



**ANTİANJİYOGENİK A7R PEPTİDİNİN DİSÜLFİDCE
ZENGİN PEPTİD İSKELELERİNE AŞILANMASI,
SERUM KARARLILIKLARININ VE
BİYOAKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Enis Serhat MEŞE

Kütahya – 2025

T.C.
KÜTAHYA DÜMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**ANTİANJİYOGENİK A7R PEPTİDİNİN DİSÜLFİDCE
ZENGİN PEPTİD İSKELELERİNE AŞILANMASI, SERUM
KARARLILIKLARININ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

Danışman:
Prof. Dr. Muharrem AKCAN

Hazırlayan:
Enis Serhat MEŞE

Kütahya-2025

Kabul ve Onay

KÜTAHYA DUMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Ana bilim dalında, 2021851710004 öğrenci numaralı, Enis Serhat MEŞE'in hazırlamış olduğu “*ANTİANJİYOGENİK A7R PEPTİDİNİN DİSÜLFİDCE ZENGİN PEPTİD İSKELELERİNE AŞILANMASI, SERUM KARARLILIKLARININ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ*” başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili tez savunma sınavı jüri tarafından yapılmış ve adayın tezinin OY BİRLİĞİ ile kabul edilmesine karar verilmiştir.

17/01/2025

Tez Jürisi	İmza	
	Kabul	Red
Prof. Dr. Muharrem AKCAN (Danışman)		
Prof. Dr. Cemil KÜREKÇİ		
Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA		

ONAY

Doç. Dr. Eray ACAR

Enstitü Müdürü

Bilimsel Etik Bildirimi

Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığım “*Antianjiyogenik A7R Peptidinin Disülfidce Zengin Peptid İskelelerine Aşılması, Serum Kararlılıklarının ve Biyoaktivitelerinin İncelenmesi*” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

17/01/2025

Enis Serhat MEŞE

Özgeçmiş

2016 yılında Erdem Bayazıt Anadolu Lisesi'nden mezun olup aynı yılda Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Bölümünde lisans eğitimine başladı. Bir yıl hazırlık ve dört yıl Biyokimya lisans eğitimi aldıktan sonra 2021 yılında mezun oldu. 2022 yılında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında tez çalışması TÜBİTAK Hızlı Destek Projesi (Proje No: 122Z081) kapsamında desteklendi ve tez çalışmasını TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans bursiyeri olarak gerçekleştirdi. Ayrıca 11. Uluslararası İlaç Kimyası Kongresinde kısa sözlü sunum yaptı.



ÖZET

ANTİANJİYOGENİK A7R PEPTİDİNİN DİSÜLFİDCE ZENGİN PEPTİD İSKELELERİNE AŞILANMASI, SERUM KARARLILIKLARININ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

MEŞE, Enis Serhat
Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muharrem AKCAN
Ocak 2025, 76 sayfa

Hedeflerine yüksek seçicilikle bağlanabilmeleri nedeniyle yüksek tedavi potansiyeline sahip olan peptidler, özellikle son yıllarda dikkat çeken ilaç adaylarıdır. Ayrıca düşük toksisite ve düşük immün yanıt peptidleri daha değerli kılmaktadır. Peptidler yüksek terapötik potansiyele sahip olmalarına rağmen, zayıf stabiliteyi nedeniyle ilaç olarak kullanımları sınırlıdır. Ancak günümüze kadar birçok peptid, doğal kökenli peptidlerden esinlenerek geliştirilmiş, stabiliteyi ve biyoaktiviteyi artırılmıştır. Terapötik peptidler, antikanser ve antianjiyogenik aktivite gibi çeşitli biyoaktivitelere sahiptirler. Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenik peptidler, tümör hücrelerinin anjiyogenez sürecini düzenleyen önemli sinyal proteinleriyle etkileşimlerini spesifik olarak inhibe ederek tümör büyümesini ve anjiyogenezini engeller. A7R, faj görüntüleme teknolojisi ile elde edilen tümör büyümesini inhibe eden bir antianjiyogenik peptiddir. Literatürde A7R peptidinin, tümör görüntüleme ve antikanser çalışmaları için ideal bir biyomolekül olduğu bildirilmiştir. Ancak, A7R peptidinin ilaç adayı olamamasının en büyük nedenlerinden biri peptidin stabilitesinin düşük olmasıdır. Bu tez çalışmasında, düşük serum stabilitesine sahip A7R peptidi, stabilitesinin yüksek olduğu bilinen peptid iskelelerine aşılansak serum stabilitesi artırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: A7R, Anjiyogenez, Antianjiyogenik peptidler, Hemolitik aktivite, Koriyoallantoik membran (CAM), Peptid sentezi, Serum stabilitesi

ABSTRACT**GRAFTING OF ANTIANGIOGENIC A7R PEPTIDE ONTO
DISULFIDE-RICH PEPTIDE SCAFFOLDS, INVESTIGATION OF SERUM
STABILITY AND BIOACTIVITY****MEŞE, Enis Serhat****Master Thesis, Department of Biochemistry****Supervisor: Prof. Dr. Muharrem AKCAN****January 2025, 76 pages**

Peptides, which have high therapeutic potential due to their high selectivity to bind to their targets, are drug candidates that have attracted attention especially in recent years. In addition, low toxicity and low immune response make peptides more valuable. Although peptides have high therapeutic potential, their use as drugs is limited due to their poor stability. However, many peptides have been developed to date, inspired by naturally occurring peptides, and their stability and bioactivity have been increased. Therapeutic peptides have various bioactivities such as anticancer and antiangiogenic activity. Angiogenesis is the formation of new blood vessels. Angiogenic peptides prevent tumor growth and angiogenesis by specifically inhibiting the interactions of tumor cells with important signaling proteins that regulate the angiogenesis process. A7R is an antiangiogenic peptide obtained with phage display technology that inhibits tumor growth. It has been reported in the literature that A7R peptide is an ideal biomolecule for tumor imaging and anticancer studies. However, one of the biggest reasons why the A7R peptide cannot be a drug candidate is its low stability. In this thesis study, the A7R peptide with low serum stability was grafted onto peptide scaffolds known to have high stability, thus increasing serum stability.

Keywords: A7R, Angiogenesis, Antiangiogenic peptides, Chorioallantoic membrane (CAM), Hemolytic activity, Peptide synthesis, Serum stability

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, araştırmamın yürütülmesinden tez yazımına kadar bana yol gösteren, karşılaştığım sorunlarda yanına çekinmeden gidebildiğim, zorlukları aşmamda yardımcı olan, samimiyetini her zaman hissettiğim saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Muharrem AKCAN'a,

Teorik çalışmalarımda bana bilgisini esirgemeyen, ayrıca deneysel çalışmalarımda bana yardımcı olan Şeyda KARA'ya ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikiminden daima yararlandığım Nurcan BİÇEN KARAKOÇ ve Serap GÜL'e, ayrıca laboratuvar arkadaşlarım Hazel ŞEN ve Sude GÜRCAN'a,

Q-TOF LC/MS ve UV plaka okuyucu analizleri için Kütahya Dumlupınar Üniversitesi İleri Teknolojiler Tasarım, Araştırma-Geliştirme ve Uygulama Merkezi'ne ve stereo mikroskop kullanımı için Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne,

Yüksek lisans eğitimimde hem çalışmama yaptıkları destekten (TÜBİTAK Hızlı Destek Proje No:122Z081) hem de 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile bana maddi olarak yaptıkları katkılardan dolayı TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda arkamda bulunan, maddi ve manevi her türlüğü desteği veren, bana daima inanan canım babam Temur Mehmet MEŞE ve canım annem Nimet MEŞE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT	v
TABLOLAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
GÖRSELLER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
GİRİŞ	1

BİRİNCİ BÖLÜM PEPTİD YAPILI TERAPÖTİKLER

1.1.PEPTİD YAPILI TERAPÖTİKLER	4
1.2.PEPTİD YAPILI İLAÇLARIN KAYNAKLARI	6
1.3.BİTKİ KAYNAKLI PEPTİDLER.....	7
1.3.1.Tiyoninler.....	7
1.3.2.Bitki Defensinleri	8
1.3.3.Snakinler	9
1.3.4.Hevein Benzeri Peptidler	10
1.3.5.Siklotidler.....	10
1.3.6.SFTI-1	14
1.3.7.Faj Kütüphanesi Tarama Yöntemi ile Elde Edilmiş Peptidler	15

İKİNCİ BÖLÜM KANSER, ANJİYOGENEZ VE ANTİANJİYOGENİK PEPTİDLER

2.1. KANSER, ANJİYOGENEZ VE ANTİANJİYOGENİK PEPTİDLER	19
---	----

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM A7R PEPTİDİ

3.1. A7R PEPTİDİ	23
------------------------	----

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE METOD

4.1.KULLANILAN CİHAZLAR	26
4.1.1. Peptid Sentez Cihazı	27
4.1.2. Ters Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC)	27

4.1.3. Kütle Spektrometresi (MS)	28
4.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	30
4.3. KATI FAZ PEPTİD SENTEZİ	31
4.3.1 Fmoc Katı Faz Peptid Sentezi	31
4.3.2. Reçine ve Koruyucu Yan Grupların Kırılması	32
4.3.3. Reçine Kırma	33
4.3.4 Peptidlerin Halkalaştırılması.....	34
4.3.5. Koruyucu Yan Grupların Uzaklaştırılması.....	34
4.3.6. Peptidlerinin Sistein Köprülerinin Oluşturulması	34
4.4. SERUM STABİLİTESİ ÇALIŞMASI.....	34
4.5. HEMOLİTİK AKTİVİTE.....	35
4.6 KORİYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) MODELİ İLE PEPTİDLERİN	
ANTİANJİYOGENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	35
BEŞİNCİ BÖLÜM	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	
5.1. PEPTİDLERİN SENTEZİ, HALKALAŞTIRILMASI, OKSİDASYONU VE	
SAFLAŞTIRILMASI	38
5.2. PEPTİDLERİN SERUM KARARLILIKLARININ İNCELENMESİ.....	44
5.3. PEPTİDLERİN HEMOLİTİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ.....	45
5.4. PEPTİDLERİN ANTİANJİYOGENİK AKTİVİTELERİNİN	
KORİYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) DENEYİ İLE İNCELENMESİ	
.....	46
KAYNAKÇA.....	51
DİZİN	60

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. 1: FDA'nın Onayladığı Peptid Yapılı İlaçlara Örnekler	5
Tablo 1. 2: Bazı Peptidler ve İzole Edildiği Kaynağı.....	7
Tablo 1. 3: Bitki Defensin Peptidlerine Örnekler, Peptidlerin İzole Edildiği Bitki Türü ve Aktivitesi.....	9
Tablo 1. 4: Faj Görüntüle ile Elde Edilmiş Peptidlere Örnekler	17
Tablo 3. 1: Peptidler ve Aminoasit Sekansları	24
Tablo 4. 1: Kullanılan Cihazlar Tablosu	26
Tablo 4. 2: Kullanılan Kimyasal Maddelerin Tablosu.....	30
Tablo 5. 1: Tez Çalışmasında Sentezlenen Peptidler, Amino Asit Dizilimleri, Molekül Ağırlıkları ve Alıkonma Süreleri.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 1: Küçük Moleküller, Peptidler ve Biyolojik Moleküllerin Özellikleri	4
Şekil 1.2: Peptidlerin aktivitelerini korurken kararlılıklarının arttırılması için uygulanan bazı modifikasyon yöntemleri.....	6
Şekil 1.3: Snakin-1 Peptidinin Üç Boyutlu Molekül Yapısı	9
Şekil 1.4: Hevein Peptidinin Üç Boyutlu Molekül Yapısı.	10
Şekil 1.5: Siklotidlerin Molekül Yapısının Üç Boyutlu Genel Görünümü. Mavi kalın çizgi peptid omurgasını, yeşil çizgiler disülfid köprülerini ve rakamlar da sisteinlerin sekanstaki bulunma sırasını göstermektedir.....	11
Şekil 1.6: Peptid Sınıflarının Üç Boyutlu Yapılarının Gösterimi.	12
Şekil 1.7: SFTI-1'in Üç Boyutlu Yapısının Gösterimi	14
Şekil 1.8: Faj Görüntülemesi ile Bulunmuş Biyoaktiviteye Sahip Düşük Stabilitate Sahip Peptidin Stabilitesi Yüksek Peptid İskelesine Aşılması.....	15
Şekil 1.9: Faj Görüntüleme Tekniğinin Şematik Gösterimi.	16
Şekil 2.1: Kanser Anjiyogenezinin Şematik Gösterimi.	20
Şekil 4.1: Q-TOF LC/MS Cihazı.....	29
Şekil 4.2: Fmoc katı faz sentezinin bir döngüsünün şeması.....	32
Şekil 4.3: Katı Faz Peptid Sentezi, Reçine Kırma, Halkalaştırma, Yan Grup Koruyucu Grupların Uzaklaştırılması ve Sistein Köprülerinin Oluşturulmasının Şematik Gösterimi	33
Şekil 5.1: A7R Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı...39	
Şekil 5.2: A7R-SFTI-1-Hat-1 Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı.....	40
Şekil 5.3: A7R-SFTI-1-Hat-1-T5K Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı.	41
Şekil 5.4: A7R-Kalata B1-Hat-6 Peptidinin RP-HPLC Kromatogramları.	42

Şekil 5.5: A7R-Kalata B1-Hat-6 Peptidinin LC-MS Spektrumu.	43
Şekil 5.6: Peptidlerin İnsan Kan Serumundaki Stabiliteleri.	44
Şekil 5.7: Peptitlerin Hemolitik Aktiviteleri.	46
Şekil 5.8: Damarların Sayımını Gösteren Her Bir Numuneye Ait Temsili Görüntüler.	48
Şekil 5.9: Peptidlerin Antianjiyogenik Aktiviteleri.	49



GÖRSELLER LİSTESİ

Görsel 4. 1: Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı	27
Görsel 4. 2: RP-HPLC Cihazı	28
Görsel 5. 1: Peptidlerin Antianjiyogenik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Bildircin Yumurtalarına İki Örnek.....	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A, Ala	Alanin
T, Thr	Treonin
W, Trp	Triptofan
L, Leu	Lösin
P, Pro	Prolin
R, Arg	Arjinin
G, Gly	Glisin
C, Cys	Sistein
K, Lys	Lizin
S, Ser	Serin
I, Ile	İzolösin
F, Phe	Fenilalanin
P, Pro	Prolin
D, Asp	Aspartik asit
E, Glu	Glutamik asit
V, Val	Valin
N, Asn	Asparajin
Da	Dalton
°C	Derece Selsiyus
mg	Miligram
PDB	Protein Data Bankası
CCK	Siklik sistin düğüm motifi
mL	Mililitre
SPPS	Katı faz peptid sentezi
M	Molar



TEZ METNÍ

GİRİŞ

Kanser, sağlıklı hücrelerin kontrol mekanizmalarını kaybedip bölünüp çoğalmalarına denir. Ağrı, halsizlik, organ fonksiyonlarında bozulma ve bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etkileri kanserin bilinen başlıca sorunlardandır. Özellikle ileri evre kanser hastalarında şiddetli ağrı yaygındır ve bu durum hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde olumsuz etkiler. Ayrıca, kanser tedavisi sırasında uygulanan kemoterapi ve radyoterapi tedavileri yoğun yorgunluk ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi yan etkilere yol açmaktadır (Ripamonti, Bandieri ve Roila, 2011). Bu durum, hastaların enfeksiyonlara karşı daha savunmasız hale gelmesine neden olabilmektedir (Fouad ve Aanei, 2017). Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre her yıl 20 milyon insanın kansere yakalandığı ve 10 milyon insanın kanser kaynaklı nedenlerden dolayı öldüğü rapor edilmektedir (Bray ve diğerleri, 2024). Bu sebeple kanser hastalığı için yeni terapötikler ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bu yenilikçi tedavi yöntemlerinden biri de anjiyogenezin baskılanmasıdır. Kanser ileri safhalarında kanserli hücreler kümeleşerek tümör olarak isimlendirilen katı doku kütleleri oluşturabilir. Kanserli dokular ihtiyaçları olan enerjiyi elde edebilmek için anjiyogenez ile yeni kan damarları oluşturur. Anjiyogenezi engellemek tümörlü dokunun büyümesini engelleyerek kanserin ilerlemesini önler. Ancak, piyasada bulunan antianjiyogenik ilaçların yetersizliğinden dolayı anjiyogenezin önlenmesi için yeni terapötiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anjiyogenez var olan kan damarlarından endotel hücre göçü ve proliferasyonu ile yeni kan damarlarının oluşmasıdır ve tümör büyümesi için önemlidir. Anjiyogenezin engellenmesi tümörün büyümesini engeller, bu sebeple kanser tedavisi için önemli bir hedeftir. Bu bağlamda antianjiyogenik peptidler anjiyogenezin hedeflenmesinde umut olabilirler. Peptidler amino asitlerin peptid bağı ile bir araya gelmesi sonucu oluşan 500-5000 Dalton (Da) arasında molekül ağırlığına sahip biyomoleküllerdir. Hedeflerine yüksek seçicilik ile bağlanabilmeleri ve küçük molekül yapılı ilaçlar ile mukayese edildiğinde düşük toksisiteye sahip olmaları peptidleri kanser tedavisinde umut vaat eden önemli ilaç aday molekülleri yapmaktadır. Fakat peptidlerin düşük serum stabiliteleri başta olmak üzere ilaç adayı olmalarının önünde bazı dezavantajları vardır. Peptid molekülleri üzerinde halkalaştırma, aşılama, çeşitli aminoasitlerin eklenmesi veya

ıkarılması, peptid sekansının D-aminoasitler ile sentezlenmesi ve doğal olmayan aminoasitlerin kullanılması gibi çeşitli stratejiler ile terapötik etkinin korunduğu ve dezavantajların giderildiği yeni peptid analoglarının tasarımı mümkündür.

A7R, faj görüntüleme kütüphanesi ile tanımlanmış yedi amino asit kalıntısından (ATWLPPR) oluşan ve vasküler endotel büyüme faktörü-165'in (VEGF₁₆₅) anjiyogenezi tetikleyen reseptörlere bağlanmasını engelleyen antianjiyogenik bir peptiddir. A7R peptidi *in vivo* meme kanseri anjiyogenezi kısıtlamıştır. Bu tez çalışmasında A7R peptidinin düşük stabilitesini gidermek üzere peptidin yüksek stabiliteye sahip halka yapılı peptidlere aşılması çalışıldı. A7R ve aşılınmış peptidler katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlendi ve ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile saflaştırıldı. Sentezlenen peptidlerin antianjiyogenik aktivitesi, hemolitik aktivitesi ve serum stabilitesi incelendi.

