

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**DE NOVO ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLERİN
TASARIMI, *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)
EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT ÜRETİMİ
ve AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Hazırlayan
Şeyma AYDIN

Danışman
Prof. Dr. Zülal KESMEN

Doktora Tezi

Eylül 2023
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**DE NOVO ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLERİN
TASARIMI, *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)
EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT ÜRETİMİ
ve AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)**

Hazırlayan
Şeyma AYDIN

Danışman
Prof. Dr. Zülal KESMEN

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FDK-2021-10982 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2023
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Şeyma AYDIN

İmza

“De Novo Antimikrobiyal Peptidlerin Tasarımı, *Pichia pastoris* (*Komagetaella phafii*) Ekspresyon Sisteminde Rekombinant Üretimi ve Aktivitelerinin Belirlenmesi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Şeyma AYDIN

İmza

Danışman

Prof. Dr. Zülal KESMEN

İmza

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Zülal KESMEN

İmza

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı benden esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. ZülaL KESMEN'e,

Tezim süresince değerli yorumları ve yönlendirmeleri ile beni aydınlatan tez izleme komitesi üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Hasan YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ'a, Tez savunmama katılarak kritik yapıcı eleştirileriyle tezime katkı sağlayan değerli jüri üyeleri Prof. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Mine Erdem BÜYÜKKİRAZ'a,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli çalışma arkadaşlarım Melike CANPOLAT, Gülsüm BATMAN, Esra ÖZBEKAR ve Dilara HERDEM'e,

Hayatımın her anında maddi ve manevi olarak beni daima destekleyen, her zaman moral ve cesaret veren annem Elmas ERGENÇ, babam Metin ERGENÇ, eşim Kadir AYDIN, kardeşim Seda ŞAHİN ve Ümit ŞAHİN'e ve dualarıyla yanımda olan yiğenlerim Elifay, Aselay ve Eminay ŞAHİN'e ve tüm yakınlarıma,

Bu çalışmayı, FDK-2021-10982 kodlu doktora tez projesi ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve laboratuvar olanakları ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne teşekkür ederim.

Şeyma AYDIN

Eylül 2023, KAYSERİ

**DE NOVO ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLERİN TASARIMI, *Pichia pastoris*
(*Komagataella phaffii*) EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT ÜRETİMİ
ve AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Şeyma AYDIN

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Eylül 2023
Danışman: Prof. Dr. Zülal KESMEN**

ÖZET

Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olup, tek hücreli mikroorganizmalardan böcekler, amfibiler ve memeliler gibi çok hücreli organizmalara kadar hemen hemen tüm canlılar tarafından sentezlenebilmektedir. AMP'lerin bakteriler, mantarlar, virüsler, parazitler ve kanserli hücrelere karşı inhibitör etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Ancak, AMP'ler geniş spektrumlu yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde umut verici moleküller olarak görülse de, terapötik veya diğer uygulamalarda kullanımlarını sınırlandıran toksisite, düşük stabilite ve yüksek üretim maliyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır. AMP'lerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri ile biyolojik aktiviteleri arasında doğrudan bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Doğal AMP'lerin yapısal özelliklerinin değiştirilmesiyle antimikrobiyal aktivitelerinin geliştirilebildiği özellikle *de novo* tasarlanmış peptidlerin bu zorlukların üstesinden gelmede başarılı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, öncelikli olarak *de novo* peptidlerin tasarımına yönelik motif tabanlı bir tasarım stratejisi geliştirilerek yüksek antimikrobiyal etki ve stabiliteye sahip peptid dizileri tasarlanmıştır. Daha sonra tasarlanan bu peptidleri kodlayan DNA fragmentleri, pPICZαA ekspresyon vektörüne bağlandıktan sonra *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmış ve *P. pastoris* konak hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında tasarlanan ve rekombinant yöntemle üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin antimikrobiyal aktiviteleri *B. cereus* (ATCC 33019), *B. cereus* (ATCC 11778), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (ATCC 43300), *S. aureus* (ATCC 25223), *S. aureus* (ATCC 29213),

A.baumannii (klinik İzolat), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), *E. coli* (ATCC 25922), *E. cloacae* (ATCC 13047), *E. sakazakii* (klinik İzolat), *K. pneumoniae* (klinik İzolat), *P. aeruginosa* (klinik İzolat), *S. Typhimurium* (ATCC 1428), *Y.enterocolitica* (ATCC 27729), *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911), *C. albicans* (ATCC 1223), *C. albicans* (ATCC 90029), *C. glabrata* (klinik izolat) olmak üzere 19 mikroorganizma üzerinde test edilmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin her ikisinin de Gram-pozitif bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri 0.25->128 µg/ml iken; Gram-negatif bakterilere karşı sırasıyla 8-64 µg/ml ve 4-8 µg/ml aralığında bulunmuştur. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin test edilen patojenik maya suşlarına karşı MİK değerlerinin ise sırasıyla 32-64 µg/ml ve 8-16 µg/ml aralığında değiştiği gösterilmiştir. MİK analiz sonuçlarına göre rL12-22-6His peptidinin rL12-49-6His peptidine kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hemolitik aktiviteleri fare eritrositine karşı test edilmiştir. Her iki peptidin de ≥ 8 µg/ml konsantrasyonlarda % 98'e yakın hemolitik etki gösterdiği belirlenmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin sıcaklık stabilite testi sonucunda 4°C ve 24°C'de 1 saatlik muameleden sonra *E. coli* ATCC suşuna karşı tespit edilen inhibisyon zon çaplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmazken, 65°C ve 95°C'de 1 saat ısıtma işlemine maruz bırakılan peptidlerinin zon çapında 24°C'ye kıyasla sırasıyla %6'lık ve %16'lık bir küçülme olmuştur. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin proteaz enzimi ile muamale edildikten sonra *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı belirlenen inhibisyon zon çaplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, tez çalışmasında, yüksek antimikrobiyal aktivite ve stabiliteye sahip peptid dizileri tasarlanmış ve rekombinant yöntemle üretilmiştir. Üretilen peptidlerin gıda, tıp, hayvancılık ve veterinerlik gibi alanlarda kullanım potansiyelinin olduğu düşünülmekle birlikte hemolitik aktivitesinin düşürülmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: AMP, *de novo*, rekombinant peptid, motif tabanlı yaklaşımlar, *Pichia pastoris* ekspresyonu

DESIGN of *DE NOVO* ANTIMICROBIAL PEPTIDES, RECOMBINANT PRODUCTION IN THE EXPRESSION SYSTEM of *Pichia pastoris* (*Komagetaella phaffii*) and DETERMINATION of THEIR ACTIVITIES

Şeyma AYDIN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, September 2023

Supervisor: Prof. Dr. Zülal KESMEN

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important part of the innate immune system and can be synthesized by almost all living organisms, from microorganisms to multicellular organisms such as insects, amphibians, and mammals. AMPs have been found to have an inhibitory effect against bacteria, fungi, viruses, parasites and cancer cells. Although AMPs are considered promising molecules for the development of new antimicrobial agents with broad spectrum activity, they have drawbacks such as toxicity, low stability, and high production costs that limit their use in therapeutic or other applications. It was found that there is a direct relationship between the structural and physicochemical properties of AMPs and their biological activities. It is well known that the antimicrobial activities of natural AMPs can be improved by altering their structural properties, and *de novo* designed peptides in particular have been successful in overcoming these difficulties. Therefore, in this thesis study, peptide sequences with high antimicrobial activity and stability were designed by developing a motif-based design strategy mainly for *de novo* peptide design. Subsequently, DNA fragments encoding these designed peptides were cloned into *E. coli* DH5 α cells after ligation into the pPICZ α A expression vector and expressed in *P. pastoris* host cells.

The antimicrobial activities of rL12-49-6His and rL12-22-6His peptides developed and recombinantly produced in this work were tested against 19 microorganisms including *B. cereus* (ATCC 33019), *B. cereus* (ATCC 11778), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (ATCC 43300), *S. aureus* (ATCC 25223), *S. aureus* (ATCC 29213), *A. baumannii* (clinical Isolate), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), *E. coli* (ATCC 25922), *E. cloacae* (ATCC 13047), *E. sakazakii* (clinical Isolate), *K.*

pneumoniae (clinical Isolate), *P. aeruginosa* (clinical Isolate), *S. Typhimurium* (ATCC 1428), *Y. enterocolitica* (ATCC 27729), *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911), *C. albicans* (ATCC 1223), *C. albicans* (ATCC 90029), *C. glabrata* (clinical isolate). rL12-49-6His and rL12-22-6His peptides both exhibited minimum inhibitory concentrations (MIC) against Gram-positive bacteria of 0.25-128 µg/ml; against Gram-negative bacteria, values were found in the range of 8-64 µg/ml and 4-8 µg/ml, respectively. rL12-49-6His and rL12-22-6His peptides shown antimicrobial activity against pathogenic yeast strains tested in 32-64 µg/ml and 8-16 µg/ml, respectively. According to the results of MIC analysis, rL12-22-6His exhibited higher antimicrobial activity than rL12-49-6His. The hemolytic activities of rL12-49-6His and rL12-22-6His peptides were tested against mouse erythrocytes and both peptides were found to exhibit nearly 98% hemolytic activity at concentrations of ≥ 8 µg/ml. As a result of the temperature stability test of peptides rL12-49-6His and rL12-22-6His, no statistically significant difference in the diameters of the zones of inhibition against the *E. coli* ATCC strain was observed after one-hour treatment at 4°C and 24°C. The peptides subjected to one-hour heat treatment at 65°C and 95°C showed a 6% and 16% reduction in zone diameters, respectively, compared with 24°C. There was no statistically significant difference in the inhibition zone diameters of rL12-49-6His and rL12-22-6His peptides against *E. coli* ATCC 25922 strain after treatment with protease enzyme compared to the control. In conclusion, in this thesis, peptide sequences with high antimicrobial activity and stability were designed and produced by recombinant method. Although the peptides produced are considered to have potential for use in areas such as food, medicine, animal husbandry, and veterinary medicine, further studies are needed to reduce hemolytic activity.

Keywords: AMP, *De novo*, recombinant peptide, motif-based approaches, *Pichia pastoris* expression.

İÇİNDEKİLER

DE NOVO ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLERİN TASARIMI, *Pichia pastoris* (Komagataella phaffii) EKSPRESYON SİSTEMİNDE REKOMBİNANT ÜRETİMİ ve AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK	iii
KABUL VE ONAY	iv
ÖNSÖZ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
TABLolar LİSTESİ.....	xix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xxi
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Antimikrobiyal Peptidler ve Genel Özellikleri.....	6
1.2. Antimikrobiyal Peptidlerin Etki Mekanizmaları.....	10
1.3. Doğal Antimikrobiyal Peptidlerdeki Sorunlar.....	14
1.4. AMP'lerin Modifikasyonu	17
1.4.1.Yapı Aktivite İlişkisine Dayalı Yaklaşımlar	17
1.4.1.1. Konformasyon	17
1.4.1.2. Net yük.....	18
1.4.1.3. Hidrofobiklik	19
1.4.1.4. Amfipatiklik.....	22

1.4.1.5. Hidrofobik moment	22
1.4.2.Yapı Stabilité İlişkisi Dayalı Yaklaşımlar	23
1.4.2.1.Tuz Toleransı	23
1.4.2.2. Polar açı	25
1.4.2.3.Proteaz stabilitesi	25
1.4.3.Yapı Toksisite İlişkisine Dayalı Yaklaşımlar	27
1.5. Sentetik Antimikrobiyal Peptidlerin Yapı Aktivite İlişkisine Dayalı Tasarım Yaklaşımları	28
1.5.1. Dizi Şablonları	30
1.5.2. Doğal Peptidlerin Şablon Olarak Kullanıldığı Sekans Modifikasyonları ..	30
1.5.3.Bölgeye Yönelik Mutajenez.....	31
1.6.De novo Antimikrobiyal Peptid Tasarım Yaklaşımları	31
1.7. AMP Tasarımında Kullanılan Bilgisayar Destekli Yaklaşımlar	34
1.8. AMP'lerin Üretim Yöntemleri	37
1.8.1. Doğal Kaynaklardan Ekstraksiyon Yöntemi ile AMP Üretimi	37
1.8.2. Kimyasal Sentez Yöntemi ile AMP Üretimi	38
1.8.3. Rekombinant DNA Teknolojisi ile AMP Üretimi	39
1.8.3.1. Prokaryotik Ekspresyon Sistemlerinde AMP'lerin Üretimi	39
1.8.3.2. Bitki Ekspresyon Sistemlerinde AMP'lerin Üretimi	40
1.8.3.3. Maya Ekspresyon Sistemlerinde AMP'lerin Üretimi	40
1.9. AMP'lerin Gıda Sanayinde Kullanımı	43

