatases - regulating the immune response." *Nat Rev Immunol.*, 7(3),202–12.

Mahrous, K.F. et al. (2020) "Piscidin 4: Genetic expression and comparative immunolocalization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge using different local bacterial strains" *Developmental & Comparative Immunology*.

Mármol, I. et al. (2016) "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer" *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 197.

Marr, A.K, Gooderham, W.J. and Hancock, R.E.W. (2006) "Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook." *Curr Opin Pharmacol.*, 6(5),468–72.

McGregor, D.P. (2008) "Discovering and improving novel peptide therapeutics" *Curr Opin Pharmacol.*, 8(5),616–9.

Meng, D.M. et al. (2016) "Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide Mytichitin-A in *Pichia pastoris*" *Protein Expr. Purif.*, 127, 35–43.

Mulero, I., Noga, E.J., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A., Mulero. V. (2008). "The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis." *Dev Comp Immunol.*, 32,1531–8.

Neshani, A. et al. (2018) "Extended-Spectrum Antimicrobial Activity of the Low Cost Produced Tilapia Piscidin 4 (TP4) Marine Antimicrobial Peptide" *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 6(5), 327-334.

- Noga, E.J. et al. (2009) "Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides" *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.*, 152, 299–305.
- Peng, K.C. et al. (2012) "Five Different Piscidins from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Analysis of Their Expressions and Biological Functions" *plosone*, 7, 11.
- Ponnusamy, L., Mahalingaiah, P.K. and Singh, K. P. (2016) "Chronic Oxidative Stress Increases Resistance to Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in Renal Carcinoma Cells Potentially Through Epigenetic Mechanism" *Molecular Pharmacology*, 89(1),27–41.
- Portt, L. et al. (2011) "Anti-apoptosis and cell survival: A review" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 238–259.
- Regberg, J., Srimanee, A. and Langel, Ü. (2012) "Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies." *Pharm.*, 5(9),991–1007.
- Saleh, R.O. et al. (2022) "The Anticancer Effect of a Conjugated Antimicrobial Peptide Against Colorectal Cancer (CRC) Cells" *Journal of Gastrointestinal Cancer*.
- Schägger, H. (2006) "Tricine–SDS–PAGE" *Nature Protocols*, 1 (1) 16–22.
- Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A. et al. (2014) "Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+dendritic cells." *PloS One*. 9:e113840.
- Sedlak, J.C. and Yılmaz Ö.H. (2023) "Metabolism and Colorectal Cancer" *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 18,467–92.
- Seyfi, R. et al. (2019) "Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action" *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 1–13.
- Sherr, C.J, Beach, D, Shapiro GI. (2016) "Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy." *Cancer Discov.*, 6(4),353–67.
- Shoombuatong, W., Schaduangrat, N. and Nantasenamat, C. (2018) "Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning" *EXCLI J.*, 17, 734–752.
- Stintzing, S. (2014) "Management of colorectal cancer" *F1000Prime Reports*, 6,108.
- Su, B.C. et al. (2021) "Marine Antimicrobial Peptide TP4 Exerts Anticancer Effects on Human Synovial Sarcoma Cells via Calcium Overload, Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Hyperpolarization" *Mar. Drugs*, 19, 93.
- Su, B.C. et al. (2019) "Antimicrobial Peptide TP4 Induces ROS-Mediated Necrosis by Triggering Mitochondrial Dysfunction in Wild-Type and Mutant p53 Glioblastoma Cells" *Cancers*, 11, 171.

- Sung, H. et al. (2021) “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries” *CA Cancer J Clin.*, 71,209-249.
- Suryadinata, R., Sadowski, M., Sarcevic, B. (2010) “Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates.” *Biosci Rep.*, 30(4),243–55.
- Spriestersbach, A. et al. (2015) “Purification of His-Tagged Proteins” *Methods in Enzymology*, 559, 1-15.
- Tai, H.M. et al. (2021) “Scale-up production of and dietary supplementation with the recombinant antimicrobial peptide tilapia piscidin 4 to improve growth performance in *Gallus gallus domesticus*” *PLOS ONE*, 16(6).
- Ting, C.H. (2016) “Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer” *Oncotarget*, 7, 26.
- Ting, C.H. and Chen, J. Y. (2018) “Nile Tilapia Derived TP4 Shows Broad Cytotoxicity toward to Non-Small-Cell Lung Cancer Cells” *Marine Drugs*, 16, 506.
- Vogl, T. and Glieder A. (2013) “Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production.” *New Biotechnol.*, 30(4), 385-404.
- Wang, L. (2022) “Therapeutic peptides: current applications and future directions” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7,48.
- Xiong, X.B. et al. (2005) “Intracellular delivery of doxorubicin with RGD-modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy: in vitro and in vivo.” *J Pharm Sci.*, 94(8),1782–93.
- Yi, T., Sun, S., Huang, Y., Chen, Y. (2015) “Prokaryotic expression and mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptide A20L using fusion tags.” *BMC Biotechnol.*, 15, 69.
- Zhong, C. et al. (2020) “A Review for Antimicrobial Peptides with Anticancer Properties: Re- purposing of Potential Anticancer Agents” *BIO Integration*, 1(4), 156-167.
- Zorko, M. and Jerala, R. (2010) “Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria.” *Methods Mol Biol.* 618,61-6.