Bu tezin ilk bölümünde peptid yapılı terapötiklerden, FDA tarafından onaylanmış peptid yapılı ilaçlardan, peptidler üzerine uygulanan modifikasyon yöntemlerinden ve peptid kaynaklarından; ikinci bölümde kanser, anjiyogenezi ve antianjiyogenik peptidlerden, tümörlü dokunun anjiyogenezi kullanarak nasıl yeni kan damarları oluşturduğundan; üçüncü bölümde A7R peptidinin özelliklerinden, literatürde A7R peptidi ile yapılmış çalışmalardan; dördüncü bölümde tez kapsamında kullanılan materyal ve metotlardan ve son bölümde ise sonuçlar ve tartışmalardan bahsedilmektedir.



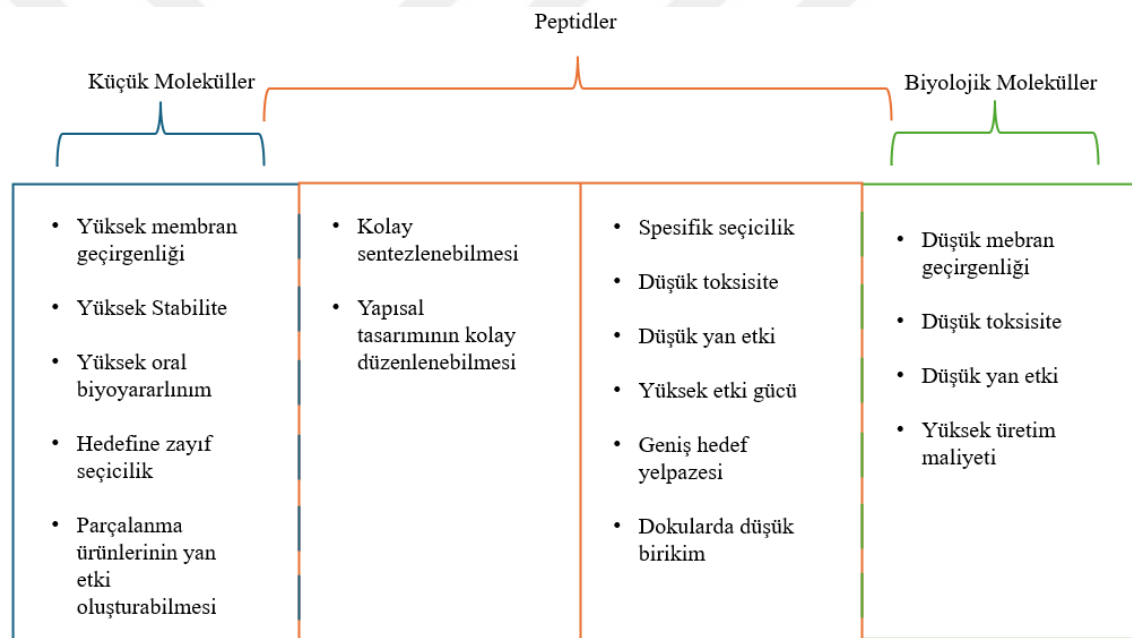
BİRİNCİ BÖLÜM

PEPTİD YAPILI TERAPÖTİKLER

1.1. PEPTİD YAPILI TERAPÖTİKLER

Peptidler, peptid bağları ile birbirine bağlanan kısa aminoasit zincirleridir. Peptidlerin uzunluğu birkaç amino asitten 50 amino asite kadar değişebilir. 50 amino asidi aşan zincirler ise proteinler olarak adlandırılırlar. Peptidler, küçük yapıli moleküller ile büyük yapıli biyolojikler arasında olan moleküller olarak kabul edilirler ve **Şekil 1.1**'de görüldüğü üzere bu iki molekül grubunun önemli özelliklerini taşırlar. Hedeflerine spesifik bağlanma, düşük toksisite, kolay tasarım ve sentezlenebilmeleri gibi önemli özellikleri ile gelecek vaat eden biyomoleküllerdir (Craik, Fairlie, Liras ve Price, 2013).

Şekil 1 1: Küçük Moleküller, Peptidler ve Biyolojik Moleküllerin Özellikleri



Katı faz peptid sentezinin (Merrifield, 1963) geliştirilmesi ile yeni sentetik peptidlerin sentezlenmesi mümkün oldu ve peptidler birçok alanda aktif olarak kullanılmaya başlandı. Başta diyabet olmak üzere enfeksiyon hastalıkları, kronik ağrı ve kanser gibi önemli hastalıkların tedavisinde peptid yapıli ilaçlar kullanılmaktadır (Gao, Yao ve Yan, 2021; Heo, 2023; Jacob ve James, 2004.; Pratley ve diğerleri, 2014). Peptidler, protein-protein etkileşimlerini kullanarak hedef protein veya reseptöre spesifik olarak bağlanabilmeleriyle ve aynı zamanda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından birçok peptid ilacın onaylanması ile son yıllarda ilaç sektöründe önemli bir

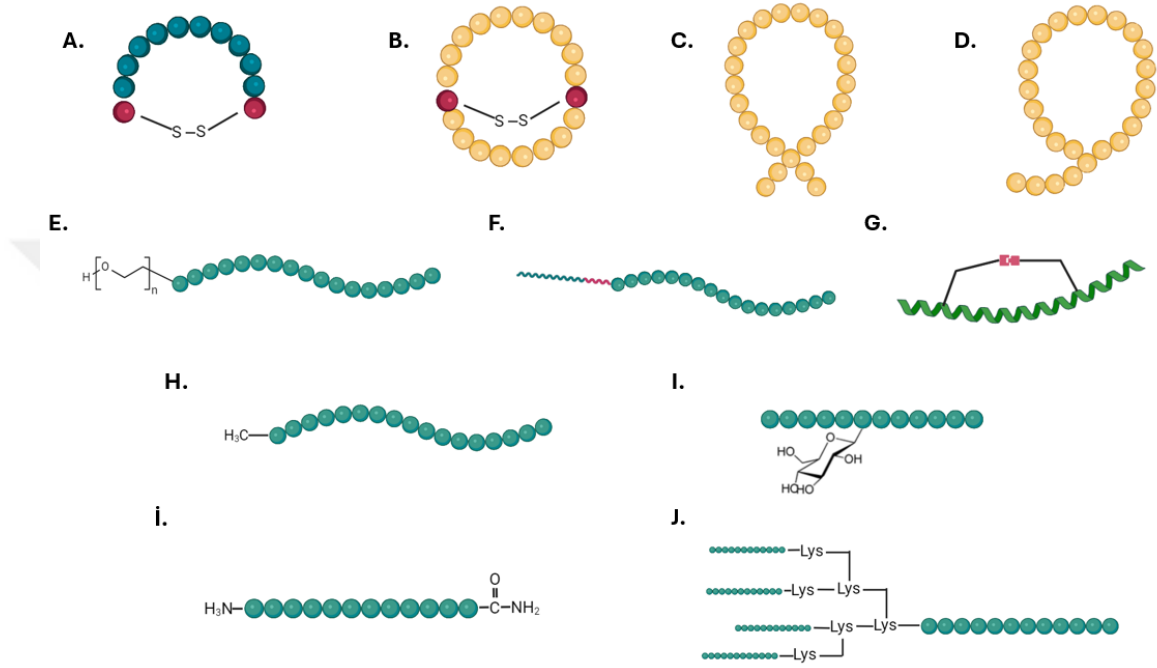
pazar haline gelmişlerdir (Erak, Bellmann-Sickert, Els-Heindl ve Beck-Sickinger, 2018). FDA tarafından onaylanmış bazı peptid yapılı ilaçlar aşağıdaki **Tablo 1.1**'de verilmiştir.

Tablo 1. 1: FDA'nın Onayladığı Peptid Yapılı İlaçlara Örnekler

Peptid	Market İsmi	Etki Mekanizması	Hedef	Referans
Ziconotide	Prialt®	Ca 2.2 kanal antagonisti	Kronik Ağrı	(Shuai Gao vd, 2021)
Semaglutide	Novo Nordisk®	GLP-1 reseptör agonistleri	Tip 2 Diyabet	(Davies ve diğerleri, 2021)
Liraglutide	Novo Nordisk®	GLP-1 reseptör agonistleri	Tip 2 Diyabet	(Pratley ve diğerleri, 2014)
Flotufolastat F18	Posluma	Prostat kanseri tanısı konmuş erkeklerde PET PSMA-pozitif lezyonları saptamak için kullanılan bir tanı yöntemi	Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA)	(Young-A Heo, 2023)
Bacitracin	Baciguent	Bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe eder	Yara enfeksiyonları	(Sharon E vd, 2004)
Captopril	Capoten®	Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü	Hipertansiyon, Kalp yetmezliği	(Greg L vd, 1995)
Depreotide	Neotect	Sintigrafik görüntüleme	Somatostatin reseptörü	(Yusuf Menda and Daniel Kahn, 2002)
Insulin	Humulin R	İnsülin reseptör agonisti	Tip 1 ve 2 diyabet	(Jieling Chen vd, 2022)
Exenatide	Byetta® Bydureon®	Glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonisti	Tip 2 diyabet	(Michael A. Nauck vd, 2020)

Terapötik peptidlerin ilaç olarak kullanımı her geçen gün yaygınlaşsa da peptidlerin ilaç olarak kullanımını sınırlayan bazı engeller vardır. Bu engeller zayıf metabolik stabiliteleri, oral biyoyararlanımlarının sınırlı olması, zayıf membran geçirgenliği gibi sebepler olabilir (Craik ve diğerleri, 2013). Bu dezavantajların giderilmesi için peptidler üzerinde **Şekil 1.2**'de verilen çeşitli modifikasyonlar uygulanabilmektedir.

Şekil 1.2: Peptidlerin aktiviteleri korunurken kararlılıklarının artırılması için uygulanan bazı modifikasyon yöntemleri. A. Disülfid bağı ile halkalaştırma B. N-C uçlarından halkalaştırma C. Yan zincirden yan zincire halkalaştırma D. C-ucu ile yan zincir halkalaştırması E. PEGilasyon F. Lipidasyon G. Zımbalama yöntemi H. N-Metilasyon I. Glikolizasyon J. Amidasyon K. Dendimer yöntemi



Peptidler bu dezavantajların giderilmeye başlanması ile ilaç pazarında yer edinmiş ve günümüzde pazarın %6'lık bir kısmını kapsamaktadırlar. Ayrıca, onaylanan ve faz aşamasındaki ilaçların sayısındaki artış ile pazardaki paylarını her geçen gün arttırmaktadırlar (Sharma, Sharma, Sharma ve Jain, 2023).

1.2. PEPTİD YAPILI İLAÇLARIN KAYNAKLARI

Peptidlerin kimyasal sentezi Bruce Merrifield'in katı faz peptid sentezi yöntemini geliştirmesi ile daha kolay ve kısa sürede gerçekleşmesi mümkün hâle gelmiştir (Merrifield, 1963). Terapötik peptidler sentetik olarak sentezlenmelerinin yanı sıra çeşitli kaynaklardan da elde edilebilir. Bunlar bitkiler, hayvanlar, mantarlar gibi doğal kaynaklardan direkt olarak izole edilmeleri şeklinde olabileceği gibi faj görüntüleme ve mRNA görüntüleme gibi teknolojiler kullanılarak da mümkündür. **Tablo 1.2'**de bazı peptid kaynakları ve bunlardan elde edilen peptidler verilmiştir.

Tablo 1. 2: Bazı Peptidler ve İzole Edildiği Kaynağı

Peptid ismi	Kaynağı	Kaynak
Sikloviolasin	<i>Viola odorata</i> /Menekşe bitkisi	(Gerlach ve diğerleri, 2010)
Kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i> /Kök boyası bitkisi	(Gran, Sandberg ve Sletten, 2000)
Melittin	<i>Apis mellifera</i> /Bal arısı	(Son ve diğerleri, 2006)
Temporin	<i>Rana erythraea</i> /Kurbağa	(Simmaco ve diğerleri, 1990)
Klorotoksin	<i>Leiurus quinquestriatus</i> Akrep	(Dardevet ve diğerleri, 2015)
MVIA	<i>Conus magus</i> /Koni salyangozu	(Olivera ve diğerleri, 1985)
Akremolid A	<i>Acremonium sp.</i> /Deniz mantarı	(Ratnayake, Fremlin, Lacey, Gill ve Capon, 2008)

Yukarıdaki tabloda görüldüğü üzere peptidlerin çeşitli kaynakları vardır. Bu tez çalışmasında bitki ve faj görüntüleme ile elde edilmiş peptidler çalışılmıştır.

1.3. BİTKİ KAYNAKLI PEPTİDLER

Bitkiler, çevresinde bulunan tehditlere karşı çeşitli savunma kimyasalları üretirler. Bu savunma kimyasallarının bazıları peptid yapılıdır. Tiyoninler, defensinler, snakinler, hevein benzeri peptidler ve siklotidler bitkiler tarafından üretilen savunma peptidleri sınıflarıdır.

1.3.1. Tiyoninler

Tiyoninler sistein, arjinin ve lizin kalıntıları içeren sekanslara sahip kısa zincirli antimikrobiyal peptidlerdir (Mazurkiewicz-Pisarek, Baran ve Ciach, 2023). İlk olarak 1942 yılında arpa ve buğdaydan izole edilen tiyoninler, yapılarında üç veya dört disülfid köprüsü bulundurulur. Arpa yaprağı, ökse otu, konbaş ve sandal ağacı gibi türlerden de elde edildikleri rapor edilmiştir. Genellikle bazik karakterlidirler ve beş sınıfa ayrılırlar. İki antiparalel α -sarmal ve bir antiparalel β -tabakadan oluşan yapıları ile bakteri ve

mantarlara karşı toksiktirler (García-Olmedo, Molina, Alamillo ve Rodriguez-Palenzuela, 1998).

1.3.2. Bitki Defensinleri

Bitki defensinleri 45 ila 54 amino asit uzunluğunda ve katyonik yapıdadırlar. Bitkinin kök, gövde, yaprak, tohum gibi farklı kısımlarında bulunabilirler. Defensinler, genelde patojenler ile ilk karşılaşılın epiderm kısımlarındaki hücrelerde bulunur (Lay ve Anderson, 2005). Bitki defensinlerinin büyük bir çoğunluğunda dört adet sistein köprüsü vardır. Bu köprüler Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 ve Cys4-Cys7 arasında olup bu yapı tüm defensinler için korunmuştur. Yapı içerisinde Cys'ler dışında korunmuş bazı amino asitler de vardır. Bunlar Cys1 ile Cys2 arasında bulunan Gly kalıntısı ve Cys4 ile Cys5 arasında bulunan Glu ile Gly kalıntılarıdır (Kovaleva, Bukhteeva, Kit ve Nesmelova, 2020).

Bitki defensinleri ilk olarak Terras ve grubu tarafından Rs-AFP1 ve RsAFP2 peptidlerinin turp tohumundan izole edilmesi ile keşfedildi. Buldukları peptidlerin üç boyutlu yapılarının incelenmesi ile peptidlerin tiyoninlerden çok memeli defensinlerine benzediklerini ortaya çıkarmışlardır (Broekaert, Terras, Cammue ve Osborn, 1995).

Bitki defensinleri mantar türlerinin çoğuna, gram negatif ve gram pozitif bakterilere büyüme engelleyici etkiler gösterirler (Broekaert ve diğerleri, 1997; Segura, Moreno, Molina ve García-Olmedo, 1998). Defensinlerin bazıları sindirim enzimlerine karşı etkilidirler. (Wijaya, Neumann, Condron, Hughes ve Polya, 2000). Aşağıdaki **Tablo 1.3**'te bitki defensin peptidlerine örnekler verilmiştir.

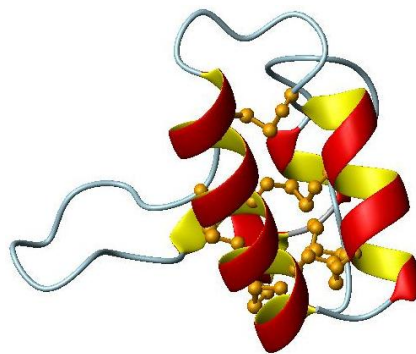
Tablo 1. 3: Bitki Defensin Peptidlerine Örnekler, Peptidlerin İzole Edildiği Bitki Türü ve Aktivitesi

Peptid İsmi	Bulunduğu Bitki	Aktivite	Referans
PaDef	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Antimikrobiyal	(Guzmán-Rodríguez ve diğerleri, 2013)
Rs-AFP1	<i>Raphanus sativus</i>	Antifungal	(Terras ve diğerleri, 1992)
IbHypSys	<i>Ipomoea batatas</i>	Enzim inhibitörü	(Chen, Siems, Pearce ve Ryan, 2008)
Koksinin	<i>Phaseolus coccineus</i>	Antiviral	(Oard, Rush ve Oard, 2004)
BrD1	<i>Brassica rapa</i>	Böcek öldürücü	(Choi ve diğerleri, 2009)

1.3.3. Snakinler

Snakinler 12 adet sistein kalıntısı içeren 63-66 amino asit uzunluğunda peptidlerdir (Tam, Wang, Wong ve Tan, 2015). İki α -sarmal yapı arasında Cys1-Cys9, Cys2-Cys7, Cys3-Cys4, Cys5-Cys11, Cys6-Cys12 ve Cys8-Cys10 disülfid köprüleri vardır (Porto ve Franco, 2013). Pozitif yüklü, yaklaşık 7 kDa ağırlığında olan bu peptidler antibakteriyel ve antifungal özellikler taşırlar (Oliveira-Lima ve diğerleri, 2017). Aşağıdaki **Şekil 1.3**'te gösterilen peptid yapısı *Solanum tuberosum*'dan izole edilmiş ilk snakin peptididir. Sekansı yılan zehrinde bulunan bazı peptidler ile homoloji gösterdiği için bu ismi almıştır (Segura, Moreno, Madueño, Molina ve García-Olmedo, 1999).

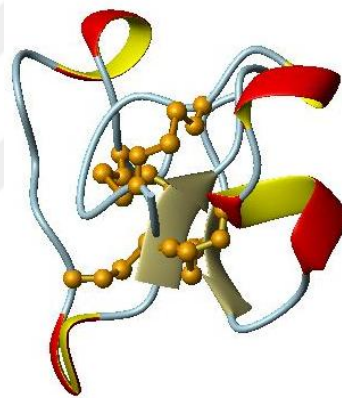
Şekil 1.3: Snakin-1 Peptidinin Üç Boyutlu Molekül Yapısı. Üç boyutlu molekül yapısı (PDB: 5E5Q) MOLMOL ile hazırlanmıştır (Koradi, Billeter ve Wüthrich, 1996).