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL	46
2.1.1 Mikroorganizma Suşları ve Vektör	46
2.1.2. Kültür Ortamları.....	47
2.1.3. Enzimler.....	48
2.1.4. Oligonükleotidler.....	48
2.1.5. Stok ve Tampon Çözeltiler	49
2.1.6. Sekans Analizi	49

2.1.7. Etik Kurul Onayı.....	49
2.2. YÖNTEM	49
2.2.1. Tez Çalışmasında Üretilen Peptidlerin Biyoinformatik Analizi	51
2.2.2. Peptid Dizilerinin Tasarımı.....	52
2.2.2.1. Peptid Verisetindeki Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi	52
2.2.2.2. <i>De novo</i> Peptid Dizilerinin Tasarımında Kullanılacak Başlangıç Sekansının Oluşturulması.....	56
2.2.2.3 Üretimde Kullanılan Peptidlerin Seçimi.....	58
2.2.3. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Tespiti ve Kodon Optimizasyonu	60
2.2.4. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Üretimi	61
2.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü	64
2.2.6. Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması.....	64
2.2.6.1. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Fragmentlerinin ve Ekspresyon Vektörünün Ligasyona Hazırlanması.....	64
2.2.6.2. Ligasyon.....	66
2.2.7. Rekombinant Plazmitlerin <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinde Klonlanması	67
2.2.7.1. Kompetent <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinin Hazırlanması	67
2.2.7.2. Rekombinant pPICZ α A Plazmidlerinin ve Boş pPICZ α A Vektörünün Kompetent <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinde Klonlaması	68
2.2.7.3. <i>E. coli</i> DH5 α Klonlarını Doğrulanması.....	68
2.2.7.3.1. <i>E. coli</i> DH5 α Klonlarından Plazmid DNA izolasyonu	68
2.2.7.3.2. Plazmid DNA'ların PCR ile Kontrolü	69
2.2.7.3.3. Plazmid DNA'ların Sekans Analizi ile Kontrolü	70
2.2.8. <i>P. pastoris</i> GS115 Hücrelerine Transformasyon	70
2.2.8.1. Rekombinant Plazmidlerin Linear Hale Getirilmesi	70
2.2.8.2. <i>P. pastoris</i> GS115 Hücrelerinin Transformasyona Hazırlanması	71
2.2.8.3. Kompetent <i>P. pastoris</i> GS115 Hücrelerine Transformasyon	72
2.2.8.4. <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarının Doğrulanması ve Transkripsiyon Kontrolü	73
2.2.8.4.1. <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarından DNA İzolasyonu	73
2.2.8.4.2. <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarının PCR analizi ile Doğrulanması	75

2.2.8.4.3. <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarından RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi.....	76
2.2.9. Rekombinant Peptidlerinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	78
2.2.9.1. Rekombinant Peptidlerinin Ekspresyonu.....	78
2.2.9.2. Rekombinant Peptidlerin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi.....	79
2.2.10. Rekombinant Peptidlerin Analizi	79
2.2.10.1. Rekombinant Peptidlerin SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	79
2.2.10.2. Rekombinant Peptidlerin Western Analizi.....	81
2.2.10.3. Rekombinant Peptidlerin ELISA Testi ile Miktar Tayini.....	82
2.2.10.4. Rekombinant Peptidlerin Agar Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Aktivitelerinin Test Edilmesi.....	83
2.2.10.5. Rekombinant Peptidlerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Analizi	83
2.2.10.6. Rekombinant Peptidlerin Hemolitik Aktivite Testi.....	84
2.2.10.7. Rekombinant Peptidlerin SEM Görüntülemesi	84
2.2.10.8. Rekombinant Peptidlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın ve Proteazların Etkisi.....	86

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Tez Çalışmasında Üretilen Peptidlerin Biyoinformatik Analiz Sonuçları	87
3.2. L12-49 ve L12-22 Peptidlerinin Üretimi.....	102
3.2.1. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Üretimi ve Kontrolü	102
3.3. Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	103
3.4. Rekombinant Plazmidlerin <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerinde Klonlanması.....	104
3.5. Pozitif <i>E. coli</i> DH5α Klonlarının Doğrulanması	104
3.6. Rekombinant Plazmidlerin <i>P. pastoris</i> GS115 Hücrelerine Transformasyonu	108
3.7. Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarının Kontrolü ve Mut fenotipinin Belirlenmesi.....	110
3.8. Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarında Transkripsiyonun Kontrolü..	111

3.9.Rekombinant Peptidlerin Analizi.....	113
3.9.1. Rekombinant Peptidlerin SDS-PAGE Jel Elektroforezi Sonucu	113
3.9.2. Rekombinant Peptidlerin Western Blot Analizi.....	113
3.9.3. Rekombinant Peptidlerin ELISA Testi ile Miktar Tayininin Sonucu.....	114
3.9.4. Rekombinant Peptidlerin Agar Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	115
3.9.5. Rekombinant Peptidlerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Analizi Sonucu	121
3.9.6. Rekombinant Peptidlerin Hemolitik Aktivite Testi	122
3.9.7. Rekombinant Peptidlerin SEM Görüntülemesi	125
3.10. Rekombinant Peptidlerin Stabilite Testleri Sonucu	126
3.10.1. Rekombinant Peptidlerin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 Transformantlarında Transkripsiyonun Kontrolü.....	126
3.10.2. Rekombinant Peptidlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Proteaz Enzimlerinin Etkisi	127

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Doğal ve Modifiye Peptidlerin <i>P. pastoris</i> Ekspresyon Sisteminde Rekombinant Üretimi	130
4.2. Üretilen Rekombinant Peptidlerin Konsantrasyonu	133
4.3. Antimikrobiyal Etki	134
4.4. Hemolitik Etki.....	140
4.5. Stabilite Testleri	141
4.5.1. Termal stabilite	141
4.5.2. Proteaz Stabilitesi.....	143
4.6. rL12-49-6His ve rL12-22-6His Peptidlerinin Karşılaştırılması	144
KAYNAKÇA.....	153

EKLER.....	189
EK 1.....	189
EK 2.....	191
EK 3.....	198
EK 4.....	199
EK 5.....	207
ÖZGEÇMİŞ.....	223



KISALTMALAR

AMP	: Antimikrobiyal Peptid
AOX	: Alkol Oksidaz
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
a/h	: Hacimde ağırlıkça yüzde
bç	: Baz çifti
BMGY	: Buffered Complex Glycerol Medium (Tamponlanmış Karmaşık Gliserol Kültür Ortamı)
BMMY	: Buffered Complex Methanol Medium (Tamponlanmış Karmaşık Metanol Kültür Ortamı)
CAMP_{R3}	: Collection of Anti-Microbial Peptides
DBAASP	: Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)
FDA	: Food and Drug Administration: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Generally Recognized as Safe: Genellikle Güvenli Olarak Tanınan
GRAVY	: The grand average of hydropathicity: Hidropatisite İndeksinin Genel Ortalaması

h/h : Hacimce yüzde

His : Histidin

IC50 : Half-maximal Inhibitory Concentration: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon

kDa : Kilodalton

kob : Koloni oluşturan birim

LB : Luria-Bertani Besiyeri

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MMC : Minimum Mikrobisidal Konsantrasyon

MRD : Maximum Recovery Diluent (Maksimum Geri Kazanım Seyreltici)

mg : Miligram

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

Mut^s : Metanolu yavaş kullanan fenotip

Mut⁻ : Metanolu kullanmayan fenotip

Mut⁺ : Metanolu kullanan fenotip

NCBI : National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)

ng : Nanogram

nM : Nanomolar

OD : Optik Densite

PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PVDF	: Polivinilidendiflorid
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	: Saniye
SEM	: Scanning Electron Microscope
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
UniProt	: Universal Protein Resource
UV	: Ultraviyole
U	: Enzim ünitesi
U/g	: Gram başına enzim ünitesi
U/mg	: Miligram başına enzim ünitesi
V	: Volt
YPD	: Yeast Extract Peptone Dextrose (Maya Ekstraktı Pepton Dekstroz)
YPDS	: Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol (Sorbitollü Maya Ekstraktı Pepton Dekstroz)

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Bazı antimikrobiyal peptid veritabanları	9
Tablo 1.2. AMP'lerin <i>in siliko</i> tahminlenmesinde kullanılan biyoinformatik araçlar	36
Tablo 1.3. <i>P. pastoris</i> ekspresyon sisteminde ifade edilen bazı AMP'ler	42
Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tanıma sekansları	48
Tablo 2.2. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 11 aminoasit uzunluğundaki motifler	53
Tablo 2.3. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 12 aminoasit uzunluğundaki motifler	54
Tablo 2.4. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 13 aminoasit uzunluğundaki motifler	55
Tablo 2.5. Motiflerin başlangıç şablonuna yerleşim pozisyonlarına göre oluşturulan peptid kombinasyonları	57
Tablo 2.6. Stabilitesi en yüksek peptid setlerinin fizikokimyasal özellikleri ve <i>In Siliko</i> analizi ile elde edilen tahmini antimikrobiyal aktivite skorları	59
Tablo 2.7. L12-49 ve L12-22 peptidlerine ait aminoasit ve nükleik asit dizileri	61
Tablo 2.8. Tez çalışmasında kullanılan primerler	63
Tablo 2.9. L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerinin sentezinde kullanılan oligonükleotidler	63
Tablo 2.10. Peptidleri kodlayan oligonükleotidlerin amplifikasyonu için hazırlanan reaksiyon karışımları ve PCR koşulları	64
Tablo 2.11. PCR ürünlerinin <i>EcoRI</i> ve <i>NotI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı	65
Tablo 2.12. pPICZ α -A vektörünün <i>EcoRI</i> ve <i>NotI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı	66
Tablo 2.13. Ligasyon karışımı	67
Tablo 2.14. Plazmid DNA'ların kontrolünde kullanılan PCR reaksiyon karışımı ve uygulanan reaksiyon koşulları	70
Tablo 2.15. Plazmid linearizasyonu için hazırlanan karışım	71

Tablo 2.16. <i>P. pastoris</i> transformantlarının doğrulanması için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	75
Tablo 2.17. AOX1 bölgesinin tespiti için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	76
Tablo 2.18. RT-PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	78
Tablo 2.19. SDS-PAGE örnek yükleme ve ayırma jellerinin bileşimi.....	80
Tablo 2.20. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan patojen mikroorganizma suşları.....	84
Tablo 3.1. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin SOPMA programı kullanılarak belirlenen ikincil yapı tahmin skorları.....	90
Tablo 3.2. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin biyoinformatik araçlar kullanılarak tahminlenen fizikokimyasal özellikleri.....	96
Tablo 3.3. Tasarlanan peptidlerinin in siliko olarak tahminlenen biyolojik aktivite sonuçları.....	102
Tablo 3.4. <i>E. coli</i> DH5 α klonlarının AOX bölgesi dizi analiz sonuçları.....	106
Tablo 3.5. Rekombinant AMP'lerin konsantrasyonları.....	115
Tablo 3.6. Rekombinant peptidlerin agar difüzyon testi ile belirlenen zon çapları.....	116
Tablo 3.7. Rekombinant peptidlerin MİK analiz sonuçları.....	122
Tablo 3.8. Rekombinant peptidlerin farklı sıcaklıklarda sıcaklıklarda muamele sonrası <i>E. coli</i> (ATCC 25922)'ye karşı oluşturdıkları agar difüzyon zon çapları.....	127
Tablo 3.9. Rekombinant peptidlerin proteaz enzimi ile muamele sonrası agar difüzyon zon çapları.....	128

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptidlerin yapısal sınıfları.....	7
Şekil 1.2. Katyonik AMP'lerin ökaryotik ve bakteriyel zarlarla etkileşimi.....	11
Şekil 1.3. AMP'lerin hücre duvarı etki mekanizması ve bazı hücre içi hedefleri.....	13
Şekil 1.4. Özgün AMP dizilerinin elde edilmesinde kullanılan yapı aktivite ilişkisine dayalı tasarım stratejileri.....	29
Şekil 2.1. pPICZα A vektörü.....	46
Şekil 2.2. pPICZα A vektörü çoklu klonlama bölgesi nükleotid dizisi.....	47
Şekil 2.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek çalışmaların akış planı.....	50
Şekil 2.4. Başlangıç şablonu.....	56
Şekil 2.5. M6, M7 ve M10 motifleri ve L joker aminoasidi kullanılarak oluşturulan peptid kombinasyonlarının sOPEP ve docking skorları.....	60
Şekil 2.6. L12-49-6His ve L12-22-6His'e ait nükleotid ve aminoasit dizileri.....	62
Şekil 2.7. Rekombinant plazmidin <i>P. pastoris</i> genomuna entegrasyonu.....	73
Şekil 3.1. M6, M7 ve M10 motiflerinin peptid içindeki farklı yerleşim pozisyonlarına göre oluşturulan peptidlerin sOPEP ve docking skorları.....	89
Şekil 3.2. L12-49 peptidinin ikincil yapı tahmin grafiği.....	90
Şekil 3.3. L12-22 peptidinin ikincil yapı tahmin grafiği.....	91
Şekil 3.4. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin 3D yapıları.....	92
Şekil 3.5. Peptidlerinin tahmin edilen üç boyutlu yapılarına ait Ramachandran grafiği.....	93
Şekil 3.6. L12-49 peptidi ile <i>E.coli</i> membran proteini <i>FhuA</i> 'nın docking görseli.....	94
Şekil 3.7. L12-22 peptidi ile <i>E.coli</i> membran proteini <i>FhuA</i> 'nın docking görseli.....	94
Şekil 3.8. L12-49 ve L12-22 peptidlerine ait sarmal çark modelleri.....	95
Şekil 3.9. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin hidrofobikliğini gösteren Kyte-Doolittle grafiği.....	97
Şekil 3.10. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin transmembrane bölgelerini gösteren Kyte-Doolittle grafiği.....	98
Şekil 3.11. L12-49 peptidinin hücrel lokalizasyon tahmini.....	100
Şekil 3.12. L12-22 peptidinin hücrel lokalizasyon tahmini.....	100
Şekil 3.13. rPCR ile elde edilen hedef gen bölgelerinin agaroz jel görüntüsü.....	103
Şekil 3.14. Ligasyonun kontrolü.....	103
Şekil 3.15. Rekombinant plazmidleri içeren <i>E.coli</i> DH5α klonları.....	104

Şekil 3.16. <i>E. coli</i> DH5 α klonlarından izole edilen plazmid DNA'ların 5' AOX1 /3' AOX1 primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri.....	105
Şekil 3.17. <i>E. coli</i> DH5 α klonlarından izole edilen plazmid DNA'ların GPF/GPR primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri.....	105
Şekil 3.18. <i>E. coli</i> DH5 α klonlarından izole edilen pPICZ α A-L12-22-6His ve pPICZ α A-L12-49-6His plazmidlerinin AOX bölgesine ait dizi analiz sonuçları.....	107
Şekil 3.19. pPICZ α A-L12-22-6His ve pPICZ α A-L12-49-6His plazmidlerinin lineerizasyonuna ait jel görüntüsü.....	108
Şekil 3.20. YPDS agarda gelişen <i>P. pastoris</i> GS115 transformantları.....	109
Şekil 3.21. 1000 μ g/ml zeosinli YPD agarda gelişen <i>P. pastoris</i> GS115 transformantları.....	109
Şekil 3.22. Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 transformantlarına ait DNA'ların GPF/GPR primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu.....	110
Şekil 3.23. <i>P. pastoris</i> GS115 transformantlarında Mut ⁺ fenotipinin kontrolü.....	111
Şekil 3.24. Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 transformantlarında transkripsiyonun kontrolü.....	112
Şekil 3.25. Pozitif <i>P. pastoris</i> GS115 transformantlarında GPF/GPR primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonucu	112
Şekil 3.26. Rekombinant peptidlerin SDS-PAGE analiz sonucu.....	113
Şekil 3.27. Rekombinant peptidlerin western blot analiz sonuçları.....	114
Şekil 3.28. His-Tag ELISA kit ile rekombinant peptidlerin konsantrasyon tayini.....	115
Şekil 3.29. Farklı konsantrasyonlardaki standard protein çözeltileri ile çizilen standard eğri	115
Şekil 3.30. Rekombinant peptidlerin Gram-pozitif bakterilerine karşı agar diffüzyon testi sonuçları.....	117
Şekil 3.31. Rekombinant peptidlerin Gram-negatif bakterilerine karşı agar diffüzyon testi sonuçları.....	119
Şekil 3.32. Rekombinant peptidlerin patojenik maya suşlarına karşı agar diffüzyon testi sonuçları.....	120
Şekil 3.33. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidi ile muamele edilmiş <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43894)'nin taramalı elektron mikroskopik mikrografları.....	123
Şekil 3.34. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidi ile muamele edilmiş <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) nin taramalı elektron mikroskopik mikrografları.....	124

Şekil 3.35. Rekombinant peptidler ile muamele edilen fare eritrositlerinin hemolitik aktivite testi sonuçları.....	125
Şekil 3.36. Farklı konsantrasyonlarda rekombinant peptidlerle muamele edilen fare eritrositlerinin % hemoliz grafiği.....	125
Şekil 3.37. Rekombinant peptidlerin sıcaklık stabilite testi sonuçları.....	126
Şekil 3.38. Rekombinant peptidlerin <i>E. coli</i> (ATCC 25922)'ye karşı agar diffüzyon testi sonuçları.....	127



GİRİŞ

Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), bakterilerden bitkilere, memelilere, omurgalı ve omurgasızlara kadar tüm yaşam formlarında bulunan, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ayrılmaz bileşenleridir. AMP'ler tipik olarak Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere, mantarlara, tek hücreli protozoalara, parazitlere ve virüslere karşı geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite sergiler. AMP'lerin bu geniş spektrumlu anti-patojenik aktivitelerinin yanısıra, immünomodülatör, anti-biyofilm ve antikanser özellikleri de bulunmaktadır (Moravej vd., 2018). AMP'ler antimikrobiyal etkilerini, doğrudan membranla etkileşime girerek veya proteinler, nükleik asitler ve enzimler gibi hücrel biyomolekülleri veya hücre duvarının biyosentezini bloke ederek gösterirler (Nan vd., 2009; Ma vd., 2017). Pozitif yüklü AMP'ler ile negatif yüklü bakteri yüzeyi arasındaki elektrostatik etkileşimler, hücre zarının seçici geçirgenliğinin kaybına ve sonuçta hücrenin ölümüne sebep olduğundan kritik bir öneme sahiptir (Mahlapuu vd., 2016). Son zamanlarda, peptid sekanslarının farklı bakteriyel membranlara karşı optimize edilmesiyle, geniş spektrumlu ve yüksek aktiviteye sahip sentetik AMP'ler tasarlanabilmektedir.

AMP'ler, geleneksel antimikrobiyal ajanların aksine, birden fazla etki mekanizmasını kullanarak hızlı bakterisidal etki gösterirler. Bu durum, bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirme şansını zayıflatmaktadır. Çünkü bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirmesi membranın ve/veya çeşitli biyokimyasal yolların tamamen değiştirilmesini gerektirmektedir. Ayrıca, AMP'ler, sinerjistik etkileşimler yoluyla birbirlerinin etkisini güçlendirerek de bakteriyel direnç gelişimini yavaşlatabilir (Navon, 2002; Mookherjee ve Hancock, 2007; Fjell vd., 2012; Reffuveille vd., 2014). Bununla birlikte, AMP'lere karşı bakteriyel direnç konusunda yapılan birkaç çalışmada; ekzojen peptidi nötralize eden moleküllerin bakteri tarafından salınımı, peptidin bakteriyel proteazlar tarafından enzimatik olarak bozunması veya bakteri yüzeyine bağlanmasını önlemek için dış zarın modifikasyonu gibi bazı direnç mekanizmalarından bahsedilmiştir (Nizet, 2016; Spohn

vd., 2019). Ancak bu değişikliklerin orta düzeyde bir direnç sağladığı ve yeterince spesifik olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, bakterilerin, kendi yaşam ortamlarına uyum sağlayarak kendi savunma mekanizmalarını geliştirme eğiliminde olduklarını düşünöldüğünde bu tarz direnç mekanizmalarını spesifik olarak AMP direnciyle ilişkilendirmenin de her zaman doğru olamayacağı bildirilmiştir. Örneğın, birçok yüzey molekülünün birincil görevi, bir biyofilm matrisinin oluşumu sağlamak veya hücre tarafından salgılanan birçok proteazın görevi de besinlerin alınmasını kolaylaştırmaktır (Han vd., 2016; Perron vd., 2006).

Bununla birlikte insan AMP'lerine çok yakın dizilerin klinik kullanımının, konak savunma peptidlerine karşı direnç gelişimine yol açarak kendi doğal savunmasını tehlikeye atabileceğı ve bu durumun halk sağlığı için daha büyük bir tehdit oluşturacağı yönünde endişeler de mevcuttur. Bu görüşe göre, bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirme olasılığını bertaraf etmenin en iyi yolu olarak doğal olmayan (sentetik) AMP'lerin geliştirilmesi gösterilmiştir (Wiradharma vd., 2011).

Son 30 yılda AMP'lerin tasarımıyla ilgili çalışmaların hız kazandığı görölmektedir. AMP'ler özellikle çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek en güçlü alternatiflerden biri olarak düşünölmektedir. Bununla birlikte bugün az sayıda AMP veya peptidomimetğin (AMP türevi) klinik araştırmaların farklı aşamalarında olduğu görölmektedir. Bunun en önemli nedeni çoğunlukla AMP'lerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin birçok geleneksel antibiyotiğe kıyasla daha yüksek olmasıdır. Örneğın; birçok AMP'nin MİK değerleri <10 µg/ml iken, geleneksel antibiyotiklerin 1–2 µg/ml aralığında veya altındadır. Ayrıca doğal kaynaklardan elde edilen AMP'lerin, proteazlar (konakçı veya mikrobiyal kaynaklı) tarafından parçalanabilmesi, memeli hücreleri için toksik etki gösterebilmesi ve üretim maliyetlerinin yüksek olması aktif olarak kullanımlarının önündeki diğer engeldir. Ancak bu sorunlar, AMP'lerin tasarımı ve sentezi konusundaki çalışmaları yavaşlatmamış, aksine yeniden (*de novo*) tasarımlar, daha çok bu eksikliklerin giderilmesini amaçlayan modifikasyonlara yönelmiştir (Li vd., 2017).

Bugün farklı özellikteki çok sayıda AMP'nin kayıtlı olduğu birçok veritabanı bulunmaktadır. Bunlardan Antimikrobiyal Aktivite ve Peptid Yapısı Veritabanı (DBAASP), yüksek terapötik indekse sahip antimikrobiyal bileşiklerin tasarlanması için

geliştirilmiş bir veritabanıdır. Bugün DBAASP veri tabanındaki peptidlerin %75'den fazlasının sentetik peptid olduğu ve bu sayının, bilgisayar destekli peptid tasarım yaklaşımları sayesinde giderek arttığı görülmektedir (Greber ve Dawgul, 2017). Peptid tasarım yaklaşımları genel olarak; mutasyona dayalı ampirik yöntemler gibi deneysel ve hesaplamalı yöntemleri, istatistiksel temelli biyoinformatik yöntemleri, moleküler dinamik (MD) simülasyonlarını ve NMR gibi biyofiziksel deneyleri içeren mekanizma tabanlı yöntemleri içerir (Torrent vd., 2012; Hänchen vd., 2013; Jeong vd., 2015; Fox vd., 2016; Vishnepolsky vd., 2019). Yeni AMP'ler tasarlamak için en popüler yaklaşımlardan biri, basit, hızlı ve uygun maliyetli biyoinformatik yöntemleri kullanmaktır. Bu amaçla farklı AMP veri tabanlarından elde edilen verilerin istatistiksel olarak işlenmesini esas alan ve farklı makine öğrenimi ve veri analizi yaklaşımlarını kullanan çok sayıda tahminleme aracı oluşturulmuştur. Bu tarz biyoinformatik araçlar kullanılarak tasarım süreci hızlandırılabilir gibi tasarlanan peptidin antimikrobiyal olma potansiyeli de doğruya yakın bir şekilde tahminlenebilmektedir (Wang vd., 2015; Vishnepolsky vd., 2019).