1.3.4. Hevein Benzeri Peptidler

Hevein benzeri peptidler ilk olarak *Hevea brasiliensis*'in lateksinden izole edilmiştir. Bu peptid sınıfı ismini ilk olarak izole edildikleri *Hevea brasiliensis*'den alır. Güçlü antifungal aktivite gösterirler (Archer, 1960). Hevein benzeri peptidler 29-45 amino asitten oluşan peptidlerdir (**Şekil 1.4**). Genelde dört disülfid köprüsü içeren bu peptid sınıfının üç ve beş disülfid köprüsü içeren peptidleri de vardır. Gly bakımından zengin olan bu peptid sınıfı, SXFGY ya da SXYGY (X yerine herhangi bir amino asit gelebilir) özel kitin bağlama bölgesi içerir (Beintema, 1994).

Şekil 1.4: Hevein Peptidinin Üç Boyutlu Molekül Yapısı. Üç boyutlu molekül yapısı (PDB: 1HEV) MOLMOL ile hazırlanmıştır (Koradi, Billeter ve Wüthrich, 1996).

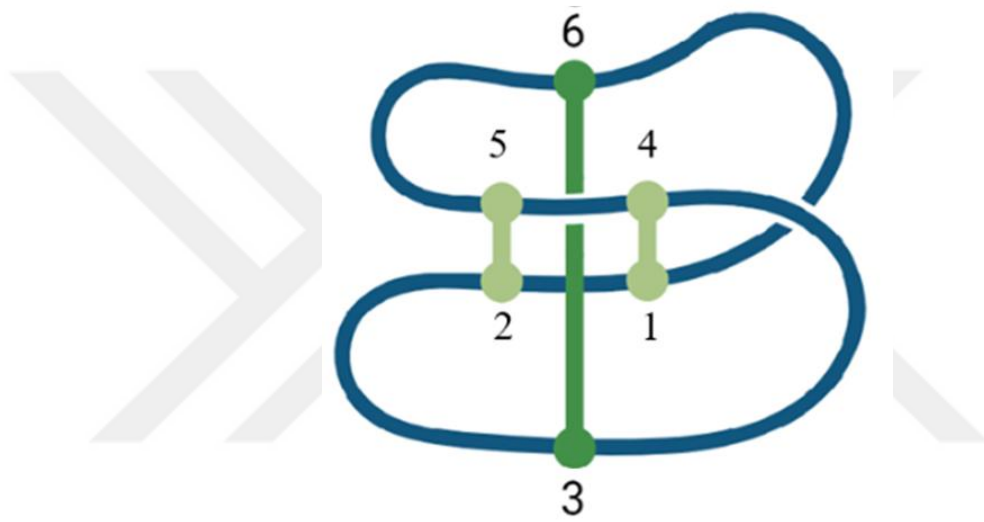


1.3.5. Siklotidler

İlk olarak 1973 yılında Lorents Gran tarafından kalata kalata'nın uterotonik aktivitesinin araştırılması ve 1995 yılında Olav Saether ve arkadaşları tarafından kalata B1'in yapısının aydınlatılması ile literatüre giren siklotidler bitkilerde bulunan N- ve C-ucundan halkalaşmış ve üç adet disülfid köprüsü içeren peptidlerdir (Gran, 1973; Saether ve diğerleri, 1995). Siklotid veri bankası olan Cybase'de listelenmiş 1362 adet siklotid bulunmaktadır (Mulvenna, Wang ve Craik, 2006; Wang, Kaas, Chiche ve Craik, 2008). Rubiaceae, fabaceae, violaceae, cucurbitaceae, solanaceae gibi bitki ailelerinden izole edilen ve üç boyutlu yapılarının sahip olduğu siklik sistin düğüm motifi (CCK) sayesinde

muazzam bir stabiliteye sahip olan siklotidler üç disülfid köprüsü içerirler ve yaklaşık otuz amino asit kalıntısına sahiptirler (**Şekil 1.5**) (Craik, Cemazar, Wang ve Daly, 2006). CCK motifi, Cys1-Cys4 ve Cys2-Cys5 disülfid köprülerinin bir halka oluşturması, 3. disülfid köprüsü Cys3-Cys6'nın ise bu halkanın ortasından geçmesi ile oluşan molekül içi bir yapıdır.

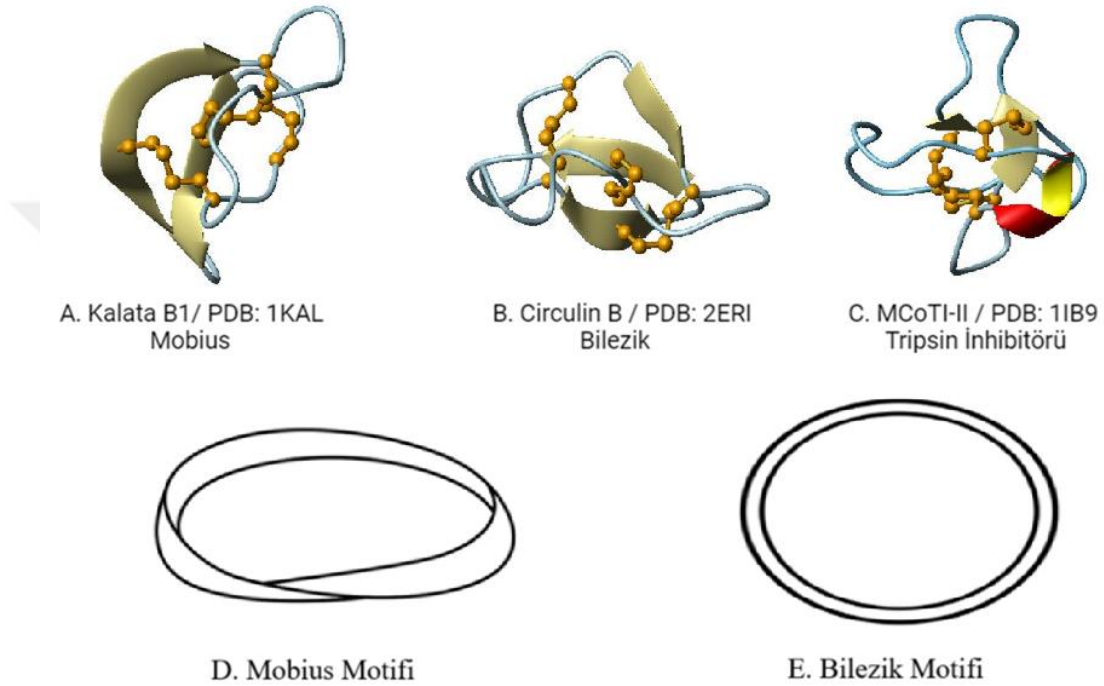
Şekil 1.5: Siklotidlerin Molekül Yapılarının Üç Boyutlu Genel Görünümü. Mavi kalın çizgi peptid omurgasını, yeşil çizgiler disülfid köprülerini ve rakamlar da sisteinlerin sekanstaki bulunma sırasını göstermektedir. (Bu şekil Biorender kullanılarak hazırlandı).



Siklotidler, mobius, bilezik ve tripsin inhibitörleri olmak üzere üç alt sınıftan oluşurlar. Mobius ve bilezik sınıfları arasındaki en temel fark 5. hatta bulunan prolin kalıntısıdır. Mobius sınıfı siklotidlerde bulunan *cis*-Pro, peptid omurgasında 180°'lik bir dönüş meydana getirir. Bu dönüş mobius sınıfı siklotidlerin peptid omurgasında bir bükülmeye yol açar ve bu siklotid sınıfına ismini veren mobius şeklini alır. Bilezik sınıfı siklotidlerde ise 5. hatta *cis*-Pro bağı yoktur. Tripsin inhibitörü sınıfından olan siklotidler ise siklik sistin düğüm motifi dışında herhangi bir dizi homolojisi bulundurmamaktadır (Craik ve diğerleri, 2006). Aşağıdaki **Şekil 1.6**'da bu üç sınıfa ait örnek peptid yapıları verilmiştir.

Şekil 1.6: Peptid Sınıflarının Üç Boyutlu Yapılarının Gösterimi.

A. Kalata B1 (Mobius) B. Circulin B (Bilezik) C. MCoTI-II (Tripsin İnhibitörü) D. Mobius Motifi E. Bilezik Motifi. Üç boyutlu yapıların gösterimi MOLMOL ile hazırlanmıştır (Koradi, Billeter ve Wüthrich, 1996).



1.3.5.1. Siklotidlerin Biyolojik Aktiviteleri

Siklotidler, üç boyutlu yapılarının kazandırdığı yüksek stabilitenin yanında uterotonik, hemolitik, insektisidal, anti-mikrobiyal, antitümör, tripsin inhibitörü aktivitesi gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler (Craik ve diğerleri, 2006). Siklotidlerin aktivitelerinin araştırılması ilk olarak bu peptidlerin keşfi ile başlamış olup, Gran ve ekibi tarafından yapılan çalışmada *O. affinis* bitkisinin uterotonik etkileri araştırılmıştır (Gran, 1973).

James ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada sentezledikleri sirkulin A peptidinin *Staphylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor ettiler (Tam, Lu, Yang ve Chiu, 1999). Farklı bir çalışmada ise Giang ve arkadaşları kliotid T1

peptidinin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkisini rapor ettiler (Nguyen ve diğerleri, 2011).

Manuel Rey ve arkadaşları *O. affinis* ve *V. odorata* bitkilerinin ekstraktları ve bu bitkilerden izole ettikleri kalata B2 peptidinin *Pomacea canaliculata* yumuşakça türü üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve peptidin *P. canaliculata* türü üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Plan, Saska, Cagauan ve Craik, 2008). Michelle ve arkadaşlarının 2011’de yaptıkları bir çalışmada *Palicourea rigida*’dan Parigidin-br1 peptidini izole edip şeker kamışına zarar veren *Diatraea saccharalis* türü üzerindeki insektisidal etkilerini araştırmışlar ve peptidin tür üzerinde insektisidal özellikler gösterdiğini rapor etmişlerdir (Pinto ve diğerleri, 2012).

2018 yılında Blazej Slazak ve arkadaşları *V. Odorata* türünden izole ettikleri sikloviolasin O2 ve sikloviolasin O3 peptidlerinin antifungal özelliklerini araştırmış ve bu peptidlerin *Fusarium oxysporum* ve *Alternaria alternata* türleri üzerinde antifungal aktivite gösterdiklerini raporlamışlardır (Slazak ve diğerleri, 2018).

1.3.5.2. Siklotidlere Biyoaktif Peptidlerin Aşılınması

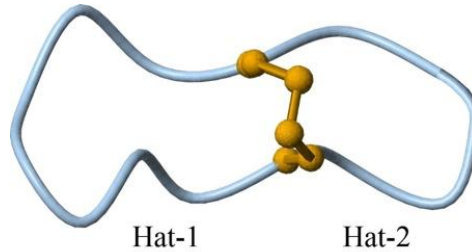
Katı-faz peptid sentezinin geliştirilmesi ile yeni peptidlerin keşfi ve aktivite çalışmalarının yanında peptidlerin ilaç molekülleri olabilmesini engelleyen dezavantajların ortadan kaldırılması için peptidler üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılmaya başlandı. Bunlardan biri de biyoaktif ama stabilitesi düşük peptidlerin stabilitesi yüksek olan peptid iskelelerine aşılınmasıdır.

Faj ve mRNA görüntüleme teknolojileri ile küçük, biyoaktiviteye sahip peptidlerin keşfi hız kazanmıştır. Bu moleküller hedeflerine karşı yüksek seçicilik gösterebilir de genelde düşük serum stabilitesi ve düşük biyoyararlanıma sahiptirler. Bu yüzden terapötik potansiyelleri sınırlıdır. Bu problemi aşabilmek için peptidler, istenilen yüksek serum stabilitesine ve yüksek biyoyararlanıma sahip sistince zengin peptid iskelelerine aşılınarak hem biyoaktif hem de yüksek stabilite ve biyoyararlanım gösteren peptidler üretmek mümkün hâle gelmiştir. Aşılınmak istenilen epitop her zaman görüntüleme kütüphaneleri ile elde edilmiş peptidler olmayabilir. Epitoplar büyük bir peptidin aktif kısmı veya tamamen sentetik bir fragment de olabilir.

1.3.6. SFTI-1

SFTI-1 peptidi 14 amino asit kalıntısından oluşan güçlü bir tripsin inhibitörüdür. Molekül, iki antiparalel β -tabakadan oluşan halka yapıya ve bir adet disülfid bağına sahiptir (Cys3-Cys11) (Luckett ve diğerleri, 1999). SFTI-1 peptidi ayrıca iki antiparalel β -tabakası arasında bolca hidrojen bağı içerir. Bu durum yapının yüksek stabilitesini destekler. SFTI-1 peptidinin disülfid köprüsü molekül üzerinde iki hat oluşturur. Birinci hat dokuz amino asit kalıntısından oluşan işlevsel tripsin inhibitör hattı, ikinci hat ise beş amino asit kalıntısından oluşan halkalaşma hattı olarak isimlendirilir (Qiu ve diğerleri, 2017). SFTI-1'in tripsin inhibitör hattı Bowman-Birk inhibitörleri (BBI) gibi diğer tripsin inhibitörleri ile benzerlik gösterir. SFTI-1 peptidinin birinci hattında bulunan lizin amino asidi yan grubu, peptidin tripsin enzimi ile etkileşimini sağlamada önemli bir rol oynar (Luckett ve diğerleri, 1999). Aşağıdaki **Şekil 1.7'**de peptidin üç boyutlu molekül yapısı gösterilmektedir.

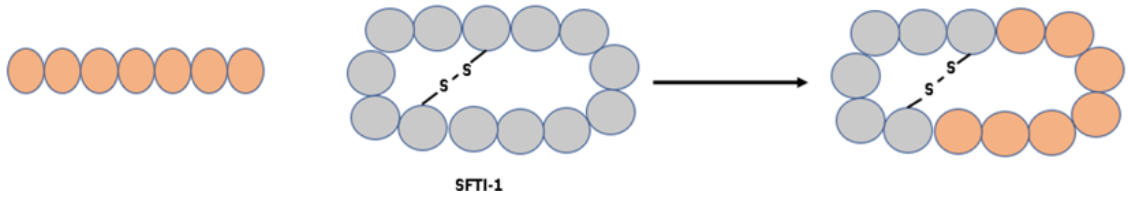
Şekil 1.7: SFTI-1'in Üç Boyutlu Yapısının Gösterimi. Üç boyutlu molekül yapısının (PDB kodu: 1JBL) gösterimi MOLMOL ile hazırlanmıştır (Koradi, Billeter ve Wüthrich, 1996).



SFTI-1 peptidi halka yapısı, disülfid köprüsü ve beta tabakalarının arasındaki hidrojen bağları sayesinde termal ve enzimatik bozunmalara karşı oldukça dirençlidir (Daly, Gustafson ve Craik, 2004). Bu nedenle, SFTI-1 peptidi birçok çalışmada farklı peptid epitoplarının peptid iskelelerine aşılması amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmaların amacı lineer biyoaktif peptid epitoplarının yüksek stabiliteye sahip olmalarını sağlamaktır. Örneğin 2009 yılında rapor edilen bir çalışmada SFTI-1 peptidine FVQR sekansı aşıl原因 olarak prostat kanseri ile ilişkili peptidaz 4'ün (KLK4) hedeflenmesi çalışılmış ve tasarlanan peptidin KLK4'ü inhibe ettiği rapor edilmiştir (Swedberg ve diğerleri, 2009). Bir diğer çalışmada ise, yedi amino asit kalıntısından oluşan

antianjiyogenik bir peptid (GVITRIR), SFTI-1 iskelesine aşılansak insan endotel hücrelerine karşı toksik olmayan ve stabil bir antianjiyogenik peptid elde edilmiştir (Chan, Craik ve Daly, 2015). **Şekil 1.8**'de GVITRIR peptidinin SFTI-1 peptid iskelesine aşılması şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 1.8: GVITRIR Peptidinin Stabilesi Yüksek SFTI-1 Peptid İskelesine Aşılması.



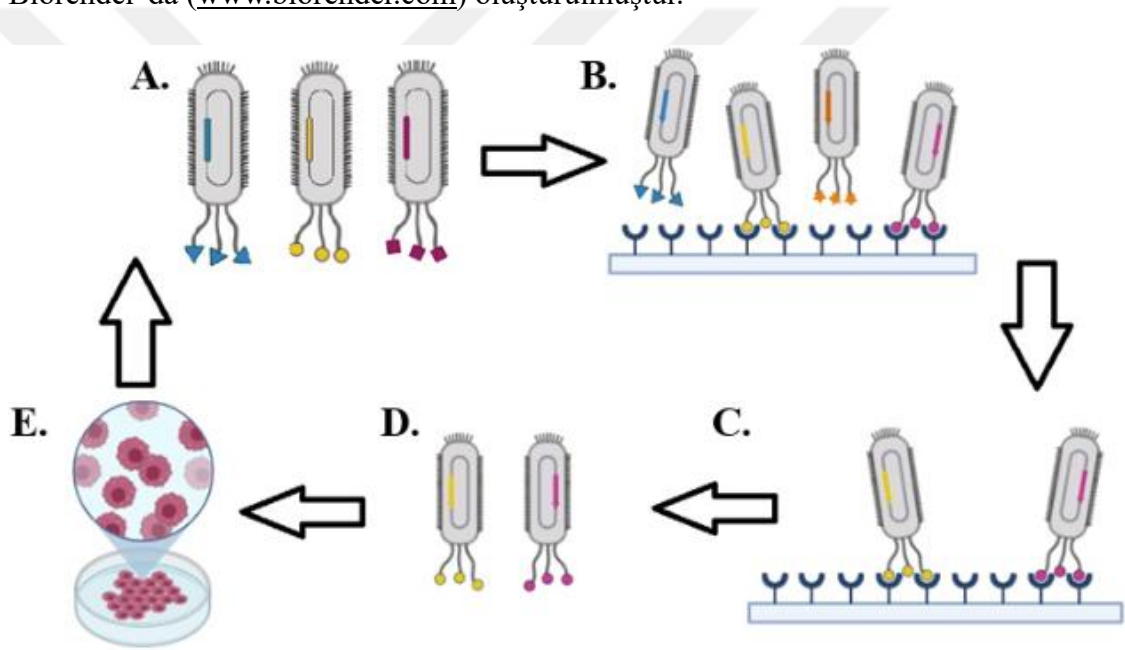
Farklı bir çalışmada, bradikinin reseptör antagonisti olan KRPPGFSPL sekansına sahip DALK peptidi SFTI-1 peptid omurgası üzerine aşılansak, epitop serum proteazlarına karşı korunmuş ve molekülün serum stabilesi altı saatin üzerine çıkmıştır (Muratspahić ve diğerleri, 2021). 2017 yılındaki bir çalışmada ise Kathepsin G bölünme dizileri SFTI-1 iskelesine aşılandı ve yeni Kathepsin G inhibitörleri sentezlendi (Swedberg, Li, De Veer, Wang ve Craik, 2017).