AMP'lere olan ilginin artması, farklı kökenlere ait 3000'den fazla antimikrobiyal peptidin tanımlanmasına veya tahmin edilmesine neden olmuştur. Ancak bu peptidlerin bilimsel araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için standart kalitede, daha kısa sürede ve daha düşük bir maliyetle üretilmeleri gerekmektedir.

Bugün AMP'lerin üretiminde, doğal kaynaklardan doğrudan izolasyon, kimyasal sentez veya rekombinant ekspresyon yöntemleri kullanılmaktadır (Parachin vd., 2012; Deng vd., 2017). Genel olarak, doğal kaynaklardan izolasyon, zaman alıcı, çevre dostu olmayan ve yüksek maliyetli bir yöntemdir ve bu yüzden peptidlerin büyük miktarlarda üretimi için uygun bulunmamaktadır. Diğer taraftan çoğu organizmanın ekolojik öneme sahip olduğunu ve organizmalar tarafından üretilen AMP'lerin sınırlı düzeyde veya genellikle biyotik stres koşulları altında sentezlendiğini düşünecek olursak, doğal kaynaklardan izolasyon endüstriyel ölçekli üretimlerde tercih edilmemektedir. Peptidlerin kimyasal sentezi ise, hem doğal hem de sentetik AMP'lerin üretilmesine izin verse de, karmaşık ve maliyetli bir süreçtir. Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler, AMP'lerin daha büyük miktarlarda üretimine fırsat sağlamıştır (Li vd., 2008; Parachin vd., 2012; Islam vd., 2021). AMP'lerin düşük maliyetli üretimi için çok sayıda biyolojik ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Bunlar arasında *Escherichia coli* kısa jenerasyon süresi

ve genom yapısının detaylı olarak bilinmesi nedeniyle en çok tercih edilen rekombinant biyoreaktörüdür (Glazyrina vd., 2010). Ancak özellikle konak için toksik olan AMP'ler, ekspresyon sistemine zarar verdiğinden yüksek miktarlarda üretimi zordur. Ayrıca, prokaryotlarda translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleşmediği düşünülecek olursa, ekspresyonunda post-translasyonel modifikasyonlara (disülfid bağları gibi) ihtiyaç duyan AMP'lerin, prokaryotik konaklarda üretimi uygun olmamaktadır (Ingham ve Moore, 2007; Li, 2011; Puertas vd., 2011; Yi vd., 2015). Bu nedenle rekombinant peptidlerin üretimi konusundaki çalışmalar maya ekspresyon sistemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar arasında metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), güçlü ve yüksek verimli promotörlerden biri olan alkol oksidaz 1 (AOXI) promotörüne sahip olması, insanlara karşı bilenen bir patojenitesinin olmaması, proteinleri hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek miktarlarda ifade edebilmesi ve post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmesi nedeniyle en çok tercih edilen ekspresyon sistemlerinden biri olmuştur (Cereghino ve Cregg, 2000; Cregg vd., 2000).

Özgün AMP dizilerinin tasarımında genel amaç, antimikrobiyal aktivite ve proteolitik degradasyona karşı direnci maksimuma çıkarmak ve konakçıya karşı toksisiteyi en aza indirmektir (Tossi vd., 2000; Zelezetsky ve Tossi, 2006). Bu yüzden, peptidlerin moleküler etki mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılmasına izin veren yapı-aktivite ilişkisi (SAR) çalışmalarına ve hesaplamalı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu sayede, geniş spektrumlu ve spesifik aktiviteye sahip peptidler elde edilebilmiştir. Ayrıca birçok doğal ve modifiye AMP'lerin, rekombinant yöntemler kullanılarak, standart kalitede, daha az maliyetle ve yüksek saflıkta üretimi sağlanabilmiştir.

Bu tez çalışmasında; yüksek aktiviteye sahip ve geniş spektrumlu AMP tasarımına yönelik yeni bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemle tasarlanan peptidlerin *P.pastoris* konak hücrelerinde rekombinant yöntemle üretimi amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Konak savunma peptidleri olarak da bilinen AMP'ler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak birçok yaşam formunda bulunmaktadır (Zasloff, 2002; Torrent vd., 2012). Birçok canlının hayatta kalabilmesi için AMP'leri üretmesi gerekmektedir. Denizde veya karada yaşayan omurgasızların, herhangi bir adaptif bağışıklık sistemine sahip olmamalarına rağmen, doğal ortamlarında patojenik mikroorganizmalara karşı kendilerini koruyabildikleri görülmüştür. Bu organizmalar, genellikle hemolenflerinde, hemositlerinde (kan hücreleri), fagositlerinde (akyuvarlar) ve epitel hücrelerinde bulunan antimikrobiyal peptidler yoluyla patojenik mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların üstesinden gelebilmektedir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklığa sahip olan omurgalılarda ise, AMP'ler, beyaz kan hücrelerinin granülleri (fagositler, nötrofiller, makrofajlar), ağız epitel dokusu, akciğer, göz, üreme sistemi ve vücut sıvıları gibi çeşitli hücrelerden izole edilebilmiştir (Brogden, 2005; Gueguen vd., 2009).

AMP'ler, nispeten geniş antimikrobiyal etki spektrumları ve ökaryotik hücrelere karşı sergilemiş oldukları düşük toksisite ve çoklu eylem mekanizmaları düşünüldüğünde, oldukça geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Ayrıca, AMP'ler güvenli, raf ömrü uzun ve az işlem görmüş gıda taleplerini karşılamada mevcut koruyucu maddelere iyi bir alternatif olarak görülmektedirler (Huan vd., 2020). Ancak bütün bunlara rağmen rutinde kullanımları hala sınırlıdır.

AMP'lerin keşfine yönelik araştırmalar, AMP veri tabanlarının oluşturulmasına yönelik çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Nitekim, şu an, AMP'leri genel (doğal, sentetik vs.) ve spesifik (antibiyofilm, antikanser, antiviral, siklik peptidler, defensinler vs.) olarak arama imkanı sağlayan çok sayıda veri tabanı mevcuttur. Bu veri tabanlarında doğal olarak keşfedilen veya sentetik olarak tasarlanan çok sayıda AMP'nin yapı, aktivite, dizi vb. bilgilerine ulaşılabilmektedir. Bu sayede çok sayıda özgün AMP tasarımlarının önü açılmıştır. İlk kez 2002 yılında, antimikrobiyal ve antikanser peptidleri tasarlamak için

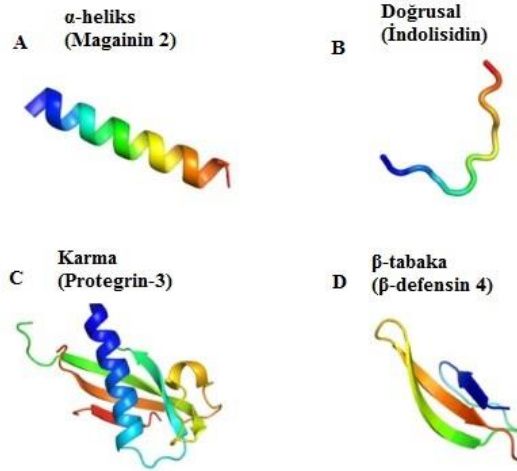
bir yüksek lisans tezi kapsamında oluşturulan ve düzenli olarak güncellenen Antimikrobiyal peptid veri tabanında (APD) (<https://aps.unmc.edu/>) göre; 2489’u hayvanlardan, 385’i bakterilerden, 368’i bitkilerden, 25’i mantarlardan, 8’i bakterilerden ve 5’i arkelerden olmak üzere, 3425’den fazla AMP kayıtlıdır. Diğer bir açık erişimli veri tabanı olan Antimikrobiyal peptitlerin veri deposu (Data repository of antimicrobial peptides, DRAMP) ise, 2022 yılı itibari ile 6105’i genel (doğal ve sentetik), 16110’u patentli ve 77’si ilaç geliştirme aşamasında (klinik öncesi veya klinik aşama) olan, toplam 22480 AMP kaydı içermektedir.

Bu zamana kadar, birçok AMP’nin klinik deney aşamasına ulaştığı ancak, toksisite, proteazlarla kesilme ve kısa yarılanma ömrü gibi nedenlerle ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmadığı görülmüştür (Kumar vd., 2018). Bununla birlikte, Bacitracin, Colistin, Daptomycin, Enfuvirtide, Gramicidin, Polymyxin B, Telaprevir ve Vancomycin olmak üzere sekiz adet AMP’nin, FDA tarafından onaylandığı da bilinmektedir (Wang vd., 2021; Jiang vd., 2021). Ayrıca, iki adet AMP’nin (Nisin ve Polilisin), FDA tarafından gıda koruyucusu olarak kullanımına da izin verilmiştir. AMP’ler, nispeten geniş antimikrobiyal spektrumu ve ökaryotik hücrelere karşı sergilemiş oldukları düşük toksisiteleri ve mikroorganizmalara karşı gösterdikleri farklı inaktivasyon mekanizmaları düşünüldüğünde, ilaç ve gıda endüstrisi dışında, hayvancılık, farmakoloji, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi alanlarda da geniş uygulama potansiyeline sahiptir.

1.1. Antimikrobiyal Peptidler ve Genel Özellikleri

Antimikrobiyal peptidler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçasını oluşturan, küçük (12-80 aminoasit) katyonik amfifillerdir. AMP’leri çeşitli özelliklere göre sınıflandırmak mümkündür, ancak ikincil yapılarına göre sınıflandırma en yaygın olanıdır. AMP yapıları genel olarak α -sarmal, β -tabaka, karma (α -sarmal/ β -tabaka) ve doğrusal yapılar olarak sınıflandırılır (Şekil 1.1). Bugüne kadar tanımlanmış antimikrobiyal peptidlerin çoğu, α -sarmal veya disülfür açısından zengin β -tabaka yapıda olup, ribozomal veya non-ribozomal yolla sentezlenebilmektedir (Scott vd., 2008). Afrika pençeli kurbağası *Xenopus laevis*’in derisinden elde edilen magainin, bal arısı *Apis mellifera*’nın zehrinde bulunan melittin ve insan katelidinden türetilen LL-37, membran mimetik ortamlarda amfifilik bir α -sarmal ikincil yapı sergileyen

peptidlerdendir (Nguyen vd., 2011; Vandamme vd., 2012; Yang vd., 2001; Zasloff, 1987).



Şekil 1.1. Antimikrobiyal peptidlerin yapısal sınıfları. (A) α -heliks, magainin 2 (B) Doğrusal, indolisidin, (C) Karma, Protegrin-3 (D) β -tabaka, β -defensin 4.

α -heliks peptidler, bugüne kadar üzerinde en çok çalışılan AMP sınıfıdır. Bu yapılarda, birbirine yakın iki aminoasit arasındaki mesafe yaklaşık 0,15 nm iken, merkeze göre aralarındaki açı üstten bakıldığında yaklaşık 100° 'dir (Bahar ve Dacheng, 2013). α -heliks peptidler, sulu çözeltide doğrusal bir yapıya sahipken, bakteri zarları ile etkileşime girdiklerinde veya organik çözücülerin varlığında amfipatik sarmal yapılar oluştururlar (Mahlapuu vd., 2016). α -heliks peptidler ile β -tabaka peptidler arasındaki en belirgin fark, β -tabaka peptidlerin molekül içi disülfid bağları veya makrosiklik döngüler ile stabilize edilmiş kararlı bir amfipatik yapıya sahip olmasıdır. Bir başka deyişle, β -tabaka peptidler kararlı yapılarından dolayı, sulu çözeltide daha düzenlidir ve α -heliks peptidler kadar hızlı konformasyonel değişime uğramazlar (Yeaman ve Yount, 2003). Bilinen en iyi β -tabaka peptidler, nötrofiller, makrofajlar ve epitel hücrelerinde inaktif öncüler olarak üretilen ve büyük bir AMP grubu olan defensinlerdir (Lai ve Gallo, 2009 ; Pasupuleti vd., 2012). Defensinler tipik olarak üç ila dört molekül içi disülfid bağı ile stabilize edilmiş iki ila üç antiparalel β -tabakadan oluşur; ancak bazı durumlarda N- veya C-terminalinde bir α -heliks veya yapılandırılmamış segment de bulunabilir (Zasloff, 2002; Takahashi vd., 2010). Defensinler dışında protegrin-1 (PG-1) ve takiplesin de β -tabaka peptidler arasındadır. Takiplesinler ve protegrinler, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite

gösteren, küçük (16-18 aa), sistein açısından zengin peptidlerdir. Hem protegrinler hem de takiplesinler, iki şeritli antiparalel bir β -tabakadan oluşan saç tokası (hairpin) şeklindeki moleküllerdir (Miyasaki ve Lehrer, 1998).

Karma peptidler, üç veya dört disülfür köprüsü ile stabilize olmuş bir α -sarmal/ β -tabaka karışık yapısını benimserler. Tek bir α sarmal yapıya ve iki veya üç anti-paralel şeritten oluşan bir β tabakaya sahip sisteinle stabilize edilmiş bu α/β (CSa β) yapısal motifi, ilk olarak antibakteriyel böcek defensinleri ve akrep nörotoksinlerinde keşfedilmiştir (Bontems vd., 1991; Zhu vd., 2005; Erdem ve Kesmen, 2022).

Doğrusal peptidler, glisin (G), triptofan (W), arginin (R) ve histidin (H) gibi spesifik aminoasitler bakımından zengin olup, düzenli ikincil yapılar içermezler. Bu peptidler, α -heliks peptidlere benzer şekilde, sulu ortamda serbest bir yapıya sahiptir, bu da bir zar veya zar benzeri bir yapı ile birlikte bulunduklarında amfipatik bir yapıya dönüşmelerini sağlar (Nguyen vd., 2011). Bununla birlikte, çoğu doğrusal AMP, doğrudan patojenlerin zarları üzerinde etkisini göstermez, bunun yerine zarlardan nüfuz eder ve sitoplazmik proteinlerle etkileşime girer. Sırasıyla triptofan ve prolin/arginin açısından zengin olan indolicidin ve baktenesin-5 bu grubun iyi bilinen üyeleridir (Moravej vd., 2018; Singh vd., 2022).

Çeşitli veri tabanlarında toplanmış doğal antimikrobiyal peptidlerin aminoasit dizisi ve yapılarındaki farklılıklara rağmen, ortak özellikler taşıdığı tespit edilmiştir. Bunlar arasında; pozitif (katyonik) yük, hidrofobiklik, amfipatiklik (polar ve polar olmayan yüzlerin konumu) ve membran bileşenleri ile etkileşim sayılabilir (Lee ve Hodges, 2003). Bu nedenle antimikrobiyal peptidleri genel olarak pozitif yüklü (genel olarak +2 ila +9), kısa (<50 aminoasit) ve hidrofobik aminoasitlerden ($\geq$ % 30) oluşan biyomoleküller olarak tanımlamak mümkündür (Hancock ve Sahl, 2006). Tablo 1.1.'de bugüne kadar tanımlanmış antimikrobiyal peptidlere erişim imkanı sağlayan bazı veri tabanlarının listesi verilmiştir. Toplam 2619 AMP sekansına sahip bir AMP veritabanı incelendiğinde (APD3), AMP'lerin en çok glisin (G), lizin (K) ve lösin (L) aminoasitlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca ikincil yapılarında da, en yaygın α -heliksler ve β -tabaka konformasyona sahip oldukları belirlenmiştir (Wang ve ark., 2015). AMP'ler antimikrobiyal aktivite ve biyouyumluluk açısından değerlendirildiklerinde, α -heliks katyonik AMP'lerin (α CAMP'lar) daha etkili olduğu görülmüştür (Phoenix vd., 2013).

Tablo 1.1. Bazı antimikrobiyal peptid veritabanları

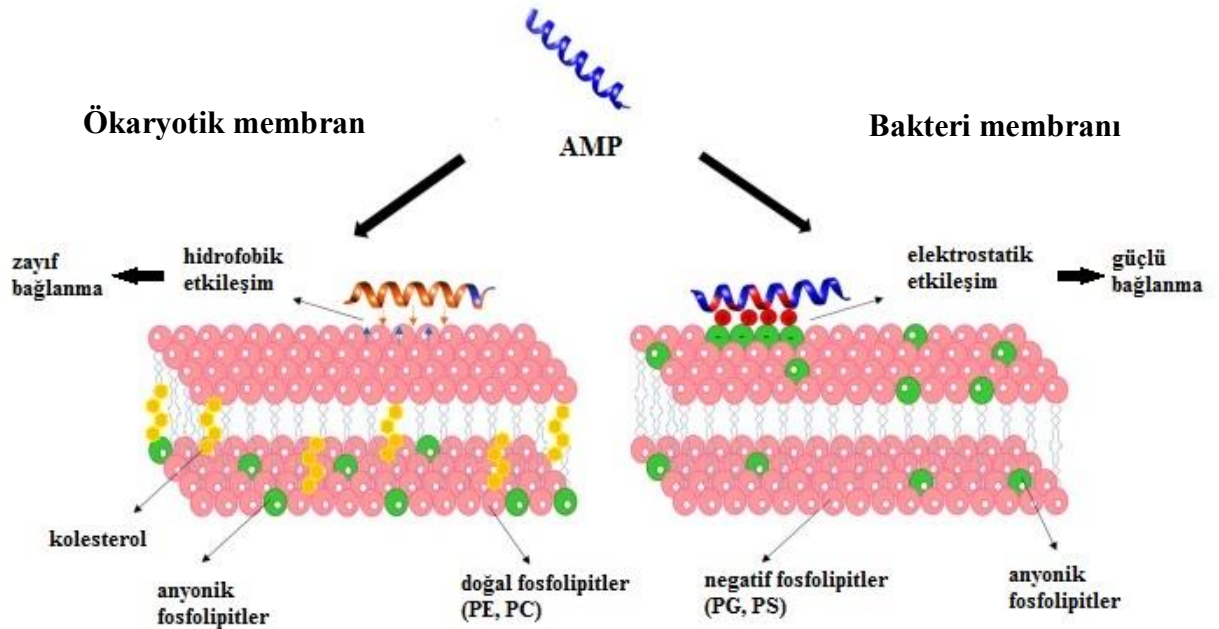
Veri Tabanı	Link	Referans
ANTIMIC	http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/	Brahmachary vd., 2004
APD	http://aps.unmc.edu/AP/main.php	Wang ve Wang, 2004
Peptaibol	http://peptaibol.crysl.bbk.ac.uk/home.shtml	Whitmore ve Wallace, 2004
BAGEL	http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/bagel	de Jong vd., 2006
AMPer	http://cbcsrv.watson.ibm.com/Tamp.html	Fjell vd., 2007
BACTIBASE	http://bactibase.ammamillab.org/main.php	Hammami vd., 2007
Defensins	http://defensins.bii.a-star.edu.sg/	Seebah vd., 2007
BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep	Minkiewicz vd., 2008
Cybase	http://www.cybase.org.au/	Wang vd., 2008
PhytAMP	http://phytamp.pfba-lab-tun.org/statistics.php	Hammami vd., 2008
RADP	http://faculty.ist.unomaha.edu/chen/rapd/index.php	Li ve Chen, 2008
DAMPD	http://apps.sanbi.ac.za/dampd/	Sundararajan vd., 2011
DADP	http://split4.pmfst.hr/dadp/	Novkovic vd., 2012
YADAMP	http://yadamp.unisa.it/	Piotto vd., 2012
LAMP	http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp	Zhao vd., 2013
MilkAMP	http://milkampdb.org/home.php	Théolier vd., 2014
ParaPep	http://webs.iiitd.edu.in/raghava/parapep/peptide.php	Mehta vd., 2014
BaAMPs	http://www.baamps.it/	Di Luca vd., 2015
CAMP3	http://www.camp.bicnirrh.res.in/	Waghu vd., 2015
CancerPPD	http://crdd.osdd.net/raghava/cancerppd/	Tyagi vd., 2015
DBAASP	https://dbaasp.org/home.xhtml	Pirtskhalava vd., 2015
DRAMP	http://dramp.cpu-bioinform.org/	Fan vd., 2016
SATPdb	http://crdd.osdd.net/raghava/satpdb/	Singh vd., 2016
InverPep	http://ciencias.medellin.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/prospeccionydisenobiomoleculas/InverPep/public/home_en	Gomez vd., 2017
MEGARes	http://megares.meglab.org/	Lakin vd., 2017
THPdb	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/thpdb/	Usmani vd., 2017
ADAPTABLE	http://gec.u-picardie.fr/adaptable	Ramos-Martín vd., 2019
dbAMP	http://csb.cse.yzu.edu.tw/dbAMP/	Jhong vd., 2019

1.2. Antimikrobiyal Peptidlerin Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal peptidler farklı mekanizmalar ile mikroorganizmaları öldürürler. Bunlardan en bilineni, AMP'lerin doğrudan mikrobiyal membranlarla etkileşime girmesidir. AMP'ler pozitif net yükleri sayesinde, hızlı ve verimli bir şekilde negatif yüklü membranlara bağlanarak membran yapısının bozulmasına neden olurlar (Omardien vd., 2018). İkinci olarak, AMP'ler, proteinler, nükleik asitler, lipoteikoik asitler ve glikopeptidler gibi hücrel biyomoleküllerin veya hücre duvarının biyosentezini bloke ederek mikroorganizmanın ölümüne neden olurlar (Nan vd., 2009; Ma vd., 2017). Üçüncü olarak, AMP'ler, hücre içi Ca^{+2} birikimini arttırlar. Ca^{+2} birikimi, Ca^{+2} homeostazının bozulmasına ve ardından reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur ve bu durum hücre apoptozu ile sonuçlanır. Son olarak AMP'ler, ATP sentaz aktivitesini azaltarak veya elektron transfer zincirini bloke ederek ATP sentezinin inhibisyonuna neden olur. Ayrıca AMP'ler, ATP ile doğrudan etkileşime girerek de ATP'ye bağımlı enzimler ve hücrel süreçlerin bloke edilmesine yol açarlar (Zhang vd., 2019).

AMP'lerin etki mekanizmalarını araştırmak ve antimikrobiyal güçlerini artırmak için çok sayıda AMP ayrıntılı olarak incelenmiştir (Kim vd., 2014). Antimikrobiyal peptidlerin bakterilere nüfuz etme şekilleri bazı hücrel yapılarla olan moleküler etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Gram-pozitif bakteriler negatif yüklü teikoik asit içeren yoğun bir peptidoglikan tabakasından oluşurken, Gram-negatiflerde bu tabaka daha incedir ve Gram-pozitifler bakterilerden farklı olarak dış kısmında bir dış membran ve lipopolisakkarit zincirler vardır (Meroueh vd., 2006). Gram-negatif bakterilerin hücre dışı membranı, negatif yüklü bir lipopolisakkarit (LPS) içerir. Katyonik AMP'ler, LPS'ye bağlı Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonların yerini alabilir ve böylece dış membranda bozulmaya neden olabilirler. Dış membrandan geçen katyonik AMP'ler, bu kez hücre içi membranında bulunan negatif yüklü fosfolipitlere elektrostatik olarak bağlanırlar (Nikaido, 2003; Ruiz vd., 2006). Bu sayede hücre membranlarında boşluklar oluşturarak seçici geçirgenlik özelliğinin kaybına ve böylece bakteri ölümüne neden olurlar. Gram-pozitif bakterilerde sitoplazmik zarın bozulması yeterliyken, Gram-negatiflerde dış membranın da bozulması gerekmektedir. Dış membranın geçirgen hale gelmemesi antimikrobiyal aktivitenin kaybıyla sonuçlanmaktadır. Örneğin, Daptomisin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi Gram-pozitif bakterilere karşı oldukça

aktifken, Gram-negatif bakterilere karşı etkinliği yoktur. Çünkü Daptomisin sitoplazmik membranı bozabilirken, dış membranı bozamamaktadır (Tally ve De Bruin, 2000). Bakterilerin aksine, memeli hücrelerinin sitoplazmik zarı zwitteriyonik fosfolipitler, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin ve sfingomyelin açısından zengin ve nötr bir net yüke sahiptir (Yeaman ve Yount, 2003; Ebenhan vd., 2014). Ayrıca, zwitteriyonik fosfolipitlerin zarın dış yüzeyinde ve negatif yüklü baş gruplarının ise iç yüzeyde lokalize olduğu memeli hücre zarlarında asimetrik bir fosfolipit dağılımı vardır (Zasloff, 2002; Yeaman ve Yount, 2003; Lai ve Gallo, 2009). Bu nedenle, AMP'ler ve memeli hücre zarı arasındaki etkileşimler, esas olarak, AMP'ler ve bakteri zarları arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimlere kıyasla nispeten daha zayıf olan hidrofobik etkileşimler yoluyla gerçekleşir (Şekil 1.2). Ayrıca, memeli hücre zarları, bakterilerin aksine, yüksek oranda kolesterol içermektedir (Yeaman ve Yount, 2003; Lai ve Gallo, 2009). Kolesterolün, fosfolipid çift tabakasının stabilizasyonunu artırarak AMP'lerin aktivitesini azalttığı öne sürülmüştür (Zasloff, 2002). Özetle bu temel farklar, memeli hücrelerini AMP'lere karşı koruyarak bu peptidlerin seçici olarak mikrobiyal hücrelere etki etmesini sağlamaktadır (Yeaman ve Yount, 2003; Mahlapuu vd., 2016).