1.3.7. Faj Kütüphanesi Tarama Yöntemi ile Elde Edilmiş Peptidler

Faj görüntüleme, peptid kütüphaneleri oluşturmak için bakterileri enfekte eden bakteriyofajların kullanımını içeren bir tekniktir ve ilk olarak George Smith tarafından geliştirilmiştir. (Azzazy ve Highsmith, 2002; Smith, 1985). Bu teknik ile istenilen hedef (reseptör, protein, molekül) için afinite gösteren peptidlerden oluşan bir peptid kütüphanesi oluşturulabilir (Burton, 1995). Fajların DNA'ları çalışılmak istenilen hedefe göre düzenlenilebildiği için bu teknik özellikle kanser araştırmalarında yeni terapötiklerin keşfi için önemli bir yere sahiptir (Arun Chandra Manivannan Ranjithkumar Dhandapani ve Saravanan, 2022). **Şekil 1.9**'da faj görüntüleme tekniği şematik olarak gösterilmiştir. Faj görüntüleme beş ana basamaktan oluşmaktadır. İlk adımda uygun faj türü belirlenir. Daha sonra hedeflemek istenilen reseptör veya molekül immobilize edilir ve fajlar ile muamele edilir. Bu aşamadan sonra istenilen hedefe afinite göstermeyen fajlar yıkanarak uzaklaştırılır. İmmobilize edilmiş hedefe afinite gösteren

fajlar asit veya yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltileri ile hedeften ayrılır ve bakteriler bu fajlar ile enfekte edilir. Bu döngü üç dört kez tekrar edilerek istenilen hedefe afinite gösteren fajların sayısı arttırılır (Pung, Tye, Leow, Ng ve Lai, 2023). Son olarak görüntülenen fajlardaki peptidlerin sekansları belirlenir (Chang ve diğerleri, 2023). **Tablo 1.4**'de faj görüntüleme ile elde edilmiş peptidlere örnekler verilmiştir.

Şekil 1.9: Faj Görüntüleme Tekniğinin Şematik Gösterimi. A. Faj kütüphanesinin oluşturulması B. Fajların istenilen immobilize edilmiş reseptöre ya da hedefe bağlanması. C. Afinite göstermeyen fajların yıkanarak uzaklaştırılması. D. Afinite gösteren fajların elüe edilmesi E. Fajların bakteri üzerinden çoğaltılıp döngünün tekrarlanması. Bu şekil Biorender'da (www.biorender.com) oluşturulmuştur.



Tablo 1. 4: Faj Görüntüleme ile Elde Edilmiş Peptidlere Örnekler

Peptid Dizisi	Hedefi	Referans
CRRHWGFEFC	MMP9 Enzimi	(Ndinguri, Bhowmick, Tokmina-Roszyk, Robichaud ve Fields, 2012)
DMPGTVLP	PRDM14	(Bedi ve diğerleri, 2011)
CMGNKRSARPC	Lenfatik tümör	(Witt ve diğerleri, 2009)
HTMYHHYQHHL	VEGF Reseptörü	(Hetian ve diğerleri, 2002)
HEWSYLAPYPWF	Kolon kanseri hücreleri	(Rasmussen, Schreiber, Schultz, Mischler ve Schughart, 2002)



İKİNCİ BÖLÜM

KANSER, ANJİYOGENEZ VE ANTİANJİYOGENİK PEPTİDLER

2.1. KANSER, ANJİYOGENEZ VE ANTİANJİYOGENİK PEPTİDLER

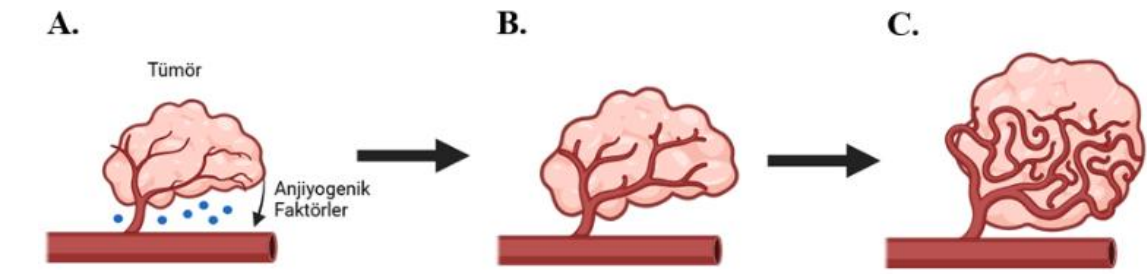
Gen mutasyonları ve çevresel stres gibi çeşitli sebeplere bağlı olarak neredeyse tüm organlarda ve dokularda ortaya çıkabilen kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi olarak tanımlanır (Singh ve diğerleri, 2019). Kanserli hücrelerde proteinlerin işlevlerini değiştiren mutasyonlar nedeniyle hücre büyüme kontrol mekanizmasının zarar görmesi ve sonucunda da kontrolsüz bir biçimde hücre büyümesi ve çoğalması gerçekleşir.

Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapik ilaçların düşük özgüllüğü, düşük biyoyararlanımı ve ciddi yan etkilerinin bulunması, tedavi süreci için büyük problem oluşturmaktadır (Kalo, Karius, Bena, Morrison ve Albert, 2019). Kemoterapi gibi tedavi yöntemlerinin yanı sıra çeşitli ilaçlar da geliştirilmektedir. Bu ilaçlar monoklonal antikorlar, proteinler, peptidler ve küçük kimyasal moleküllerdir. Bu ilaçlar genelde belirli bir hedefe yöneliktir. Kanser ilerlemesinde rol alan spesifik bir antijeni veya sinyal yolağını hedef alan bu ilaçlar kanser hastalarının yaşam kalitesini önemli derecede arttırmaktadır (Zhou, Xu, Sun ve Liu, 2014).

Son yıllarda kanserin de içinde olduğu çeşitli hastalıkların tedavisi için peptid yapılı terapötiklerin geliştirilmesinde önemli ölçüde bir artış olmuştur. Peptidler yan etkilerinin az olması, kolay modifikasyonları, kolay sentezlenmeleri ve ucuz üretim maliyetleri gibi önemli özelliklerinden dolayı geleneksel kanser tedavileri yerine yenilikçi bir çözüm sunmaktadır (Jalil ve diğerleri, 2023).

Anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastazı için var olan damarlar üzerinden yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan bir süreçtir (Filipa Lopes-Coelho vd., 2021) (**Şekil 2.1**). 1971 yılında rapor edilen bir derlemede yeni kan damarlarının oluşumu olmadan tümörlerin 2-3 mm'den daha fazla büyüemeyecekleri vurgulanmıştır (Folkman, 1971). Gullino, kanser öncesi dokudaki hücrelerin kansere dönüşme yolunda anjiyogenik kapasite kazandığını göstermiş ve bu çalışma daha sonra genetik yaklaşımlarla doğrulanmıştır (Gullino, P. M. 1978). Bu nedenle antianjiyogenik tedaviler her yıl yüzlerce insanın ölümüne sebep olan kanser hastalığının tedavisinde önemli bir yere sahiptir (Vasudev ve Reynolds, 2014).

Şekil 2.1: Kanser Anjiyogenezinin Şematik Gösterimi. A. Tümör dokusundan anjiyogenik faktörlerin salgılanması. B. Var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması. C. Oluşan yeni kan damarları ile tümörlü dokunun beslenip büyümesi. Bu şekil Biorender’da (www.biorender.com) oluşturulmuştur.



Kanser anjiyogenezi için tümör epitel hücreleri belirli markırlar ekspre ederler. Örneğin, vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF) bu markırlardandır ve markırlar arasında en çok çalışılan proteinlerdir (Tournaire vd., 2000). VEGF’ler anjiyogenez sürecini düzenleyen önemli sinyal proteinleridir. Tümör endotel hücrelerinin büyümesi ve metastazında VEGF₁₆₅ proteini, hücrelerden aşırı ekspre edilen KDR/FLK1 (VEGF-R2) ve NRP-1 markırlarına bağlanır.

Antianjiyogenik moleküller anjiyogenezi bloke etmek için anjiyogenez yolağının farklı noktalarını hedef alırlar. Küçük molekül yapılı kimyasal ilaçlar, monoklonal antikorlar, tirozin kinaz inhibitörleri, tuzak reseptörleri veya VEGF tuzağı ve peptidler ile VEGF, anjiyopoietin, hepatosit büyüme faktörü (HGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörleri (VEGFR), plasental büyüme faktörü ve reseptörü (PIGF/PIGFR), fibroblast büyüme faktörü ve reseptörü (FGF/FGFR), Tei reseptörleri gibi hedefler bloke edilmektedir (Oguntade, Al-Amodi, Alrumayh, Alobaida ve Bwalya, 2021). Peptidler, sentezlerinin kolaylığı ve farklı modifikasyonların kolayca uygulanabilmesi ile bu bağlamda öne çıkmaktadırlar.

1987 yılında yapılan bir çalışmada RGD tripeptidinin integrinler için bir ligand tanıma dizisi olduğu rapor edildi (Ruoslahti, 1987). Bu keşif anjiyogenez dahil integrin içeren yolakların hedeflenmesi için RGD dizisi içeren peptidlerin kullanıma olanak sağlamıştır. RGD peptidi içeren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada silengitid isimli RGD kalıntısı içeren peptidin (RGD-DPhe-(NMeVal)) $\alpha_v\beta_3$ ve $\alpha_v\beta_5$

integrinlerine bağlanarak antianjiogenik aktivite gösterdiği rapor edildi (Hariharan ve diğerleri, 2007). Başka bir çalışmada ise halkalı RGD peptidinin MMP2'nin (jelatinaz A) $\alpha_v\beta_3$ integrinine bağlanmasını engelleyerek antianjiyogenik aktivite gösterdiği rapor edildi (Boger, Goldberg, Silletti, Kessler ve Cheresch, 2001). Sentetik L-Glu-L-Trp sekansına sahip Faz III aşamasında test edilmiş IM862 dipeptidi β -FGF ve VEGF reseptörlerine bağlanarak anjiyogenezi engellediği rapor edilmiştir (Noy ve diğerleri, 2005). Başka bir reseptör inhibitörü görevi gören TM peptidi ise (ILITHIAMSALGVLLGAVCGVVLYRKR) pTM-NRP1 reseptörlerinin arasındaki bölgeye yerleşerek antianjiyogenik aktivite göstermektedir (Roth ve diğerleri, 2008)





ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

A7R PEPTİDİ

3.1. A7R PEPTİDİ

Faj görüntüleme teknolojisi ile elde edilmiş A7R peptidi yedi amino asit uzunluğunda ATWLPPR sekansına sahip bir peptiddir. Tümör epitel hücrelerinden ekspres edilen markırların anjiyogenezi tetikleyen reseptörlere bağlanmasını spesifik olarak engelleyerek tümör büyümesini ve anjiyogenezi inhibe etmektedir. 2000 yılında Tournaire ve arkadaşları A7R peptidinin *in vitro* koşullarda doza ve hücreye bağlı olarak insan endotel hücrelerinin VEGF aracılı proliferasyonunu inhibe ettiğini ve *in vivo* koşullarda (tavşan korneal modellerinde) VEGF indüklü anjiyogenezi tamamen ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir (Binetruy-Tournaire, Roselyne Demangel ve diğerleri, 2000). 2007 yılında A7R peptidinin yapı-aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve peptidin C-terminalindeki dört amino asitten oluşan LPPR sekasının (özellikle arjinin kalıntısının) peptidin antianjiyogenez biyoaktivitesi ve sekonder yapısı için oldukça önemli olduğu rapor edilmiştir (Starzec vd., 2007). A7R peptidinin radyonüklidler ile konjuge edilmiş versiyonları antianjiyogenez etkisinin yanı sıra kanser tanısında da (nükleer tıpta) kullanılmak üzere çalışılmaktadır (Petter vd., 2004; Wu vd., 2014). 2014 yılında Ma ve arkadaşları A7R peptidi ile $\alpha\beta 3$ integrin proteinine bağlanma afinitesi olan RGD tripeptidini birleştirmişler ve tümör görüntüleme çalışmaları için ^{18}F ile işaretlemişlerdir. Aynı çalışmada heterodimer RGD-A7R peptidinin, monomer peptidlere göre U87MG glioma hücrelerine daha fazla afinite gösterdiği rapor edilmiştir (Ma vd., 2014).

Literatür çalışmalarında A7R peptidinin tümör görüntüleme ve antikanser çalışmaları için ideal bir biyomolekül olduğu rapor edilmiştir (Lu vd., 2019). Ancak A7R peptidinin ilaç adayı olamamasının en büyük sebeplerinden biri peptidin düşük kararlılığıdır. Kısa sekansa sahip olması ve terminal kısımlarının proteazlara karşı açık olması peptidin kararlılık sorununun muhtemel sebepleri olarak sayılabilir. 2016 yılında Ying ve arkadaşları %25 fare serumu ile yaptıkları kararlılık çalışmalarında A7R peptidinin iki saat sonunda serum içerisinde tamamen parçalandığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada peptidin halka yapılı versiyonunun ise 12. saatin sonunda bile yarısından fazlasının bozunmadan kaldığı görülmüştür (Ying vd., 2016). 2017 yılında Zhang ve Lu, D-amino asitlerini kullanarak D-A7R peptidini sentezlemişler ve %50 fare serumu ile yapılan kararlılık çalışmasında bu peptidin enzimatik parçalanmaya karşı dayanıklı olduğunu rapor etmişlerdir (Zhang ve Lu, 2017). 2018 yılında Wang ve arkadaşları, A7R

peptidinin kararlılığını arttırmak ve kan beyin bariyeri geçişini sağlamak amacı ile glikozilasyon yöntemini kullanarak farklı A7R analoglarını tasarlamışlar ve glikozilasyon ile peptidinin kararlılığının artabileceğini göstermişlerdir (Wang vd., 2018). Masłowska ve arkadaşları tarafından yeni yayınlanan bir çalışmada ise A7R peptidini ve peptidomimetğini radyonüklidler ile konjuge ettiklerinde, her iki molekülün de yetersiz kararlılığı vurgulanmaktadır (Masłowska vd., 2022).

Bu çalışmada A7R peptidinin kararlılığını aşılama yöntemi kullanarak arttırmayı hedefledik ve kararlı peptid iskeleleri olarak da SFTI-1 ve kalata B1 peptidleri seçildi. Ayrıca SFTI-1 ve A7R peptidlerinin primer yapıları birbirine benzerdir. Bu iki peptidin molekül yapıları için önemli olan ardışık prolin kalıntıları her iki peptid sekansında da mevcut ve aynı konumdadır ve bu kalıntıların önünde her iki peptid için de izobarik aminoasitler (lösin ve izolösin) bulunmaktadır. Aşılama yaparken SFTI-1 ve kalata B1 peptidinin stabiliteyi sağlayacak özel yapılarının bozulmaması için ana hattın ve aşılacak fragmentin benzer olmasına özen gösterildi ve kalata B1 peptidinin daha esnek olan altıncı hattı seçildi. Peptidlerin sekansları **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

Tablo 3. 1: Peptidler ve Aminoasit Sekansları

Peptidler	Aminoasit Sekansları
SFTI-1	
Kalata B1	
* A7R	ATWLPPR
* A7R-SFTI-1-hat1	
* A7R-SFTI-1-hat1-T5K	
* A7R-Kalata B1-hat6	



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

4.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/modelleri **Tablo 4.1**'te verilmiştir.

Tablo 4. 1: Kullanılan Cihazlar Tablosu

Cihaz	Marka/Model
Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı	CEM Discover Bio
Kütle Spektrometresi	Agilent 6530 Accurate Q-TOF LC-MS
RP-HPLC	Shimadzu L20
RP-HPLC Degazer	Shimadzu DGU-20AT
RP-HPLC Kolon Fırını	Shimadzu CTO-10ASVP
RP-HPLC Oto örnekleyici	Shimadzu SIL-20AHT
RP-HPLC Pompa	Shimadzu LC-20AT
RP-HPLC UV Dedektörü	Shimadzu SPD-20A
Inertsil kolon 2,1x150mm,WP300, 5µm	GL Sciences
Inertsil kolon 20x250mm,WP300, 5µm	GL Sciences
Liyofilizatör	Telstar LYOQUEST
Stereo mikroskop	Olympus EP50
İnkübatör	Nüve 055
Santrifüj	Sigma 2-16KL
Rotary Evaporatör	Heidolph G5
Hassas Terazî	Ohaus PA214C
Vortex	Jeio Tech VM-96B
pH Metre	Ohaus Starter 3000
Manyetik Karıştırıcı	Jeio Tech MS-17BB
Yumurta İnkübatörü	HDD
UV Plaka Okuyucu	BMG LABTECH
Ultra Saf Su Cihazı	AquaBlue

4.1.1. Peptid Sentez Cihazı

Günümüzde tam otomatik ve yarı otomatik modelleri bulunan peptid sentez cihazlarının temeli Robert Bruce Merrifield tarafından 1963 yılında atılmıştır. Ayarlanabilir sıcaklık, reaksiyon süresi, mikrodalga gibi özellikleri sayesinde dışarıda kurulan reaksiyonlara göre daha verimli ve kısa sürede tamamlanan sentezlere imkân sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında CEM Discover Bio marka mikrodalga destekli katı faz peptid sentez cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon kabini, yıkama istasyonu ve reaktif istasyonundan oluşan cihaz ile 0,05-0,5 mmol skalada sentezler gerçekleştirildi (**Görsel 4.1**).

Görsel 4. 1: Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı



4.1.2. Ters Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC)

Genel olarak sabit ve mobil fazdan oluşan sistemde sabit faza yüklenen numunenin üzerinden mobil faz geçirilerek ayrıştırma işleminin gerçekleştirilmesi ile fraksiyonların toplanmasına dayanır. Ayrıştırma işlemi sabit fazın özelliğine göre değişebilir. Cihaz temelde pompa, kolon fırını, dedektör ve dedektörden geçen verinin analiz edilebileceği bilgisayarlı bir sistemden oluşur.

Bu tez çalışmasında peptidlerin saflaştırılması ve saflık yüzdelerinin belirlenmesi için Shimadzu L20 marka RP-HPLC kullanıldı (**Görsel 4.2**). Cihaza ait bilgilere kullanılan cihazlar kısmında yer verilmiştir.