Şekil 1.2. Katyonik AMP'lerin ökaryotik ve bakteriyel zarlarla etkileşimi (Parchebafi vd., 2022).

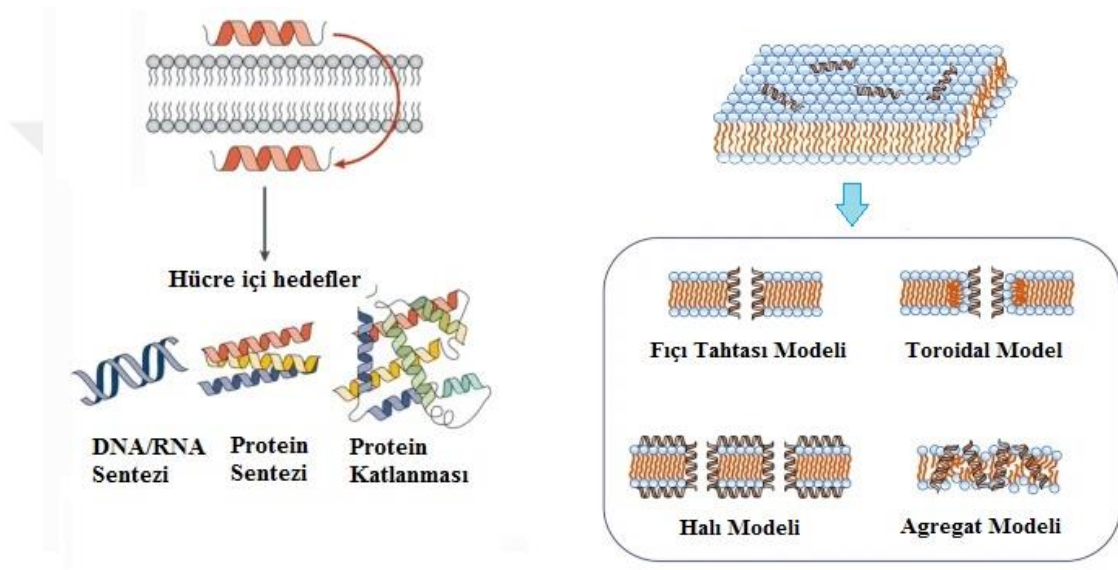
AMP'ler Gram-negatif bakterilerde LPS ve Gram-pozitif bakterilerde ise lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi hücre duvarı bileşenleri ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşimi etkileyen iki ana faktör vardır. Bunlar; peptidin konformasyonel değişimi ve peptid miktarıdır. Çalışmalar, α -sarmal AMP'lerin anyonik lipid membrana bağlandığını ve membran ile etkileşimi kolaylaştırmak için sulu çözeltideki düzensiz yapısını amfifilik α -sarmal yapıya dönüştürdüğünü göstermiştir. α -sarmal peptidlerden farklı olarak, β -tabaka peptidler ise, stabil disülfid köprülerinden dolayı membran ile etkileşime girdiklerinde büyük bir konformasyonel değişime uğramazlar (Lee vd., 2016). Peptid miktarı, hücre zarı ile AMP etkileşimini etkileyen bir diğer önemli faktördür. Peptid miktarı düşük olduğunda AMP'ler plazma zarının yüzeyine paralel olarak konumlanır (Abrunhosa vd., 2005). Peptid miktarının artmasıyla, AMP'ler dikey olarak yönelir ve zarın hidrofobik merkezine yerleşir. Sonunda, membran geçirgenliği hücre içi iyonların, metabolitlerin sızmasına ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açar (Silva vd., 2016; Zhang vd., 2021).

AMP'lerin hücre membranı üzerindeki etkisini tanımlamak için çeşitli varsayımsal modeller önerilmiştir. Bunlar; fıçı-çita, toroidal-gözenek, halı ve agregat modelleridir (Şekil 1.3). Fıçı-çita modelinde, antimikrobiyal peptidler, hidrofilik bölgelerinin etkileşimiyle membran yüzeyinde yanal olarak birikmeye başlar. Membrana yüzeyinde belirli bir yoğunluğa ulaştığında ise plazma membranına dik olacak şekilde doğrultu değiştirir. Bu sayede, peptidlerin hidrofobik bölgelerinin lipid çift tabakası içerisine yerleştiği, hidrofilik kısımların ise dışa doğru yöneldiği bir kanal oluşur (López-Meza vd., 2011; Lee vd., 2016; Kumar ve ark., 2018).

Toroidal gözenek modelinde, fıçı-çita modeline benzer şekilde lipid çift tabakasına dik olarak yerleşen peptidler, membranın fosfolipid tabakası ile peptid-lipid kompleksi oluşturur. Bunun sonucunda da bir kısmı peptid ve bir kısmı fosfolipid baş gruplarıyla çevrili bir lokal membran kıvrımı oluşur ve bu kıvrımlar “toroidal gözenek” olarak adlandırılan gözenekleri oluşturur (Kumar vd., 2018; Zhang vd., 2021).

Halı modelinde, pozitif yüklü peptidler membranın negatif yüklü polar fosfolipid baş grupları ile etkileşime girerek membrana absorbe olur ve membrana paralel bir şekilde yönelir. Membranın yüzeyini kaplayacak şekilde yayıldığından bu modele halı modeli denilmiştir (Li vd., 2012; Lee vd., 2016; Zhang vd., 2021).

Agregat modelinde, bir başka deyişle deterjan benzeri halı modeli olarak da bilinen bu modelde, halı modelinden farklı olarak, zarın yüzeyinde biriken AMP'ler, peptid konsantrasyonu kritik bir eşiğe ulaştığında, membranın içine doğru yönelir ve hidrofobik çekirdeğe sahip miseller oluşturarak deterjan benzeri bir etkiyle zarın bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Bu kanallar ayrıca AMP'lerin sitoplazmaya geçerek daha güçlü etki göstermesine yardımcı olur (Hale ve Hancock, 2007; Zhang vd., 2021).



Şekil 1.3. AMP'lerin hücre membranı etki mekanizması ve bazı hücre içi hedefleri (Zhang vd., 2021).

AMP'lerin büyük çoğunluğu, doğrudan antimikrobiyal aktiviteye sahipken, bir kısmı da konağın doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini modüle ederek dolaylı olarak patojen inaktivasyonunu desteklemektedir (Hancock ve Sahl, 2006; Yeung vd., 2011). AMP'ler kemotaksinin uyarılması, immün hücre farklılaşmasının modülasyonu ve adaptif immünitinin başlatılması gibi immünomodülatör aktiviteleri ile konakçının bakteriyel direncine katkıda bulunur. AMP'ler ayrıca, toll benzeri reseptörlerin (TLR) baskılanmasını ve/veya proinflamatuvar sitokinlerin sitokin aracılı üretimini ve anti-endotoksin aktiviteyi teşvik ederek aşırı veya zararlı proinflamatuvar yanıtların oluşumunu da önlerler (Håversen vd., 2002; Davidson ve ark., 2004; Mookherjee vd., 2006; Lai ve Gallo, 2009; van der Does vd., 2010; Yeung vd., 2011).

Yapılan çalışmalar katyonik AMP'ler için tahmini etki mekanizmaları açıklanmış olsa da, tüm katyonik AMP'lerin mekanizmasını açıklayabilecek tek bir teori veya mekanizma mevcut olmadığını göstermiştir. Ayrıca, mevcut çalışmaların çoğu yapay membranlara dayanmaktadır. Bu yapay membranların bileşimi ve yapısı bakteri hücre membranlarından farklı olduğu gibi mikroorganizmaların gelişme ortamı da deneysel koşullardan farklıdır. Bu nedenle, bu deneylerden elde edilen sonuçlar AMP'lerin etki mekanizmasının tahmin edilmesine katkı sağlamakla birlikte tam olarak açıklayamamaktadır (Lei vd., 2019).

1.3. Doğal Antimikrobiyal Peptidlerdeki Sorunlar

Çeşitli veritabanlarındaki istatistiksel veriler göz önüne alındığında, AMP'leri, memeli, amfibi, mikroorganizma, böcek ve deniz kaynaklı olarak sınıflandırmak mümkündür. Memeli AMP'lerinin türler arasında büyük ölçüde farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin, α -defensinler insan nötrofillerindeki en yaygın konakçı savunma peptidini temsil ederken, bu AMP'ler fare ve sığırlardan alınan nötrofillerde bulunmamaktadır. Bugüne kadar yüzlerce defensin tanımlanmış ve bunların primat türleri arasında bile önemli ölçüde varyasyonlar gösterdiği görülmüştür. Buna karşılık, katelisidin ailesinde çok daha az varyasyon görülür. Çoğu memeli türünde yalnızca birkaç katelisidin üyesi AMP tanımlanmıştır. Tanımlanan ilk memeli katelisidinleri arasında, sığır nötrofillerinden izole edilen baktenesinler (Bac5 ve 7) ve granülositlerde bulunan tavşan CAP18 yer almaktadır (Kościuczuk vd., 2012).

Tıpkı karasal habitatlarda olduğu gibi, AMP'ler, denizlerde yaşayan mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar ve protozoa), omurgalılar (balıklar ve memeliler), omurgasızlar (yumuşakçalar, ekinodermiler), süngerler ve bitkilerde (deniz yosunu) de yaygın olarak bulunmaktadır (Semreen vd., 2018). Bugüne kadar, deniz omurgasızlarında yaklaşık 40 farklı AMP ailesi tespit edilmiş ve bunlar arasından araştırmacıların en çok, biyoaktif bileşikler açısından zengin oldukları düşünülen deniz süngerleri üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür (Otero-González vd., 2010; Sperstad vd., 2011; Destoumieux-Garzón vd., 2016).

Şimdiye kadar tanımlanan AMP'lerin büyük çoğunluğunu böcek AMP'leri oluşturmaktadır (Yi vd., 2014). Böcekler, edinilmiş bir bağışıklık sisteminden yoksun

oldukları için hayatta kalabilmeleri ancak doğuştan gelen bağışıklık sisteminin işlevine bağlıdır. Antimikrobiyal peptidler esas olarak böceklerin vücut yağlarında sentezlenir ve hemolenfte depolanır (Vilcinskas, 2013). İlk olarak dev ipek güveleri *Samia cynthia* ve *Hyalophora cecropia*'nın pupalarında antibakteriyel aktivite gözlemlenmiştir (Boman vd, 1974; Faye vd, 1975) ve *H. cecropia*'nın pupalardan ilk böcek AMP'si (sekropin) 1980'de elde edilmiştir (Hultmark vd, 1980; Steiner vd, 1981). Yapıları ve benzersiz aminoasit dizileri nedeniyle böcek AMP'leri 4 genel gruba ayrılabilir: Bunlar; 1. α -sarmal peptidler (sekropin ve moricin), 2. sistein açısından zengin peptidler (böcek defensin ve drosomisin), 3. prolin bakımından zengin peptidler (apidecin, drosocin ve lebecin) ve 4. glisinden zengin peptidler/proteinlerdir (attacin ve gloverin) (Yi vd., 2014). 20-50 kalıntı içeren küçük AMP'lerden defensinler, sekropinler, proline zengin peptidler ve atasinler yüksek aktiviteye sahipken daha büyük olanların aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Imler ve Hoffmann, 2000; Bulet vd., 2004; Bulet ve Stöcklin, 2005).

AMP'lerin bir diğer kaynağı da mikroorganizmalardır. AMP'ler, bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bunlara örnek olarak, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus brevis*'in ürettiği gramisidin, verilebilir (Cao vd., 2018). Bakteriyel AMP'ler genellikle bakteriyosinler olarak adlandırılmaktadır. Ökaryotik AMP'ler ve bakteriyosinler genel olarak ortak özellikler gösterebilir de bazı önemli farklılıklar söz konusudur. Bakteriyosinler genellikle çok güçlüdür, piko ila nano molar konsantrasyonlarda etki gösterirken, ökaryotik AMP'lerin aktivitesi için mikromolar konsantrasyonlar gereklidir (Nissen-Meyer ve Nes, 1997). Diğer taraftan çoğu bakteriyosinin çok dar bir hedef spektrumu vardır, yani üretici bakteriyle yakından ilgili yalnızca birkaç türe/cinse karşı aktiftir (Nissen-Meyer ve Nes, 1997), ökaryotik AMP'lerin ise genellikle aktivite spektrumu daha geniştir ve çok çeşitli bakterilere karşı etkilidir.

Her ne kadar AMP'ler geniş spektrumlu yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde umut verici moleküller olarak görülse de, terapötik veya diğer uygulamalarda toksisite, düşük stabilite ve yüksek üretim maliyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır. Birçok AMP, yüksek konsantrasyonlarda memeli hücrelerine karşı toksik etki gösterir. AMP'ler bakterilere karşı yüksek *in vitro* aktivite gösterse de genellikle düşük *in vivo* stabiliteye sahiptir. Bu peptidlerin, birçoğu fizyolojik tuz ve serum koşulları altında aktivitesini kaybetmektedir (Goldman vd., 1997; Maisetta vd., 2008). Diğer taraftan AMP'lerin

kullanımı ile ilişkili ana sorunlardan biri de proteazlar tarafından inaktivasyonudur. Düşük proteaz stabilitesi AMP'lerin kullanımını ciddi şekilde sınırlamaktadır. Doğal olmayan aminoasitlerin (esas olarak D-form aminoasitler) yapıya dahil edilmesi, terminal bölgelerin modifikasyonu (asetilasyon veya amidasyon), lineer peptidlerin siklizasyonu veya peptidomimetikler gibi peptid analoglarının, peptidlerin stabilitesini arttırdığı belirtilmiştir (Stromstedt vd., 2009; Giuliani vd., 2011). Ancak, sınırlı farmakokinetik avantajlar sağlayan bu stratejilerin peptidlerin üretim maliyetini de önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür (Li, 2009).

Son yıllarda mevcut antibiyotiklerin kullanımı ile ilgili yaşanan sorunlar ve küresel riskler düşünüldüğünde, yeni antimikrobiyal ajanlara duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Birçok AMP'nin, geleneksel antibiyotiklerin aksine, bakteriyel membrana veya temel hücresel bileşenlere hızlı bir şekilde nüfuz ederek bozması, bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirme şansını zayıflatmaktadır. Çünkü bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirmesi membranın ve/veya çeşitli biyokimyasal yolların tamamen değiştirilmesini gerektirmektedir (Navon, 2002; Mookherjee ve Hancock, 2007). AMP'ler, birçok durumda geleneksel antibiyotiklere dirençli olanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı düşük konsantrasyonlarda bile etkilidir (Pereira, 2006). Herhangi bir antibiyotiğe karşı direncin gelişmesi, sadece o antibiyotiğin, hedef patojene karşı etkinliğini azaltırken, insan kaynaklı antimikrobiyal peptidlere karşı direnç gelişmesi çok daha ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Bunun nedeni, insan antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gelişmesi durumunda, enfeksiyon direncinin de kalıcı olarak tehlikeye girecek olmasıdır. Bu nedenle son zamanlarda insan AMP'lerine çok yakın aminoasit dizilerine sahip peptidlerin klinik olarak kullanımının, kaçınılmaz olarak kendi doğal savunmasını tehlikeye atacağı ve dolayısıyla halk sağlığı için tehdit oluşturacağı konusundaki tartışmalar artmıştır. Bu görüşten hareket ederek bakterilerin AMP'lere karşı direnç geliştirme olasılığını bertaraf etmek için, doğal olmayan (sentetik) AMP'ler geliştirilmesi önerilmiştir (Wiradharma vd., 2011). Ancak yüksek antimikrobiyal etkiye sahip peptidlerin kaynağı olan organizmalara erişimin zor olduğu veya bir çoğunun ekolojik öneme sahip olduğu ve çoğunlukla çevresel faktörlere bağlı olarak sentezlendiği görülmüştür. Doğal AMP'lerin yapısal özelliklerinin değiştirilmesiyle antimikrobiyal aktivitelerinin de geliştirilebildiği düşünüldüğünde *de novo* tasarlanmış peptidlerin bu zorlukların üstesinden gelmede daha iyi bir alternatif olacağı bildirilmektedir.

1.4. AMP'lerin Modifikasyonu

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında antimikrobiyal peptidlerin modifikasyonunda kullanılan yaklaşımları üç genel başlık altında incelemek mümkündür. Bunlar; yapı-aktivite ilişkisini esas alan yaklaşımlar, yapı-toksisite ilişkisini esas alan yaklaşımlar ve yapı-stabilite ilişkisini esas alan yaklaşımlardır.

1.4.1.Yapı Aktivite İlişkisine (SAR) Dayalı Yaklaşımlar

AMP'lerin fizikokimyasal yapıları ve antibakteriyel aktiviteleri arasındaki ilişkiyi açıklamak için, uzunluk, hidrofobiklik, net yük ve ikincil yapı bakımından farklılık gösteren çok sayıda peptid incelenmiştir (Deslouches vd., 2005). AMP'lerin yapı-aktivite ilişkisini (SAR) belirlemek için yapılan çalışmalarından elde edilen bulgular, doğal veya *de novo* tasarımı sentetik peptidlerin yapı ve biyolojik aktivitelerini tahminlemek ve değiştirmek için kullanılabileceğini göstermiştir. SAR çalışmalarının genel amacı, antimikrobiyal aktivite ve proteolitik degradasyona karşı direnci maksimuma çıkarırken konakçıya karşı toksisiteyi en aza indirmektir (Tossi vd., 2000; Zelezetsky ve Tossi, 2006).

1.4.1.1. Konformasyon

Antimikrobiyal peptidlerin konformasyonunu hedef alan SAR çalışmaları daha çok α -sarmal yapıya sahip yeni peptidlerin elde edilmesi ya da mevcut sarmal yapıların modifikasyonu ile ilgilidir. Peptid içerisindeki bazı aminoasitlerin, sarmal oluşturma eğilimini arttırırken bazılarının ise azalttığı belirtilmiştir. Sarmal stabilize edici kalıntılara, lösin, alanin (A), valin (V), izölösün (I), lizin ve arginin (R), stabilize edici etkisi olmayan kalıntılara ise prolin (P) ve glisin örnek gösterilebilir (Yang ve Honig, 1995; Pace ve Scholtz, 1998). Chen vd. (1990) helisitenin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini araştırdıkları bir çalışmada, glisin kalıntıları yerine, helisiteyi arttıran alanin kalıntılarını kullanarak magaininin antimikrobiyal aktivitesini arttırmışlardır (Chen vd., 1990). Dahası, böcek kaynaklı sekropin A ve sekropin P1'in N-terminal sarmalına eklenen prolinin, bazı bakteri türlerine karşı aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir (Andreu vd., 1985; Gazit vd., 1995). Peptid helisitesini azaltmanın bir başka yolu da diziyeye D-aminoasitlerin dahil edilmesidir. Bu sayede hemolitik aktivitenin düşürüldüğü,

antimikrobiyal aktivitenin ise korunduğu gösterilmiştir (Oren ve Shai, 1996). Örneğin, Papo vd. (2002), L-aminoasitlerin % 35'ini D-aminoasitlerle değiştirerek bazı α -sarmal peptidleri modifiye etmiş ve bu modifikasyonun hemolitik aktiviteyi ortadan kaldırdığını tespit etmiştir. Ayrıca, araştırmacılar bu modifiye AMP'lerin proteazlara duyarlı olmadığını göstermişlerdir. Dolayısıyla, helisiteyi değiştirmek, düşük hemolitik aktiviteye; D-aminoasitlerin dahil edilmesi ise yüksek proteolitik stabiliteye sahip yeni sentetik peptidlerin tasarlanması için önemli modifikasyonlar olarak görülmektedir.

1.4.1.2. Net yük

AMP'lerin net yükü, yüksüz kalıntıları pozitif yüklü kalıntılarla değiştirerek artırılabilir (Ueno vd., 2011). Diğer taraftan sekansı değiştirmeden peptidin net yükünü artırmak ise, $-\text{COOH}$ (fizyolojik pH'da negatif yüklü) grubu yerine $-\text{CONH}_2$ grubunun (fizyolojik pH'da nötr) getirilmesiyle mümkün olmaktadır (Jin vd., 2016). Doğal AMP'lerin katyoniklik yükü, 0 ile $>+20$ arasında değişir, ancak aktif peptidlerin çoğunun net yükü, $+3$ ile $+6$ arasındadır. Katyonik yapı, lizin ve arginin (ve bazen histidin (H)) kalıntılarının varlığına bağlanabilir (Kumar vd., 2018). AMP'lerin yükü ile antimikrobiyal aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır (Giangaspero vd., 2001). Brezilya sarı akrebi *Tityusserrulatus*'tan ekstrakte edilen peptidleri şablon olarak kullanan Guo vd. (2013) iki lineer peptid analogu (TsAP-1 ve TsAP-2) tasarlamıştır. Şablon peptiddeki polar yüksüz kalıntıların, pozitif yüklü kalıntılarla yer değiştirmesiyle katyonik yükü artırılan analogların, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Dathe vd. (2001), tarafından magainin analogları ile yapılan bir çalışmada, katyonik yükün $+3$ 'den $+5$ 'e yükseltilmesinin, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitede artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, net yükün $+6$ veya $+7$ 'ye çıkarılmasının, antimikrobiyal aktivite kaybına ve hemolitik aktivitede artışa neden olduğu bulunmuş ve bunun sonucu olarak da katyonikliğin bir sınırı olduğu ve bu sınırın üstündeki herhangi bir pozitif yük artışının antibakteriyel aktiviteyi arttırmadığı belirtilmiştir (Yeaman ve Yount, 2003).

AMP'lerin net yükü ile hemolitik aktivitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin Jiang vd. (2008), amfipatik sarmal AMP, L-V13K peptidinin biyolojik aktivite ve biyofiziksel özellikleri (hidrofobiklik, amfipatiklik, helisite ve peptid kendiliğinden birleşmesi) üzerine net yükün ve hidrofilik yüz içindeki pozitif yüklü kalıntı sayısının etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemişlerdir. Araştırmacılar V13K analoglarının net yükünü +5 ve +10 arasında pozitif yüklü kalıntı sayısını ise 1 ile 10 arasında değiştirmişler ve yapılan değişikliklerin hem antimikrobiyal (altı *Pseudomonas aeruginosa* suşuna karşı) hem de hemolitik aktivitede artışa neden olduğunu göstermiştir. Özellikle V13K peptidinin polar yüzünde (+8 ile +9) ilave yük artışının hemolitik aktivitede (>32 kat) belirgin artışa neden olduğu gözlenmiştir.

AMP'lerin net yük açısından geniş bir aralığa sahip olduğu belirtilmiştir. En düşük net yüke sahip AMP'nin, Chrombacin (net yük -12), en yüksek net yüke sahip AMP'lerin ise, koyun cathelicidin OaBac11 ve fish histon türevi Oncorhyncin II olduğu belirtilmiştir (net yük +30). Bu yüzden net yük için sınır koşulları belirlenmiş ve “-12<net yük<+30” şeklinde tanımlanmıştır. Ancak, AMP'lerin büyük çoğunluğunun (% 97.4) net yükü -5 ile +10 arasında bulunmuştur (Wang, 2014).