Cihazda C18 kolon materyali ile özelleştirilmiş **Tablo 4.1’de** verilen preparatif ve analitik kolonları kullanıldı. Preparatif C18 kolonunda %1 gradiyent, 8 mL 80 dakikalık metot kullanılarak saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.

Görsel 4. 2: RP-HPLC Cihazı

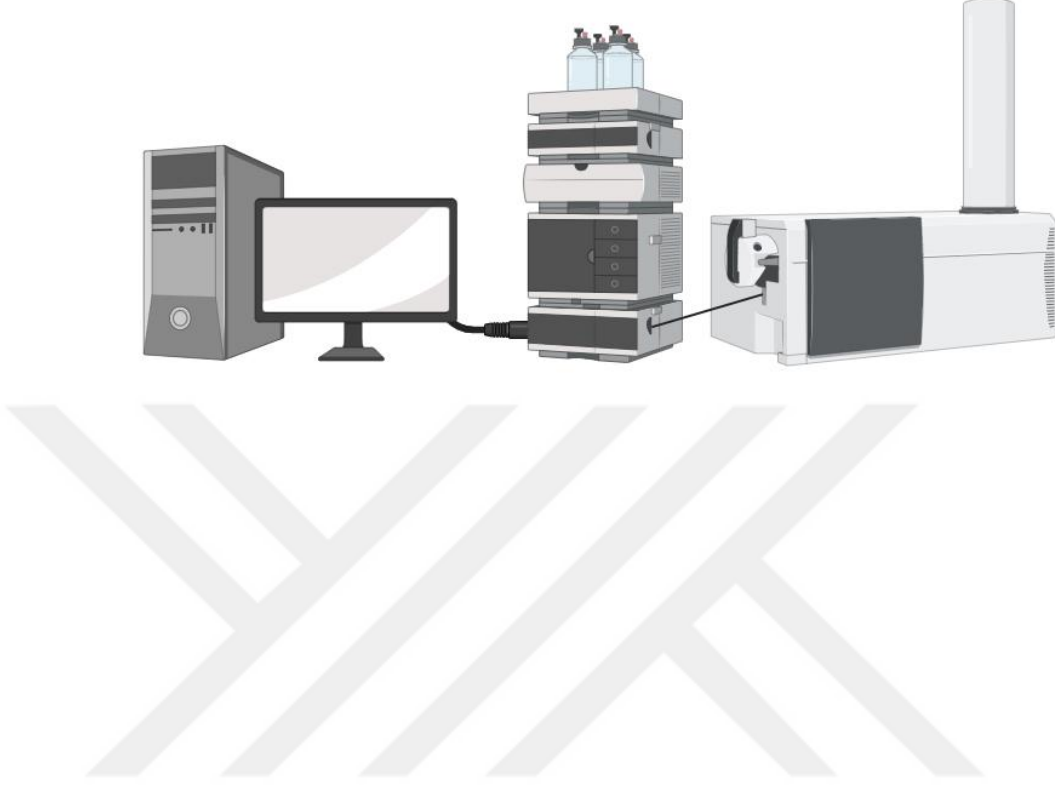


4.1.3. Kütle Spektrometresi (MS)

Genel olarak numune girişi, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektörden oluşan kütle spektrometresinde moleküllerin molekül ağırlıkları analizi iyonlaştırıcı ile iyonlaştırılan molekülün dedektör tarafından kütle/yük (m/z) oranının tespiti ile gerçekleştirilir (**Şekil 4.1**).

Bu tez çalışmasında Agilent marka 6530 model numaralı Q-TOF LC/MS cihazı kullanılmıştır. Bu cihazda bulunan kuadropol ve uçuş zamanlı dedektör (q-TOF) ile düşük derişimdeki numunelerin hassas bir biçimde molekül ağırlığı tayininin yapılması mümkündür.

Şekil 4.1: Q-TOF LC/MS Cihazı. Bu şekil Biorender'da (www.biorender.com) oluşturulmuştur.



4.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Tablo 4. 2: Kullanılan Kimyasal Maddelerin Tablosu

Kimyasallar	Marka
<i>N, N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, (HBTU)	Chem-Impex Int'I Inc.
<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate (HCTU)	Chem-Impex Int'I Inc.
1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, (HATU)	Chem-Impex Int'I Inc.
<i>N,N</i> -Diisopropiletilamin (DIPEA)	Merck
<i>N,N</i> -Dimetilformamid (DMF)	Merck
Diklorometan (DCM)	Merck
Asetonitril	Merck
Trifloroasetik asit	Fisher Scientific
2-klorotritil klorür reçine (2-CTC)	Merck
Triisopropylsilane	Sigma-Aldrich
Amonyum Hidrojen Karbonat	Alfa Aesar
Dietileter	Merck
Piperidine	Acros Organics
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit	Acros Organics
Üre	Merck
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Gibco
İnsan kan serumu	Sigma-Aldrich
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Gly-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Val-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Pro-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Ala-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Leu-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Phe-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Sigma-Aldrich

4.3. KATI FAZ PEPTİD SENTEZİ

Robert Bruce Merrifield tarafından 1963 yılında tasarlanan katı faz peptid sentezi bir katı destek materyaline amino asitlerin sırası ile tutturularak peptidlerin sentezlenmesini sağlar (Merrifield 1963). Merrifield bu çalışması ile 1984 yılında Nobel Kimya ödülünü almıştır. Bu Nobel ödüllü yöntem ile her reaksiyon sonrasında reaksiyona girmeyen ürünlerin uzaklaştırılması sağlanabilmekte ve sentezin diğer yöntemlere göre hızlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlanmaktadır.

Katı faz peptid sentezi yönteminde kullanılan aminoasitleri koruyucu gruplarına göre sınıflandırabiliriz. Sentez işlemi sırasında kullanılan amino asitlerin koruyucu grupları Fmoc (9-florometiloksikarbonil) ve Boc (*ter*-bütoksikarbonil) olabilir. Bu iki yöntemi birbirinden ayıran en önemli özellik koruyucu grupları uzaklaştırırken kullanılan kimyasallardır. Boc katı faz peptid sentezi yönteminde reçine kırıldıktan sonra koruyucu yan grupların uzaklaştırılması için toksik hidrojen florür (HF) kullanıldığından günümüzde daha az zararlı bir yaklaşım olan Fmoc katı faz peptid sentezi yöntemi daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Fmoc katı faz peptid sentezi yönteminde reçine ve koruyucu yan grupların uzaklaştırılması için trifloroasetik asit (TFA) kullanılmaktadır. (Oliver vd. 2014, Behrendt vd. 2016).

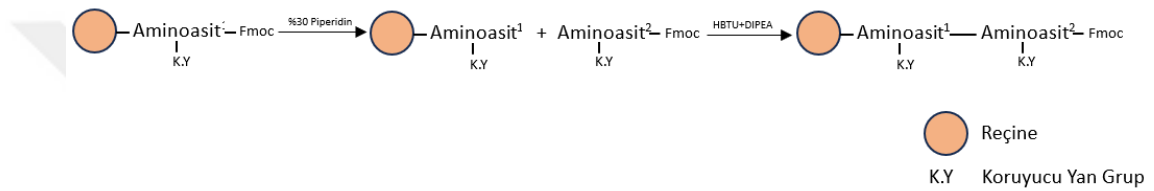
4.3.1. Fmoc Katı Faz Peptid Sentezi

Fmoc-katı faz peptid sentezi temel olarak bir reçine üzerine elde edilmek istenilen peptid dizisinin C-ucundan başlanılarak amino asitlerin sırası ile eklenmesiyle yapılır. Sentez sırasında Fmoc gruplarını uzaklaştırmak için piperidin çözeltisi ve sentez sonunda reçine ve koruyucu yan grupların uzaklaştırılması için TFA kullanılır. Böylece sentezlemek istediğimiz peptidin birincil yapısını elde etmiş oluruz. Peptid dizisinde sistein gibi amino asitler bulunuyorsa veya halkalı yapıya sahip bir peptid sentezlenmek istendi ise sentezlenmiş olan bu birincil yapıdaki peptide halkalaştırma ve oksidasyon reaksiyonları ile üç boyutlu yapıları kazandırılabilir. (Oliver vd. 2014).

Bu tez çalışmasında peptidlerin sentezi için katı destek materyali olarak 2-klorotritil klorür reçinesi (2-CTC) kullanıldı. Sentez, 0,25 mmol skalada ve Fmoc koruyucu gruplu aminoasitlerin C-ucundan N-ucuna doğru eklenmesi ile gerçekleştirildi.

Sentez için mikrodalga destekli katı faz peptid sentez cihazı kullanıldı. 2-CTC reçine üzerine ilk amino asit 2 mL DCM ve 350 μ L DIPEA ile aktifleştirilip eklendi. DMF içerisinde hazırlanmış %30'luk piperidin çözeltisi ile Fmoc koruyucu grubu uzaklaştırıldı. DMF ile yıkama işlemi sonrası 2 mL HBTU ve 350 μ L DIPEA ile aktifleştirilen ikinci amino asit eklendi. Bu döngü ile dizideki bütün aminoasitler sırası ile eklenerek peptidlerin sentezi gerçekleştirildi.

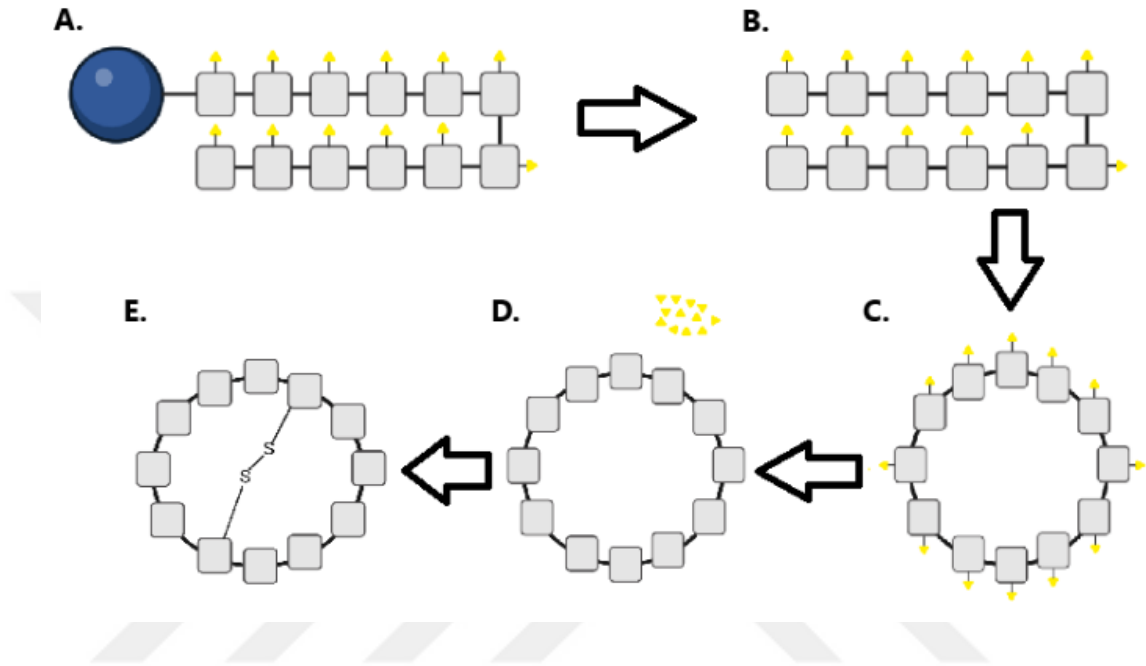
Şekil 4.2: Fmoc Katı Faz Sentezinin Bir Döngüsünün Şeması.



4.3.2. Reçine ve Koruyucu Yan Grupların Kırılması

Sentezi gerçekleştirilen peptidlere **Şekil 4.3**'teki gibi sırası ile reçine kırma, halkalaştırma, koruyucu yan grupların uzaklaştırılması, sistein köprülerinin oluşturulması işlemleri ile üç boyutlu yapıları kazandırılmıştır.

Şekil 4.3: Katı Faz Peptid Sentezi, Reçine Kırma, Halkalaştırma, Yan Grup Koruyucu Gruplarının Uzaklaştırılması ve Sistein Köprülerinin Oluşturulmasının Şematik Gösterimi. A. Katı faz peptid sentezi B. Reçine kırma C. Halkalaştırma D. Koruyucu yan grupların uzaklaştırılması E. Sistein köprülerinin oluşturulması



4.3.3. Reçine Kırma

Sentez sonrasında peptidlerin lineer halinin elde edilmesi için peptidin reçineden ayrılması gerekir. Fmoc koruyucu gruplu amino asitler ile gerçekleştirilen sentezlerde %95 TFA, %2,5 TIPS ve %2,5 saf su ile hazırlanan çözelti ile hem reçine hem de koruyucu yan grupların uzaklaştırılması mümkündür. Lineer olan A7R peptidinin reçine kırma işlemi bu yöntemle yapıldı. Ancak halkalı yapıda olan peptidlerin halkalaştırma reaksiyonunda yan ürün oluşturmaması için reaksiyon sırasında koruyucu grupların peptid zincirinde amino asitlerin yan gruplarını koruması için bulunmasını isteriz. Bu sebepten dolayı halkalı peptidlerin reçine kırma işlemi için DCM içerisinde hazırlanmış %1'lik TFA çözeltisi kullanıldı. 10 mL çözelti hazırlanan düzeneğe eklendi ve 10 dakikalık reaksiyon sonunda süzme işlemi yapıldı. Bu işlem 10 kere tekrarlanıp reçine kırma işlemi tamamlandı. İşlem sonunda DCM evaporatör ile uzaklaştırılıp peptidin kurutulması için liyofilize edildi.

4.3.4 Peptidlerin Halkalaştırılması

Liyofilize edilerek kurutulan peptidler halkalaştırma işlemi için konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde DMF içerisinde çözüldü ve sonra çözeltiye 5 mM HATU ve 10 mM DIPEA eklendi. Üç saat reaksiyon sonunda peptidlerin N- ve C-uçları arasında bir peptid bağı oluşup peptidlerin halkalı bir yapı kazanması sağlanmıştır. Peptidler yan grupların uzaklaştırılması öncesi liyofilize edildi.

4.3.5. Koruyucu Yan Grupların Uzaklaştırılması

Liyofilize edilen halka yapılı peptidler üzerindeki koruyucu grupların uzaklaştırma işlemi lineer peptidlerde olduğu gibi %95 TFA, %2,5 TIPS, %2,5 saf su ile hazırlanılan reaksiyon çözeltisi ile gerçekleştirildi. Reaksiyon 3,5 saat sürdü ve reaksiyon sonunda TFA evaporatör ile uzaklaştırıldı. Peptidler ve ayrılan koruyucu grupların ayrılması için soğuk dietil eter ve özelti A+B (%50 özelti A (H_2O /%0,05 TFA (v/v)) + %50 özelti B ((%90 CH_3CN /%10 H_2O /%0,045 TFA (v/v)) ile ekstrakte edildi. Çözelti fazında bulunan peptidler toplanıp liyofilize edildi ve sonrasında RP-HPLC ile saflaştırıldı. Toplanan HPLC fraksiyonları Q-TOF LC-MS cihazı ile analiz edildi ve istenilen peptid molekül ağırlığına sahip fraksiyonlar birleştirilip liyofilize edildi.

4.3.6. Peptidlerin Sistein Köprülerinin Oluşturulması

Halkalı peptidlerin sistein köprülerini oluşturmak için 0,1 M NH_4HCO_3 özeltisi (pH 8,3) kullanıldı. Peptidler çözeltiye mililitreye 0,3 mg peptid olacak şekilde eklenmiştir. 24 saat süren reaksiyon sonunda RP-HPLC ile saflaştırma yapıldı. Toplanan fraksiyonların kütle spektrometrisi ile molekül ağırlıkları belirlendi. Peptidlerin saflıkları ise analitik RP-HPLC ile analiz edildi.

4.4. SERUM STABİLİTESİ ALIşMASI

Sentezlenen peptidlerin serum içerisindeki stabilitelerini belirlemek için önce satın alınan insan kan serumu 15000 rpm’de santrifüj edildi. Böylece serumdaki lipidler ayrıştırılmış oldu. Hazırlanılan serum içerisine peptidler üçer tekrar olacak şekilde

eklenerek 37 °C’de inkübe edildi. Çalışmanın 0, 1, 2, 4 ,6, 8, 10 ve 24. saatlerinde 40’ar µL örnekler alındı ve 6 M 40 µL üre ile peptidlerin serum proteazları tarafından daha fazla parçalanmasının önüne geçildi ve 10 dakika 4°C’de bekletildi. Bu süre sonunda 40 µL %20 TCA eklenerek yeniden 10 dakika 4°C’de bekletildi ve sonra 15000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatantın çöken kısımlardan ayrılması sağlandı. Süpernatanttan 90 µL alındı ve analitik RP-HPLC ile analiz edildi. Kromatogramdaki piklerin integrasyonu sonrası peptidlerin serum içerisindeki stabiliteleri hesaplandı.

4.5. HEMOLİTİK AKTİVİTE

Peptidlerin eritrosit hücrelerine karşı hemolitik aktiviteleri 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 80 mg/mL ve 160 mg/mL’lik peptid konsantrasyonlarında test edildi. Negatif kontrol olarak PBS ve pozitif kontrol olarak Triton X-100 kullanıldı. Üçer tekrarlı olacak şekilde peptid çözeltilerinden ve kontrollerden 20’şer µL alınıp 100’er µL %0,25 mg/mL hücreler ile 37°C inkübatörde bir saat muamele edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 150 RFC beş dakika santrifüj edilip süpernatant kısmından 100 µL alınıp 96 kuyucuklu plakaya yerleştirildi. Örneklerin %hemoliz değerleri plaka okuyucuda 415 nm’de verdikleri absorbansa göre aşağıda verilen formüle ile hesaplandı.

Denklem 1: %Hemoliz hesaplama

$$\% \text{Hemoliz} = \frac{\text{Numunenin absorbansı} - \text{PBS absorbansı}}{\text{Triton X- 100 absorbansı} - \text{PBS absorbansı}} \times 100$$

4.6 KORİYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) MODELİ İLE PEPTİDLERİN ANTİANJİYOGENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Peptidlerin antianjiyogenik özellikleri CAM modeli ile test edildi. Bu modelde peptidler döllenmiş bıldırcın yumurtalarının kabuklarına pencereler açılarak implant edildi ve stereo mikroskop ile alınan görüntüler incelenerek ortalama damar sayıları hesaplandı.

Döllenmiş bildiricin yumurtaları Afyonkarahisar ilinde bulunan bir üreticiden temin edildi ve yumurtaların kabukları saf su ile temizlendikten sonra yumurta inkübatörüne yerleştirildi. Yumurta inkübatörünün 37 °C ve %60 nemli bir ortam olması sağlandı. Yumurtaların kontamine olmaması için işlemler olabildiğince hızlı gerçekleştirildi ve yapılan her işlemde yumurtaların kabukları ve ortam %70 etanol ile temizlendi.

Çalışmanın ikinci gününde bildiricin yumurtalarının hava kesesinin bulunduğu bölgeden 5 mL'lik bir şırınga ile açılı bir şekilde yaklaşık 2 mL ince albümin alındı. Bu işlemle beraber damarların oluşacağı zarın açılacak pencereden daha uzak bir konumda oluşması sağlandı ve pencere açıldıktan sonra oluşabilecek kontaminasyon riskleri azaltıldı. İşlem sonunda iğne deliği steril bir bant ile kapatıldı ve yumurtalar sterilize edilip yumurta inkübatörüne alındı.

Çalışmanın üçüncü gününde yumurtalara yaklaşık 1 cm²'lik pencereler açılıp yumurtaların canlılıkları kontrol edildi. Yumurtaların damar bütünlüğü, renk ve döllenmiş olup olmadığı gibi faktörler göz önüne alınarak canlılığını koruyan yumurtalar ile çalışmaya devam edildi. Açılan pencereler steril bir bant ile kapatıldı. Yumurtalar sterilize edildi ve inkübatöre yerleştirildi.

Çalışmanın beşinci gününde peptidler 10 µM olacak şekilde hazırlandı. VEGF çözeltisi ise 10 nM olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan peptidler, negatif kontrol olarak RPMI ve pozitif kontrol olarak VEGF çözeltilerinden 10'ar µL alınarak steril filtre kağıtları ile yumurtalara implant edildi. İmplant edilen bölge ana damar veya ana damara yakın bir bölge olarak belirlendi. İşlem sonunda yumurtaların pencereleri steril bant ile kapatıldı ve sterilize edilip yumurta inkübatörüne konuldu.

Çalışmanın altıncı gününde yumurtalar inkübatörden alınarak 45 dakika buzda bekletildi. Daha sonra yumurtalar 400 µL %25'lik gluteraldehit ile fikse edildi. Yumurtaların pencereleri genişletilip fikse edilen bölgeden kesit alındı ve %1 PBS ile dikkatlice temizlendi. İşlem sonunda üzerinde damarlar bulunan beyaz bir zar elde edildi. Elde edilen zarlar 16x ve 25x büyütme ile 40x yakınlık ayarlarında Stereo mikroskop ile görüntülendi ve görüntüler kaydedildi. Görüntülerdeki ortalama damar sayısına göre sonuçlar tablo haline getirildi ve GraphPad Prism 10 deneme sürümü programı kullanılarak eşleştirilmemiş T testi ile istatistiksel olarak yorumlandı.



BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. PEPTİDLERİN SENTEZİ, HALKALAŞTIRILMASI, OKSİDASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Peptid sekansı aşılması, stabilitesi düşük ancak biyoaktiviteye sahip peptidlerin (peptid epitopları) stabilitesi yüksek peptid iskelelerine entegre edilmesi olarak tanımlanabilir. Epitopları peptid iskelelerine aşılarken seçilen epitopun stabiliteyi sağlayan peptid iskelesinin yapısını bozmaması beklenir (Abdul Ghani et al., 2017). Bu yüzden aşılama istenilen epitopun iskele üzerine hangi bölgeden aşılanacağı önemlidir. Yapılan bir çalışmada MCoTI-II peptidinin 6. hattının esnek bir yapısının olduğu görülmüştür (Daly et al., 2013). Esnek olan bu hatta yapılacak aşılama çalışması siklotidlerin stabiliteyi sağlayan sıklık sistin düğüm motifinin korunması için ideal bir aşılama bölgesidir.

Aşılama stratejisi için iskele olarak genelde siklotidler kullanılır ancak bu tez çalışmasında epitop olarak kullanılan A7R peptidi, SFTI-1 peptidinin birinci hattı ile gösterdiği benzerlikten dolayı Kalata B1 peptidinin yanında SFTI-1 peptidi de tercih edildi. Bu çalışmada aşılama bölgesi olarak SFTI-1 peptidinin birinci hattı seçilmiştir.

Sentezlenen peptidler aşağıdaki Tablo 5.1’de verilmiştir. Kalın çizgiler halka yapılı peptid omurgasını, ince çizgiler ise disülfid köprülerini göstermektedir. Deneysel monoizotopik molekül ağırlıkları aşağıdaki Şekil 5.1.-5.2.-5.3.-5.4.’de verilen LC-MS spektrumlarının Agilent MassHunter programı ile dekonvolüsyonu sonucu elde edildi.

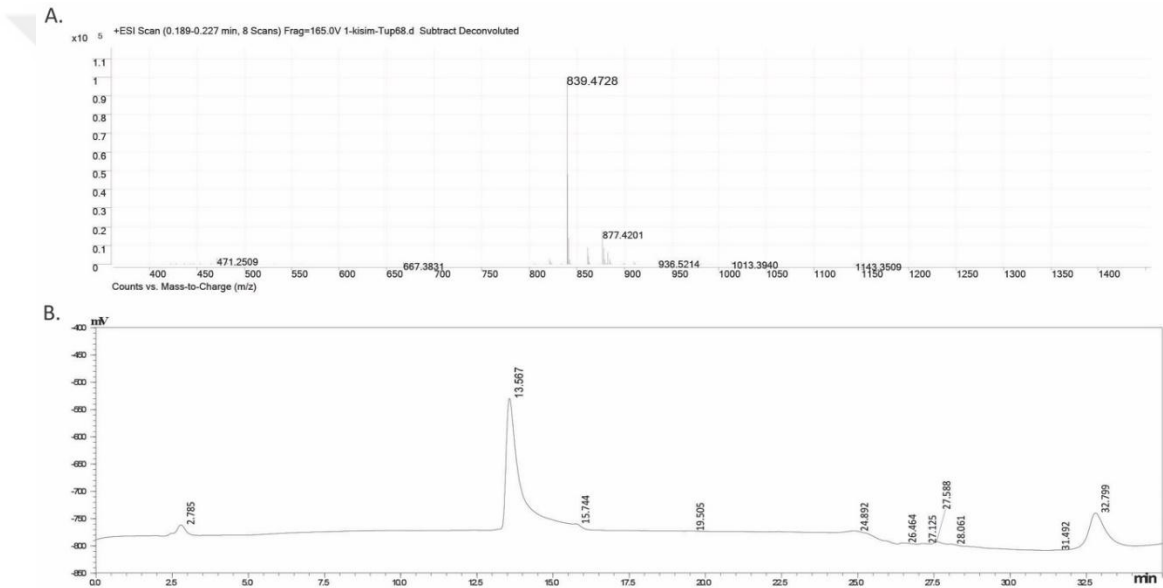
Tablo 5. 1: Tez Çalışmasında Sentezlenen Peptidler, Amino Asit Dizilimleri, Molekül Ağırlıkları ve Alıkonma Süreleri.

Peptid ismi	Amino asit dizilimi	Teorik monoizotopik molekül ağırlığı (Da)	Deneysel monoizotopik molekül ağırlığı (Dekonvule edilmiş) (Da)	Alıkonma süresi (min)
A7R	ATWLPPR	839,45	839,47	13,57
A7R-SFTI-1-hat-1		1597,73	1597,48	19,97
A7R-SFTI-1-hat-1-T5K		1624,78	1624,48	17,52
A7R-kalata-B1-hat-6		2974,21	2974,16	-

A7R peptidi yedi amino asit uzunluğunda lineer bir peptiddir. Peptid, sentez sonrası RP-HPLC ile saflaştırıldı. Toplanan fraksiyonlar LC-MS ile analiz edildikten

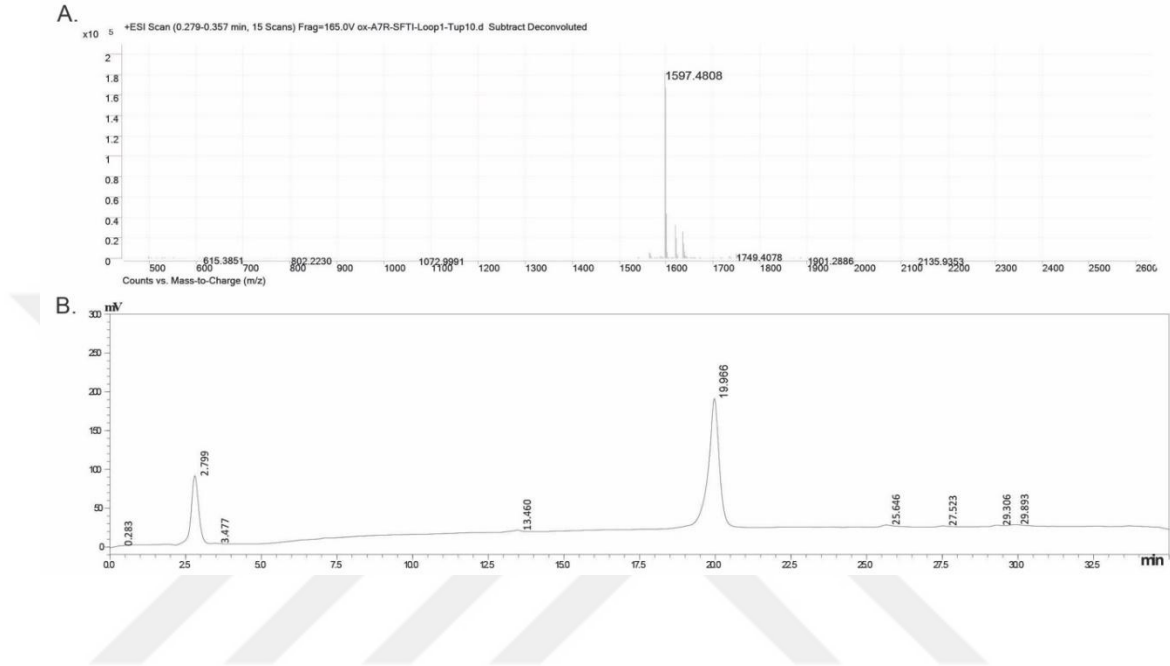
sonra doğru molekül ağırlığına sahip fraksiyonların analitik RP-HPLC ile % saflıkları ve peptidin alıkonma süresi belirlendi. **Şekil 5.1**'de A7R peptidinin LC-MS spektrumu ve analitik RP-HPLC kromatogramı verilmiştir. Peptid 36,5 mg olarak elde edildi.

Şekil 5.1: A7R Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı. **A.** Peptidin LC-MS spektrumu. Peptidin dekonvolüsyon sonrası molekül ağırlığının 839,4728 Da olması peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir. **B.** Peptidin analitik RP-HPLC kromatogramı. Peptidin alıkonma süresi 13,57 dakikadır.



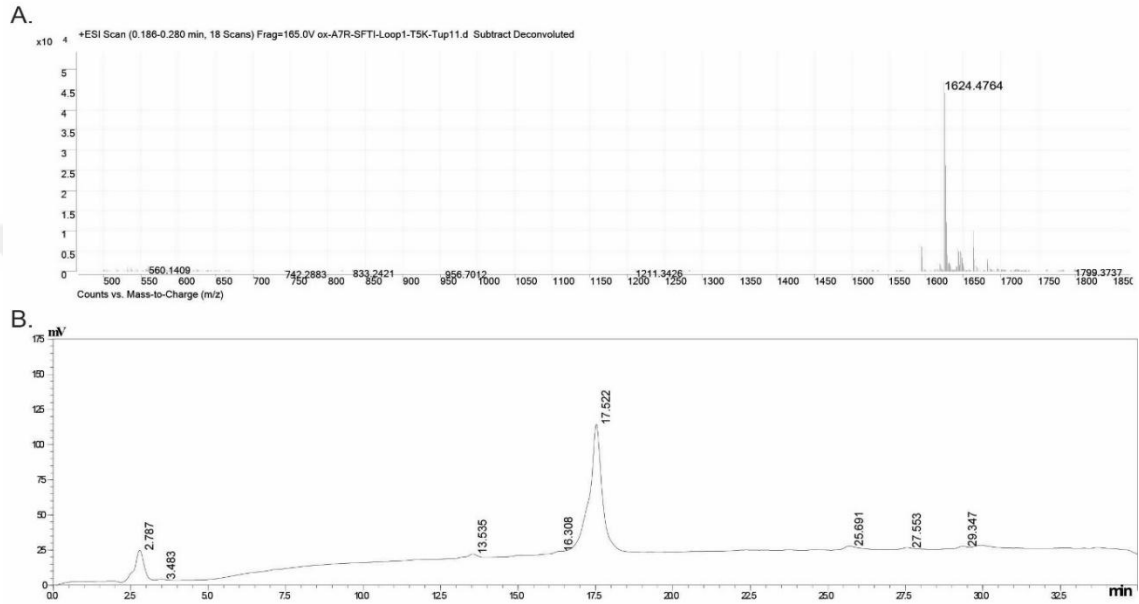
A7R peptidinin serum kararlılığını arttırmak amacıyla peptid ilk önce SFTI-1 peptid iskelesinin 1. hattına aşılandı. Peptid sentez, halkalaştırma ve disülfid köprüsünün oluşturulması sonrası RP-HPLC ile saflaştırıldı. Toplanan fraksiyonlar LC-MS ile analiz edildi ve doğru molekül ağırlığına sahip fraksiyonların analitik RP-HPLC ile % saflıkları ve peptidin alıkonma süresi belirlendi. **Şekil 5.2**'de A7R-SFTI-1-hat-1 peptidinin LC-MS spektrumu ve analitik RP-HPLC kromatogramı verilmiştir. Peptid 18,5 mg olarak elde edildi.

Şekil 5.2: A7R-SFTI-1-hat-1 Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı. **A.** Peptidin LC-MS spektrumu. Peptidin dekonvolüsyon sonrası molekül ağırlığının 1597,4808 Da olması peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir. **B.** Peptidin analitik RP-HPLC kromatogramı. Peptidin alıkonma süresi 19,97 dakikadır.



A7R peptidinin ikinci aşılama çalışmasında, A7R-SFTI-1-hat-1 peptidinin 5. amino asiti Thr Lys amino asiti ile değiştirildi. A7R-SFTI-1-hat-1-T5K olarak isimlendirilen peptid, sentez, halkalaştırma ve disülfid köprüsünün oluşturulması sonrası RP-HPLC ile saflaştırıldı. Toplanan fraksiyonlar LC-MS ile analiz edildi ve doğru molekül ağırlığına sahip fraksiyonların analitik RP-HPLC ile % saflıkları ve peptidin alıkonma süresi belirlendi. **Şekil 5.3'**de A7R-SFTI-1-hat-1-T5K peptidinin LC-MS spektrumu ve analitik RP-HPLC kromatogramı verilmiştir. Peptid 13,0 mg olarak elde edildi.

Şekil 5.3: A7R-SFTI-1-hat-1-T5K Peptidinin LC-MS Spektrumu ve Analitik RP-HPLC Kromatogramı. **A.** Peptidin LC-MS spektrumu. Peptidin dekonvolüsyon sonrası molekül ağırlığının 1624,4764 Da olması peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir. **B.** Peptidin analitik RP-HPLC kromatogramı. Peptidin alıkonma süresi 17,52 dakikadır.

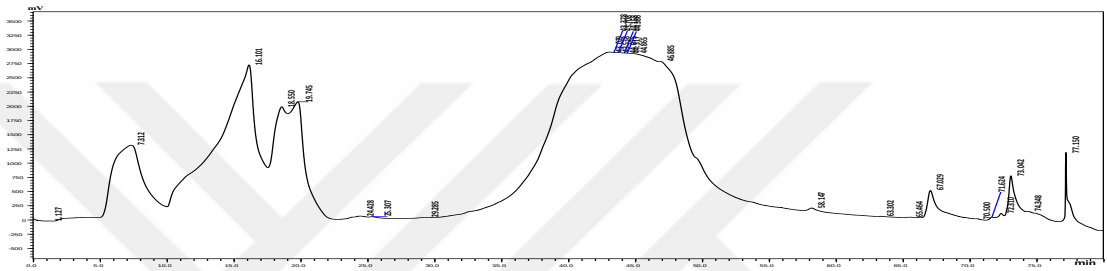


A7R'nin kalata B1 peptidi üzerine aşılınması; A7R-kalata-B1-hat-6 olarak isimlendirilen üçüncü aşılınmış peptid sentezlendikten sonra %1 TFA içerisinde reçine kırma işlemi gerçekleştirildi. Kurutulan ham ürün daha sonra halkalaşma reaksiyonu ile peptidin N- ve C-uçları peptid bağı ile birleştirilerek halkalı indirgenmiş peptid haline getirildi ve RP-HPLC ile yöntem bölümünde açıklandığı gibi saflaştırıldı (**Şekil 5.4A**). 30-50. dakikalar arası fraksiyonlar toplandı. Ancak yapılan LC-MS analizlerinde halkalı indirgenmiş peptide ait m/z değerleri görülemedi. Bu sebeple peptid mikrodalga eşikli sentez cihazı ile ikinci defa sentezlendi. Önceki sentez sonrası olduğu gibi halkalaşma tepkimesi gerçekleştirildi ve RP-HPLC ile saflaştırıldı (**Şekil 5.4B**). Birinci ve ikinci sentez sonrası RP-HPLC ile toplanan fraksiyonlar liyofilize edildi, 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (pH 8,2):izopropanol (1:1, v:v) çözeltisi içerisinde okside edilerek disülfid köprülerinin oluşması sağlandı. Reaksiyon karışımı tekrar RP-HPLC ile saflaştırıldı (**Şekil 5.4C**) ve LC-MS ile analiz edildi. Analiz sonrası yalnızca bir fraksiyonda halkalı okside olmuş peptide ait molekül ağırlığı görüldü (**Şekil 5.5A-B**). Fraksiyon liyofilize edildi ancak

biyoaktivite çalışmalarında kullanılacak kadar yeterli peptid elde edilemedi (tartım yapılamayacak kadar az ürün elde edildi).

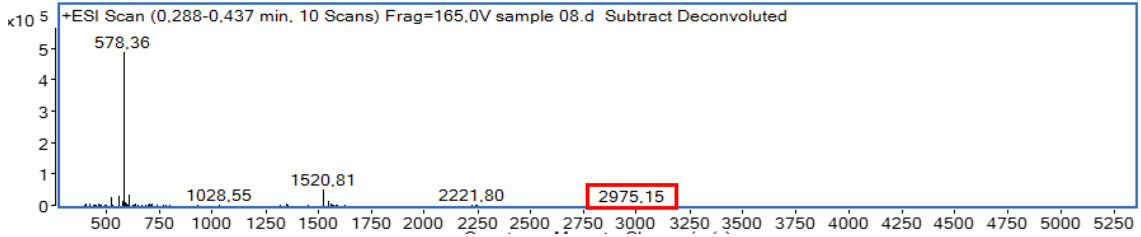
Şekil 5.4: A7R-Kalata B1-hat-6 Peptidinin RP-HPLC Kromatogramları. **A.** Birinci sentez sonrası ve halkalaştırma reaksiyonu sonrası RP-HPLC kromatogramı. **B.** İkinci sentez sonrası ve halkalaştırma reaksiyonu sonrası RP-HPLC kromatogramı. **C.** Oksidasyon sonrası RP-HPLC kromatogramı.

A.

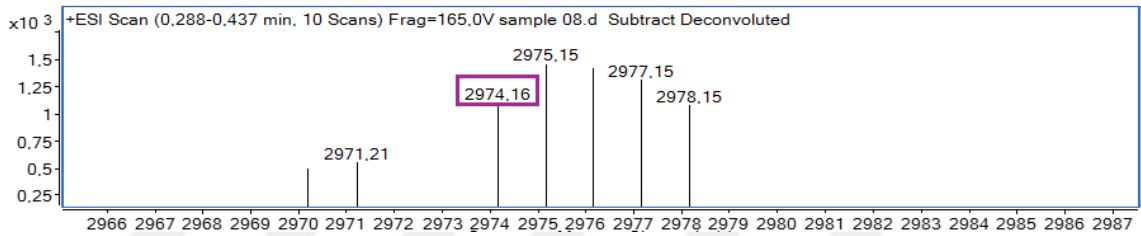


Şekil 5.5. A7R-Kalata B1-hat-6 Peptidinin LC-MS Spektrumu. **A.** LC-MS spektrumu (kırmızı dikdörtgen içinde peptidin molekül ağırlığı görülmektedir) ve **B.** LC-MS spektrumunun büyütülmüş hali. Mor dikdörtgen içinde monoizotopik molekül ağırlığı görülmektedir.

A.



B.



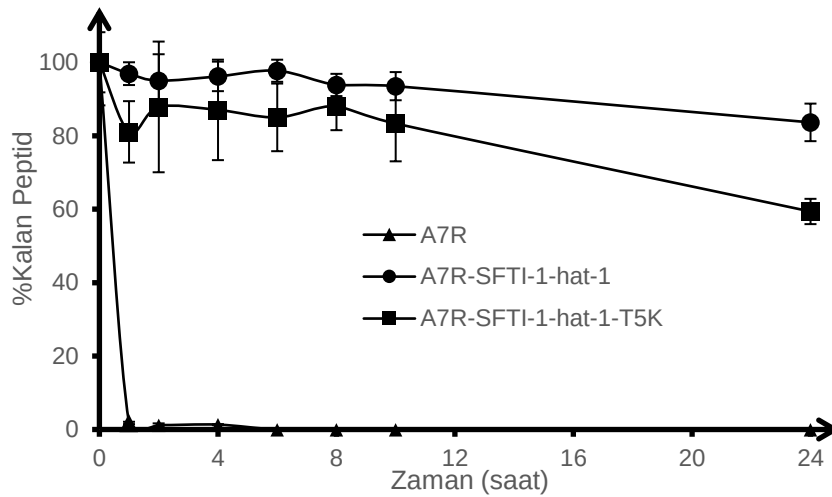
2014 yılında Cheneval vd. rapor ettikleri çalışmalarında olduğu gibi bu tez çalışmamızda da A7R-kalata B1-hat-6 peptidinin halkalaşma reaksiyonunun (reaksiyon süresi 3 saat) daha kolay gerçekleşmesi amacıyla sterik engelin az olacağı iki Gly amino asiti (Gly7 ve Gly8) arasında olması sağlanarak peptid sentezi gerçekleştirildi (Cheneval vd., 2014). Ancak bu ilk sentez denemesinde ürün elde edilemedi. Cheneval vd. rapor ettikleri çalışmalarında kalata B1 peptidinin iki farklı versiyonunun (D-kalata B1 ve [T20S]-kalata B1) halkalaşma reaksiyonu da Gly7 ve Gly8 amino asitleri arasında olmasını sağlamışlardır. Ancak A7R-kalata B1-hat-6 peptidinin bu iki peptidten farkı aşılınmış peptid olmasıdır. Aşılınmış peptidin sentezinde ürün elde edilememesinin sebebi yedi amino asit uzunluğundaki A7R peptidinin kalata B1'in 6. hattına aşılınmasıyla doğal kalata B1 yapısının değişmiş olması olabilir. İkinci sentezde ise yine sterik engelin az olması muhtemel amino asitler C-ve N-terminalleri olarak belirlenerek (sırasıyla Cys1 ve Gly2 amino asitleri) peptid sentezlendi. Halkalaşma tepkimesi süresinin reaksiyon verimine etkisi de çalışılmıştır. İkinci sentez ile elde edilen peptidin halkalaşması için altı saat ve 12 saat olmak üzere iki farklı reaksiyon süresi çalışıldı.

Kütle spektrometresi sonuçları incelendiğinde yalnızca bir fraksiyonda istenilen ürünün olduğu tespit edildi. Ancak liyofilizasyon sonrası diğer çalışmalarda kullanılacak kadar yeterli ürün elde edilemedi. Sentezlerde sekans uzunluğu arttıkça verimin düşmesi, halkalaştırma ve oksidasyon reaksiyonlarında yan ürünlerin daha fazla oluşması reaksiyon veriminin düşük olmasındaki sebepler olabilir.

5.2. PEPTİDLERİN SERUM KARARLILIKLARININ İNCELENMESİ

Başarılı bir şekilde sentezlenen peptidlerin (A7R, A7R-SFTI-1-hat-1 ve A7R-SFTI-1-hat-1-T5K) serum kararlılıkları %100 insan kan serumunda (Sigma Aldrich) 37 °C de inkübe edilerek analiz edildi (**Şekil 5.6**). Lineer ve kısa peptid yapısına sahip A7R peptidinin beklenildiği gibi yarım saatten kısa sürede bozunduğu görüldü. Peptidin kararlılığı daha önceden ispatlanmış halkalı SFTI-1 peptidinin 1. hattına aşılması ile elde edilen iki yeni peptid olan A7R SFTI-1-hat-1 ve A7R SFTI-1-hat-1-T5K peptidleri ise sırasıyla %84 ve %60 oranında serum içerisinde bozunmadan kalmıştır. Sentez sonrası halkalı yapı ve bir adet disülfid köprüsü ile her iki aşılınmış peptid de A7R peptidine göre olağanüstü bir kararlılık gösterdi.

Şekil 5.6: Peptidlerin İnsan Kan Serumundaki Stabiliteleri.



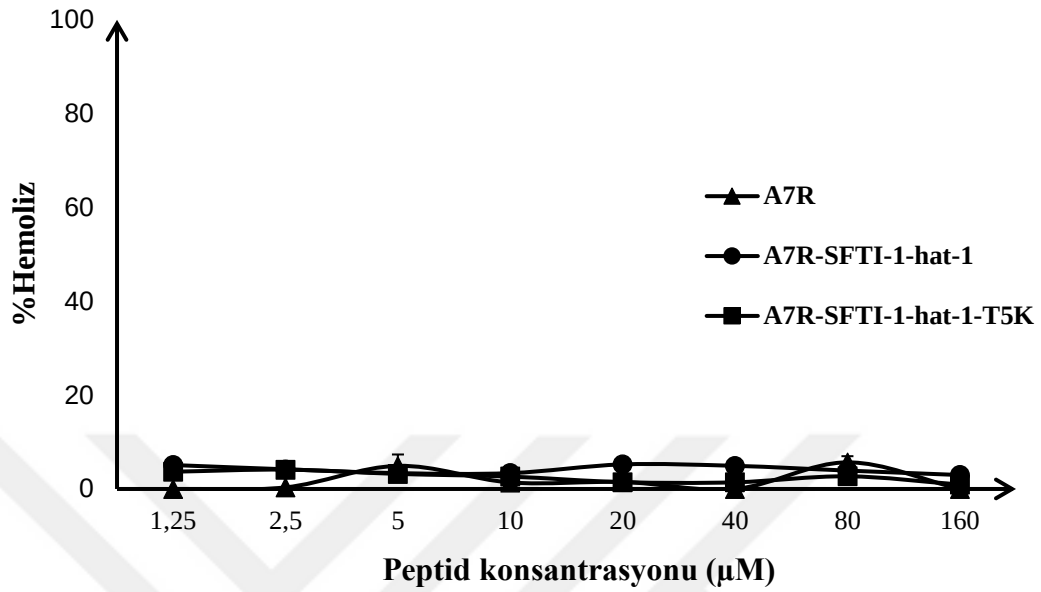
2016 yılında Ying ve arkadaşları %25 fare serumu ile yaptıkları kararlılık çalışmalarında A7R peptidinin iki saat sonunda serum içerisinde tamamen parçalandığını, peptidin halkalı halinin ise 12. saate %50 oranında bozunmadan kalabildiğini rapor

etmişlerdir. 2017 yılında Zhang ve Lu'nun rapor ettikleri çalışmada ise D-A7R peptidinin %50 fare serumu ile yapılan kararlılık çalışmasında peptidin enzimatik parçalanmaya karşı dayanıklı olduğunu rapor edilmişlerdir (Zhang ve Lu, 2017). Masłowska ve arkadaşları tarafından rapor edilen çalışmada ise A7R peptidini ve peptidomimetliğini radyonüklidler ile konjuge ettiklerinde, her iki molekülün de yetersiz kararlılığı vurgulanmaktadır (Masłowska vd., 2022). Bu tez çalışmamızda, aşılana peptidlerin serum kararlılıkları için literatürden farklı olarak %25 ve %50'lik fare serumu yerine %100 insan kan serumu kullanıldı. Daha konsantre serum örneğinde A7R peptidi beklenildiği gibi çok kısa sürede tamamen bozunurken, aşılana her iki peptidin de 24 saatin sonunda sırasıyla %84 ve %60 oranlarında bozunmadan kaldığı görüldü. Bu sebeple, SFTI-1 peptidi üzerine aşılana peptidlerin *in vitro* kararlılık testlerinde istenilen sonuçlar elde edildi.

5.3. PEPTİDLERİN HEMOLİTİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Sentezlenen peptidlerin eritrosit hücrelerine karşı toksik etkilerinin olup olmadığı hemolitik aktivite deneyi ile belirlendi. Peptidler 1,25 - 160 μ M arasında sekiz farklı konsantrasyonda üç tekrarlı olarak analiz edildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak %100 hemolize sebep olan Triton X-100 ve negatif kontrol olarak da PBS kullanıldı. Sentezlenen peptidlerin farklı konsantrasyonlardaki hemolitik aktiviteleri **Şekil 5.7**'de verilmiştir. Test edilen peptid konsantrasyonlarında A7R ve aşılana versiyonlarının en yüksek konsantrasyonda (160 μ M) dahi hemolitik aktivitesinin olmadığı gözlemlendi.

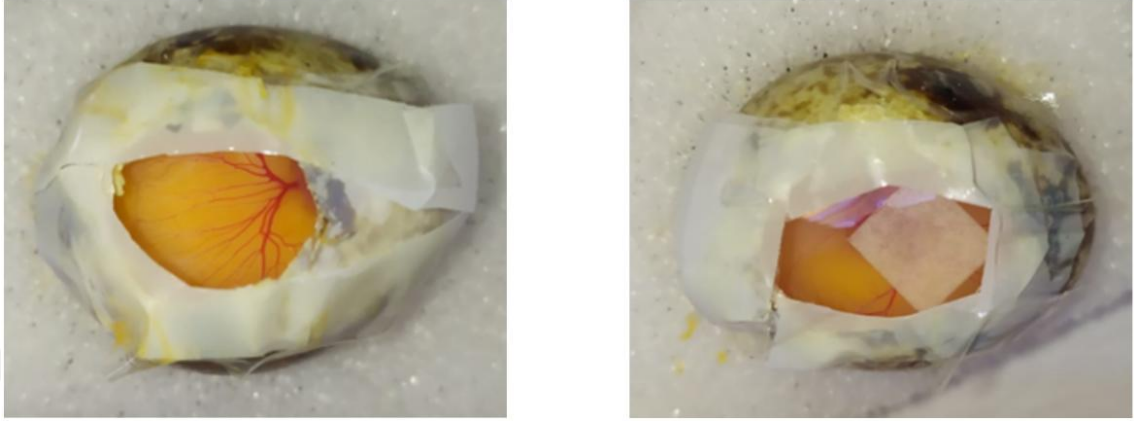
Şekil 5.7: Peptitlerin Hemolitik Aktiviteleri.



5.4. PEPTİDLERİN ANTİANJİYOGENİK AKTİVİTELERİNİN KORİYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) DENEYİ İLE İNCELENMESİ

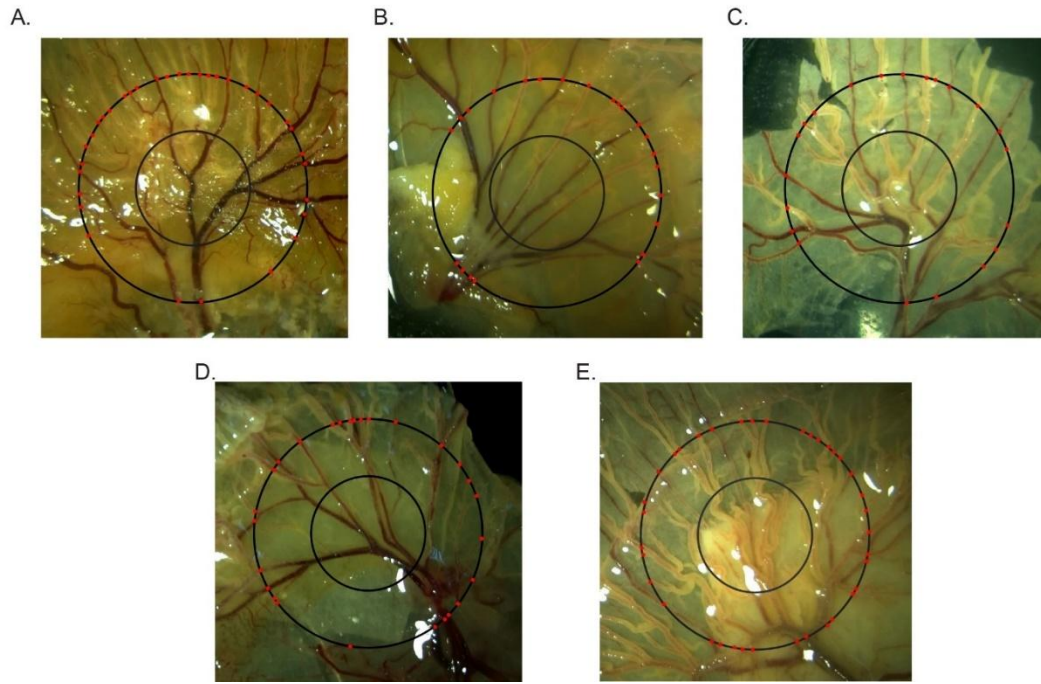
Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşmasıdır ve tümörün büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırır. Antianjiyogenik etki gösteren bileşikler tümörün büyümesini ve yayılmasını geciktirebilir. Bu tez çalışmasında antianjiyogenik etki gösteren A7R peptidi ve aşılınmış versiyonlarının antianjiyogenik aktiviteleri koriyoallantoik membran (CAM) deneyi ile incelendi. Deney kapsamında döllenmiş bıldırcın yumurtaları kullanıldı. Yöntem Bölüm 3.2.5'teki protokoller uygulanarak peptidlerin etkileri incelenmiştir (**Görsel 5.1**).

Görsel 5. 1: Peptidlerin Antianjiyogenik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Bıldırcın Yumurtalarına İki Örnek.Yumurta kabuğunda açılan pencere (solda) ve filtre kağıdına emdirilmiş numune çözeltisinin yumurtaya uygulanması (sağda) gösterilmektedir.



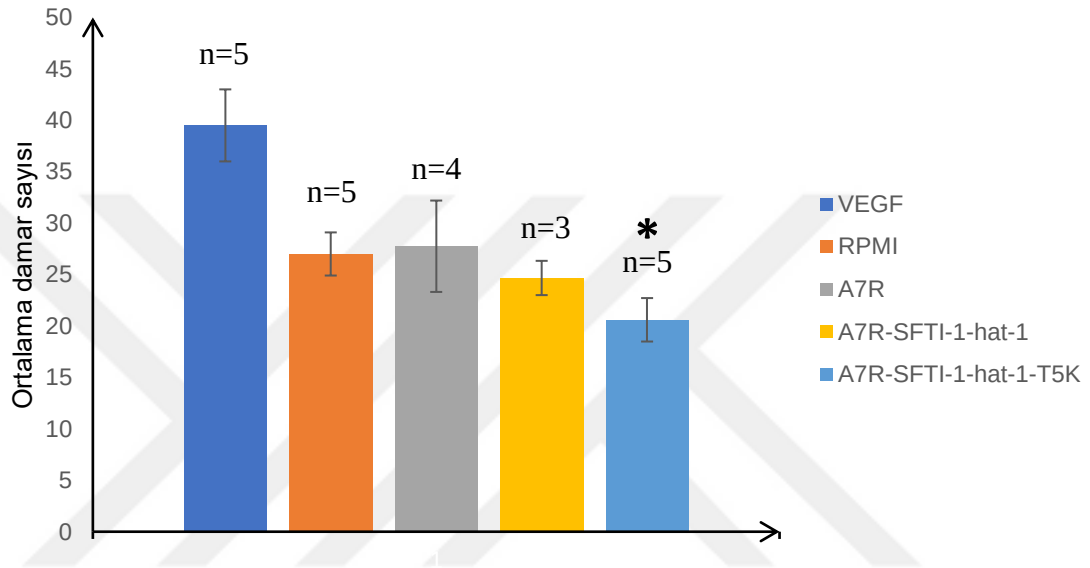
İnkübasyon sonrası glutaraldehit ile fiks edilen kısım kesilerek stereo mikroskop ile görüntülendi. Görüntüler bilgisayar ortamına kaydedilerek kan damarlarının sayımı gerçekleştirildi. Kan damarlarının sayımında görüntü üzerinde 4 cm çapında bir daire çizildi ve bu dairenin damarları kestiği noktalar sayılarak karşılaştırma yapıldı (Şekil 5.8).

Şekil 5.8: Damarların Sayımını Gösteren Her Bir Numuneye Ait Temsili Görüntüler. Antianjiyogenik aktiviteler **A.** A7R. **B.** A7R-SFTI-1-hat-1 **C.** A7R-SFTI-1-hat-1-T5K, **D.** RPMI ve **E.** VEGF çözeltileri ile inkübe edilmiş yumurtaların koriyoallantoik membranlarındaki damarların 4 cm'lik çapta dairenin kestiği noktaların sayılması ile incelendi. VEGF'nin yoğun şekilde kan damarı oluşumunu indüklediği, A7R-SFTI-1-hat-1-T5K'nın ise kan damarı oluşumunu yavaşlattığı görülmektedir.



Çalışma sonunda her iki aşılınmış peptidin etkisi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında aşılınmış peptidlerin antianjiyogenik etki gösterdiği anlaşıldı. Aşağıdaki grafikte (**Şekil 5.9**) pozitif kontrol VEGF, negatif kontrol RPMI ve sentezlenen peptidlerin yumurtada inkübasyon sonrası damar sayıları verilmiştir.

Şekil 5.9: Peptidlerin Antianjiyogenik Aktiviteleri. Her peptid negatif kontrol RPMI medyumunu ile karşılaştırıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verilmiştir. Hesaplamalar ve grafik çizimi MS Excel programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler için one-way ANOVA (MS Excel) ve unpaired t test analizleri kullanıldı (GraphPad Prism Deneme Sürümü 10.0.3). * $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.



2000 yılında A7R peptidinin insan endotel hücrelerinin VEGF aracılı proliferasyonunu inhibe ettiğini ve *in vivo* koşullarda (tavşan korneal modellerinde) VEGF indüklü anjiyogenezini tamamen ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir (Tournaire vd., 2000). 2016 yılında SFTI-1 peptidine antianjiyogenik epitopların aşılandığı bir çalışmada CAM deneyi ile SFTI-1'in anjiyogenez üzerindeki etkisi araştırılmış ve SFTI-1'in anjiyogenik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Chan vd., 2016). Tavşan korneal modelinden farklı olarak koriyoallantoik membran (CAM) deney modelinin kullanıldığı bu tez çalışmasında ise A7R peptidinin antianjiyogenik aktivitesinin sınırlı olduğu (RPMI medyumunu ile benzer) olduğu görüldü. Sonuç olarak A7R peptidinin antianjiyogenik aktivitesinin test edildiği bu iki çalışmada kullanılan deney modellerinin farklı olması, aktivite sonuçlarının da farklı olmasının temel sebebi olabilir. Aşılanmış A7R-SFTI-1-Loop1 ve A7R-SFTI-1-Loop1-T5K peptidlerinin ise CAM deneyinde antianjiyogenik aktivitelerinin olduğu görüldü. Bu aşıl原因 iki peptidin de antianjiyogenik aktivitesi

lineer peptide göre iyileştirilmiştir. Ayrıca, A7R-SFTI-1-Loop1-T5K aşılınmış peptidinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde antianjiyogenik aktivitesinin olduğu görüldü.

Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Tümör dokuları büyüebilmesi için ekspre ettikleri markırlar ile kendilerine yeni kan damarları oluşturma eğilimindedirler. Bu çalışmanın amacı anjiyogenezi engelleyen antianjiyogenik A7R peptidinin düşük olan serum stabilitesini stabilitesi daha önceden ispatlanmış SFTI-1 peptid omurgasına aşılama yolu ile arttırmak ve böylece hem stabil hem de antianjiyogenik aktiviteye sahip yeni aşılınmış peptidler üretmektir. ATWLPPR amino asit sekansına sahip A7R peptidi aşılama yöntemi ile SFTI-1 peptidinin birinci hattına aşılandı. Peptidlerin serum stabiliteleri ve anjiyogenik aktiviteleri test edildi. Sonuç olarak A7R peptidinin aşılınmış versiyonlarının antianjiyogenik aktiviteye sahip ve A7R peptidine göre çok daha iyi serum stabilitesine sahip peptidler olduğu sonucu elde edildi. Sentezlenen peptidlerin serum içerisinde parçalanmadan hedeflerine ulaşarak antianjiyogenik aktivite gösterdikleri görüldü.

KAYNAKÇA

- Abdul Ghani, H., vd. (2017). Structural and functional characterization of chimeric cyclotides from the Möbius and trypsin inhibitor subfamilies. *Peptide Science*, 108(1), 22927. doi:<https://doi.org/10.1002/bip.22927>
- Archer, B. L. (1960). The proteins of Hevea brasiliensis Latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. *The Biochemical journal*, 75, 236–240. doi:10.1042/bj0750236
- Arun Chandra Manivannan vd. (2022). Phage in cancer treatment – Biology of therapeutic phage and screening of tumor targeting peptide. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 19(7), 873–882. doi:10.1080/17425247.2022.2094363
- Azzazy, H. M. E. ve Highsmith, W. E. (2002). Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, 35(6), 425–445. doi:10.1016/S0009-9120(02)00343-0
- Bedi, D., vd. (2011). Delivery of siRNA into breast cancer cells via phage fusion protein-targeted liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(3), 315–323. doi:10.1016/j.nano.2010.10.004
- Beintema, J. J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters*, 350(2–3), 159–163. doi:10.1016/0014-5793(94)00753-5
- Binetruy-Tournaire, vd. (2000). Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO Journal*, 19(7), 1525–1533.
- Boger, D. L., vd. (2001). Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP2 to integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. *Journal of the American Chemical Society*, 123(7), 1280–1288. doi:10.1021/ja003579+
- Bray, F., vd. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 74(3): 229-263. doi:10.3322/caac.21834
- Broekaert, W. F., vd. (1997). Antimicrobial Peptides from Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 297–323. doi:10.1080/07352689709701952

- Broekaert, W. F., vd. (1995). Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, 108(4), 1353–1358. doi:10.1104/pp.108.4.1353
- Burton, D. R. (1995). Phage display. *Immunotechnology*, 1(2), 87–94. doi:10.1016/1380-2933(95)00013-5
- Chan, L. Y., vd. (2015). Cyclic thrombospondin-1 mimetics: Grafting of a thrombospondin sequence into circular disulfide-rich frameworks to inhibit endothelial cell migration. *Bioscience Reports*, 35(6), 1–12. doi:10.1042/BSR20150210
- Chang, C., vd. (2023). Engineered M13 phage as a novel therapeutic bionanomaterial for clinical applications: From tissue regeneration to cancer therapy. *Materials Today Bio*, 20, 100612. doi:10.1016/j.mtbio.2023.100612
- Chen, Y. C., vd. (2008). Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in *Ipomoea batatas* leaves activate the expression of the defense gene sporamin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11469–11476. doi:10.1074/jbc.M709002200
- Cheneval, O., vd. (2014). Fmoc-Based Synthesis of Disulfide-Rich Cyclic Peptides. *The Journal of Organic Chemistry*, 79(12), 5538–5544. doi:10.1021/jo500699m
- Choi, M. S., vd. (2009). Expression of BrD1, a plant defensin from *Brassica rapa*, confers resistance against brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rices. *Molecules and Cells*, 28(2), 131–137. doi:10.1007/s10059-009-0117-9
- Craik, D. J., vd. (2006). The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers*, 84(3), 250–266. doi:10.1002/bip.20451
- Craik, D. J., vd. (2013). The Future of Peptide-based Drugs. *Chemical Biology & Drug Design*, 81(1), 136–147. doi:https://doi.org/10.1111/cbdd.12055
- Daly, N. L., vd. (2013). Structural insights into the role of the cyclic backbone in a squash trypsin inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, 288(50), 36141–36148. doi:10.1074/jbc.M113.528240

- Daly, N. L., vd. (2004). The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1. *FEBS Letters*, 574(1–3), 69–72. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.007
- Dardevet, L., vd. (2015). Chlorotoxin: A helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion. *Toxins*, 7(4), 1079–1101. doi:10.3390/toxins7041079
- Davies, M., vd. (2021). Semaglutide 2·4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 397(10278), 971–984. doi:10.1016/S0140-6736(21)00213-0
- Erak, M., vd. (2018). Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2759–2765. doi:10.1016/j.bmc.2018.01.012
- Fouad, Y. A. & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016–1036.
- Gao, S., Yao, X. & Yan, N. (2021). Structure of human Cav2.2 channel blocked by the painkiller ziconotide. *Nature*, 596(7870), 143–147. doi:10.1038/s41586-021-03699-6
- García-Olmedo, F., vd. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47(6), 479–491. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K
- Gerlach, S. L., vd. (2010). Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin 02 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. *Biopolymers*, 94(5), 617–625. doi:10.1002/bip.21435
- Gran, L. (1973). On the Effect of a Polypeptide Isolated from “Kalata-Kalata” (*Oldenlandia affinis* DC) on the Oestrogen Dominated Uterus. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 33(5–6), 400–408. doi:https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1973.tb01541.x
- Gran, L., Sandberg, F. & Sletten, K. (2000). *Oldenlandia affinis* (R and S) DC: A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 197–203. doi:10.1016/S0378-8741(99)00175-0

- Guzmán-Rodríguez, J. J., vd (2013). Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2013, 986273. doi:10.1155/2013/986273
- Hariharan, S., vd. (2007). Assessment of the biological and pharmacological effects of the $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology*, 18(8), 1400–1407. doi:10.1093/annonc/mdm140
- Heo, Y. A. (2023). Flotufolastat F 18: Diagnostic First Approval. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 27(5), 631–636. doi:10.1007/s40291-023-00665-y
- Hetian, L., vd. (2002). A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43137–43142. doi:10.1074/jbc.M203103200
- Jacob, S. E. & James, W. D. (2024). From Road Rash to Top Allergen in a Flash: Bacitracin. *Dermatologic Surgery* 30(4), 521-524. doi: 10.1111/j.1524-4725.2004.30168.x
- Jalil, A. T., vd. (2023). Peptide-Based Therapeutics in Cancer Therapy. *Molecular Biotechnology*, 66(10), 2679–2696. doi:10.1007/s12033-023-00873-1
- Kalo, K., vd. (2019). Chemotherapy Safety: Reducing Errors With a Nurse-Led Time-Out Process. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 23(2), 197–202. doi:10.1188/19.CJON.197-202
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 29-32,51-55. doi:10.1016/0263-7855(96)00009-4
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y. & Nesmelova, I. V. (2020). Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–23. doi:10.3390/ijms21155307
- Lay, F. & Anderson, M. (2005). Defensins - Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85–101.

doi:10.2174/1389203053027575

- Lu, L., vd. (2019). The functions and applications of A7R in anti-angiogenic therapy, imaging and drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(6), 595–608. doi:10.1016/j.ajps.2019.04.004
- Luckett, S., vd. (1999). High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *Journal of Molecular Biology*, 290(2), 525–533. doi:10.1006/jmbi.1999.2891
- Masłowska, K., vd. (2022). Synthesis, Physicochemical and Biological Study of Gallium-68- and Lutetium-177-Labeled VEGF-A(165)/NRP-1 Complex Inhibitors Based on Peptide A7R and Branched Peptidomimetic. *Pharmaceutics*, 14(1), 100. doi:10.3390/pharmaceutics14010100
- Mazurkiewicz-Pisarek, A., Baran, J. & Ciach, T. (2023). Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 9031. doi:10.3390/ijms24109031
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. doi:10.1021/ja00897a025
- Mulvenna, J. P., Wang, C. & Craik, D. J. (2006). CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic acids research*, 34, 192–194. doi:10.1093/nar/gkj005
- Muratspahić, E., vd. (2021). Design of a Stable Cyclic Peptide Analgesic Derived from Sunflower Seeds that Targets the κ -Opioid Receptor for the Treatment of Chronic Abdominal Pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(13), 9042–9055. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00158
- Ndinguri, M. W., vd. B. (2012). Peptide-based selective inhibitors of matrix metalloproteinase-mediated activities. *Molecules*, 17(12), 14230–14248. doi:10.3390/molecules171214230
- Nguyen, G. K. T., vd. (2011). Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide

- domains in the fabaceae family. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 24275–24287. doi:10.1074/jbc.M111.229922
- Noy, A., vd. (2005). Angiogenesis inhibitor IM862 is ineffective against AIDS-Kaposi's sarcoma in a phase III trial, but demonstrates sustained, potent effect of highly active antiretroviral therapy: From the AIDS malignancy consortium and IM862 study team. *Journal of Clinical Oncology*, 23(5), 990–998. doi:10.1200/JCO.2005.11.043
- Oard, S., Rush, M. C. & Oard, J. H. (2004). Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 169–180. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x
- Oguntade, A. S., vd. (2021). Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: the magic bullet. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1), 15. doi:10.1186/s43046-021-00072-6
- Oliveira-Lima, M., vd. (2017). Snakin: Structure, Roles and Applications of a Plant Antimicrobial Peptide. *Current Protein & Peptide Science*, 18(4), 368 - 374. doi:10.2174/1389203717666160619183140
- Olivera, B. M., vd. (1985). Peptide Neurotoxins from Fish-Hunting Cone Snails. *Science*, 230(4732), 1338–1343. doi:10.1126/science.4071055
- Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *Journal of Cell Biology*, 130(5), 1189–1196. doi:10.1083/jcb.130.5.1189
- Pinto, M. F. S., vd. (2012). Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 134–147. doi:10.1074/jbc.M111.294009
- Plan, M. R. R., Saska, I., Cagauan, A. G. & Craik, D. J. (2008). Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(13), 5237–5241. doi:10.1021/jf800302f
- Porto, W. F. & Franco, O. L. (2013). Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. *Peptides*, 44, 163–167. doi:10.1016/j.peptides.2013.03.014
- Pratley, R. E., vd. (2014). Once-weekly albiglutide versus once-daily liraglutide in

- patients with type 2 diabetes inadequately controlled on oral drugs (HARMONY 7): a randomised, open-label, multicentre, non-inferiority phase 3 study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(4), 289–297. doi:10.1016/S2213-8587(13)70214-6
- Pung, H. S., vd. (2023). Generation of peptides using phage display technology for cancer diagnosis and molecular imaging. *Molecular Biology Reports*, 50(5), 4653–4664. doi:10.1007/s11033-023-08380-x
- Qiu, Y., vd. (2017). An Orally Active Bradykinin B1 Receptor Antagonist Engineered as a Bifunctional Chimera of Sunflower Trypsin Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(1), 504–510. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01011
- Rasmussen, U. B., vd. (2002). Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Therapy*, 9(7), 606–612. doi:10.1038/sj.cgt.7700476
- Ratnayake, R., vd. (2008). Acremolides A-D, lipodepsipeptides from an Australian marine-derived fungus, *Acremonium* sp. *Journal of natural products*, 71(3), 403–408. doi:10.1021/np070589g
- Ripamonti, C. I., Bandieri, E. & Roila, F. (2011). Management of cancer pain: ESMO clinical practice guidelines. *Annals of Oncology*, 22, 69-71. doi:10.1093/annonc/mdr390
- Roth, L., vd. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Molecular biology of the cell*, 19(2), 646–654. doi:10.1091/mbc.e07-06-0625
- Ruoslahti, E. P. M. (1987). New Perspectives in Cell Adhesion. *Science*, 235, 1286. doi: 10.1126/science.2821619.
- Saether, O., vd. (1995). Elucidation of the Primary and Three-Dimensional Structure of the Uterotonic Polypeptide Kalata B1. *Biochemistry*, 34(13), 4147–4158. doi:10.1021/bi00013a002
- Segura, A., vd. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(1), 16–23. doi:10.1094/MPMI.1999.12.1.16
- Segura, A., vd. (1998). Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*, 435(2–3), 159–162. doi:10.1016/S0014-5793(98)01060-6

- Sharma, K., vd. (2023). Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug Discovery Today*, 28(2), 103464. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103464>
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317. doi:[10.1126/science.4001944](https://doi.org/10.1126/science.4001944)
- Simmaco, M., vd. (1990). Purification and characterization of bioactive peptides from skin extracts of *Rana esculenta*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1033(3), 318–323. doi:[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90140-R](https://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90140-R)
- Singh, N., vd. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18(3), 121–126. doi:[10.4103/aam.aam_56_18](https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18)
- Slazak, B., vd. (2018). How does the sweet violet (*viola odorata* l.) fight pathogens and pests – cyclotides as a comprehensive plant host defense system. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1296. doi:[10.3389/fpls.2018.01296](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01296)
- Son, D. J., vd. (2006). Melittin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through Induction of Apoptosis via Suppression of Nuclear Factor- κ B and Akt Activation and Enhancement of Apoptotic Protein Expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 627–634. doi:[10.1124/jpet.105.095901](https://doi.org/10.1124/jpet.105.095901)
- Swedberg, J. E., vd. (2017). Design of potent and selective cathepsin G inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor-1 scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(2), 658–667. doi:[10.1021/acs.jmedchem.6b01509](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01509)
- Swedberg, J. E., vd. (2009). Substrate-Guided Design of a Potent and Selective Kallikrein-Related Peptidase Inhibitor for Kallikrein 4. *Chemistry and Biology*, 16(6), 633–643. doi:[10.1016/j.chembiol.2009.05.008](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.05.008)
- Tam, J. P., vd. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8913–8918. doi:[10.1073/pnas.96.16.8913](https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8913)
- Tam, J. P., vd. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711–

757. doi:10.3390/ph8040711

- Terras, F. R. G., vd. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15301–15309. doi:10.1016/s0021-9258(19)49534-3
- Ying, M., vd. (2016). Stabilized Heptapeptide A7R for Enhanced Multifunctional Liposome-Based Tumor-Targeted Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(21), 13232–13241. doi:10.1021/acsami.6b01300
- Wang, C. K. L., vd. (2008). CyBase: A database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Research*, 36(1), 206–210. doi:10.1093/nar/gkm953
- Wijaya, R., vd. (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science*, 159(2), 243–255. doi:10.1016/S0168-9452(00)00348-4
- Witt, H., vd. (2009). Identification of a rhabdomyosarcoma targeting peptide by phage display with sequence similarities to the tumour lymphatic-homing peptide LyP-1. *International Journal of Cancer*, 124(9), 2026–2032. doi:10.1002/ijc.24170
- Zhou, L., Xu, N., Sun, Y. & Liu, X. M. (2014). Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. *Cancer Letters*, 352(2), 145–151. doi:10.1016/j.canlet.2014.06.020

DİZİN**A**

A7R, i, v, vi, vii, ix, xii, 3, 9, 26, 27,
38, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54,
60

H

Hemolitik aktivite, vi

C

CAM, vi, vii, ix, 40, 52

S

SFTI-1, viii, xi, xii, 16, 17, 27, 46, 47,
50, 54

T

Terapötik peptidler, v, 8