1.4.1.3. Hidrofobiklik

Hidrofobiklik, bir peptidin lipit çift katmanlarına ne kadar nüfuz edebileceğini belirler (Pasupuleti vd., 2012). Ancak bir membran-litik peptidinin, konakçı savunma sisteminin bir parçası olabilmesi için hidrofobiklik ile ilgili olarak, iki genel yeterliliği sahip olması gerekmektedir. Bunlar: (i) suda yeterince çözünür olması (düşük hidrofobiklik gereklidir) ve (ii) lipid çift katmanının hidrofobik bölgesi ile etkileşime girebilmesidir (yüksek hidrofobiklik gereklidir) (Dathe ve Wieprecht, 1999). Çünkü AMP'lerin sulu bir fazdan lipid membranlara erişmeleri gerektiğinden, her iki ortamda da çözünür olmaları gerekir. Eğer, AMP'ler çözelti içinde toplanırsa, hücre zarı ile etkileşime girme yeteneklerini kaybederler. Bu nedenle, her AMP için optimal bir hidrofobikliğin olabileceği ve bu değer molekülün diğer özelliklerine göre değişebildiği belirtilmiştir. Çoğu doğal AMP'nin hidrofobikliği yaklaşık %50'dir (Yeaman ve Yount, 2003). Hidrofobikliğin artmasıyla (aa ikame veya lipid konjugasyonu ile) fosfolipid membranlarla etkileşim kolaylaşacağından antimikrobiyal aktivite de artış gözlenecektir (Son vd., 2013; Barreto-Santamari vd., 2019). Bununla birlikte, optimum hidrofobiklik değerinin üzerindeki bir

artışın aktiviteyi hızla azaltabileceği belirtilmiştir (Chen ve Harrison, 2007). Çünkü hidrofobiklikteki aşırı artış, peptidin su içinde kendiliğinden birleşmesine neden olacak ve hedefle etkileşimini engelleyecektir (Dathe ve Wieprecht, 1999). Genel olarak, hidrofobik kalıntılar topaklaşmayı indükleme eğilimindeyken, polar olanlar çözünürlüğü etkiler. Bu durum hidrofobik etkileşimlerin protein toplanmasında önemli bir rol oynadığı varsayımını destekler. En yüksek toplanma eğilimlerini izolösin, fenilalanin (F), valin ve lösin gösterirken, aspartik (D), glutamik (E), asparagin (N) ve arginin en düşük olanlardır (Groot vd., 2005).

Hidrofobiklik, AMP'lerin hedef mikroorganizma aralığını belirlemede kritik bir rol oynamaktadır (Zelezetsky vd., 2005). Örneğin, yalnızca Gram-negatif bakterilere karşı etkili olan magainin peptidinden daha yüksek hidrofobikliğe sahip sentetik analoglarının, bazı Gram-pozitif bakterileri ve ökaryotik hücreleri de öldürebildiği görülmüştür (Dathe vd., 1997). Bu nedenle bir AMP'nin hidrofobikliğini arttırmakla hedef aralığı değiştirilebilir. Bunlara ek olarak, hidrofobiklik ve yükün ters orantılı olması gerekmediği belirtilmiştir (Tossi vd., 2000). Örneğin, bazı peptidler düşük bir yüke sahiptir, ancak nispeten yüksek sayıda yüksüz polar kalıntı içerir veya pozitif yüklü ve asidik kalıntılar dengesine sahiptir ve aktiviteleri, yük yoğunluklarının dağılımına bağlıdır. Bu nedenle yalnızca hidrofobiklik değil hidrofobiklik/yük oranı da, antimikrobiyal peptid tasarımlarında önemli bir rol oynamaktadır (Torres vd., 2018).

Bir amfifilik peptidin, aminoasit sekansı, uzunluğu ve net pozitif yükü ve α -sarmal konformasyonu peptidin hidrofobikliğini, antimikrobiyal aktivitesini ve sitotoksitesini doğrudan etkileyebilir. Chen vd. (2016) tarafından AMP'lerin hidrofobikliğinin, antimikrobiyal aktivite ve seçicilik üzerindeki etkisini anlamak için yapılan bir çalışmada G(IKK)3I-NH₂ dizisi içerisindeki I yerine L ve V eklenerek yeni AMP dizileri elde edilmiştir. Sonuç olarak en yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip peptidin G(ILKK)3L-NH₂ olduğu ve yüksek hidrofobikliğin hemolitik aktiviteyi artırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu peptidin, memeli hücrelerinin dış zar yüzeyini taklit eden zwitteriyonik POPC/kolesterol (10:1) zarı ile etkileştiğinde bile α -sarmal konformasyonu oluşturma eğilimini koruduğu görülmüştür. Aynı peptid iç bakteriyel membranları taklit eden anyonik POPC/POPG (7:3) SUV (Small Unilamellar Vesicle)'ları ile etkileştiğinde, düşük seçiciliğe rağmen membrana çok daha etkili bir şekilde bağlanabilmiştir. Diğer taraftan G(IKK)3I-COOH, G(IKK)3I-NH₂ ile benzer bir hidrofobikliğe sahip olmasına

rağmen C-terminalindeki bir karboksilik grup nedeniyle daha iyi seçicilik sergilemiştir. Nispeten düşük hidrofobiklik, memeli hücrelerinde bulunan zwitteriyonik membranlara bağlanmayı engelleyerek düşük toksisiteye neden olmaktadır. Dolayısıyla AMP'lerin hidrofobikliğinin artması antimikrobiyal aktiviteyi artırmasının yanında, daha düşük bir seçiciliğe neden olduğu için memeli hücreleri de dahil olmak üzere her türlü hücre zarına nüfuz etme kabiliyetini de artırmaktadır. (Edwards vd., 2012).

Farklı hidrofobikliğe sahip model peptidler incelendiğinde, hidrofobiklik ile hemolitik aktivite arasında bir korelasyonun olduğu gözlenmiştir (Ohmori vd., 1998). Blondelle ve Houghten (1992), bir amfipatik model peptidin hidrofobik bölgesinde lizinin lösini ile ikame edilmesinden kaynaklanan hidrofobiklikteki azalmanın, hemolitik aktivitesini önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir. Öte yandan, hidrofilik heliks bölgesinde lizinin lösini ile yer değiştirmesi hidrofobikliği artırarak hemolitik aktiviteyi de artırmıştır. Başka bir çalışmada ise, kurbağa peptidi brevinin 1E analoglarının hemoliz oranının hidrofobiklik ile arttığı bulunmuştur (Kwon vd., 1998).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, hidrofobiklik ile antibakteriyel aktivite arasındaki ilişkiyle ilgili olarak çok sayıda çelişkili sonuç olduğu görülmektedir. Çünkü birden fazla yapısal parametrenin eşzamanlı olarak değiştirilmesi, hidrofobikliğin rolünün değerlendirilmesini zorlaştırmıştır. Örneğin, hidrofobik heliks yüzünde bir lizin kalıntısının lösini ile değiştirilmesi sadece hidrofobikliği azaltmakla kalmaz, aynı zamanda amfipatikliği ve toplam yükü de değiştirir (Blondelle ve Houghten, 1992). Brevinin 1E'den N-terminal kalıntıların çıkarılması sadece hidrofobikliği değil aynı zamanda sarmal eğilimi ve hidrofobik momentini de etkiler (Kwon vd., 1998). Araştırmacılar bu sorunu çözmek için, farklı hidrofobikliğe sahip, ancak diğer yapısal parametreleri büyük ölçüde değişmemiş peptid analogları tasarlamıştır. Hidrofobikliği modifiye edilmiş analoglar, yüksek antibakteriyel ve hemolitik aktivite sergileyen magainin 2 amidinin aminoasit sekansından ve amfipatik sarmal model ise KLA1 peptidinden türetilmiştir. Sonuç olarak, her iki peptid setinde de hidrofobiklik ve hemolitik aktivite arasında güçlü bir korelasyon olduğu görülmüştür (Dathe vd., 1996; Dathe vd., 1997). Benzer şekilde, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitenin artan peptid hidrofobikliği ile arttığı bulunmuştur.

Hidrofobik içerik, hidrofobik aminoasitlerin sayısının bir peptiddeki toplam aminoasit sayısına bölünmesini ifade eder. Hidrofobik aminoasitler, alanin, valin, lösin, izolösin, metiyonin (M), fenilalanin, triptofan, ve sistein (C)’den oluşur. APD veritabanından en düşük ve en yüksek hidrofobik içeriğe sahip AMP’ler incelendiğinde, koyun anyonik peptidi SAAP (dizi: DDDDDD)’ın dizisinde hidrofobik kalıntı olmadığı, bu nedenle de hidrofobik içeriğinin % 0 olduğu bulunmuştur. En yüksek değerin ise; % 93’lük hidrofobik içerikle Gramisidinlere ait olduğu belirlenmiştir. Böylece, peptid hidrofobikliği için belirlenen sınır koşulları “% 0 ≤ - <% 93” olarak tanımlanmıştır. Ayrıca AMP’lerin çoğunun (% 98.6), % 10 ila % 80 arasında değişen bir hidrofobik içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir (Wang, 2014).

1.4.1.4. Amfipatiklik

Amfipatiklik, katyonik ve hidrofobik kalıntılar arasındaki denge olarak düşünülebilir. AMP’lerin membran arayüzüyle güçlü etkileşiminde, amfipatikliğin hidrofobiklikten daha önemli olduğu gösterilmiş, belirli hedef hücreler için sentetik AMP’ler tasarlanırken amfipatik yapıya öncelik verilmesi gerektiği belirtilmiştir (Fernandes-Vidal vd., 2007). Bu özellik, bir peptidin hidrofobik moment (μH) olarak tanımlanır ve 0 ila 3.26 arasında değerler alır (Gautier vd., 2008). AMP’ler anyonik ve katyonik aminoasit kalıntılarını pozisyonunu değiştirerek, amfipatik fosfolipid membranlarla optimal elektrostatik etkileşime izin veren ikincil bir yapı benimseyebilir. Bu özellik, peptidin sadece negatif yüklü hücre zarlarına karşı değil, aynı zamanda nötr veya amfipatik yapıya sahip biyolojik yapılara da sitotoksik aktivite göstermesine neden olur (Zelezetsky ve Tossi, 2006).

1.4.1.5. Hidrofobik moment

Hidrofobik moment, bir proteinin veya peptidin hidrofobik kalıntılarının peptidin bir tarafında hizalanmış olma eğilimini ifade eder. Hidrofobik momentin, antimikrobiyal veya hemolitik aktivite üzerindeki etkisini ayrıntılı olarak araştırmak için, “minimal sekans modifikasyonu” yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşıma göre, hidrofobik moment, birkaç aminoasit değiştirilerek ayarlanırken, hidrofobiklik, peptid yükü, zincir uzunluğu ve hidrofilik ve hidrofobik sarmal yüzlerin açıları büyük ölçüde sabit tutulmuştur. Antibakteriyel magainin 2 amidinin analogları ile yapılan çalışmalar, birkaç korunmuş aminoasidin ikamesiyle artan hidrofobik momentin, antimikrobiyal aktiviteyi önemli

ölçüde artırdığını bulmuşlardır (Wieprecht vd., 1997). KLAL model peptidlerle yapılan çalışmalar, hidrofobik momentin, lipid membranların geçirgenleşmesinde önemsiz bir rol oynadığını, ancak nötr lipid membranlar üzerinde önemli ölçüde etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu gözlem, hidrofobik momentteki değişikliklerin ağırlıklı olarak hidrofobik peptid-lipid çift tabaka etkileşimleri üzerinde etkili olduğunu doğrulamaktadır (Dathe vd., 1999). İlginç bir şekilde, hidrofobik momentin aktiviteyi düzenleyici etkisi, çok düşük ve yüksek hidrofobikliğe sahip peptidlerde daha düşük bulunmuştur (Dathe vd., 1997). Sonuç olarak, hidrofobik momentin modifikasyonları, peptidlerin biyoaktivitesini düzenlemek için kullanışlı bir araçtır. Bununla birlikte, seçiciliği korurken, yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidlerin tasarlanmasına yönelik sınırlı bir imkan sunmaktadır (Dathe ve Wieprecht, 1999).

1.4.2.Yapı Stabilité İlişkisine Dayalı Yaklaşımlar

AMP tasarımlarında üzerinde yoğunlaşılacak bir başka konu da stabilite sorunudur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, daha çok proteaz direnci, tuz toleransı termal stabilite üzerinde durulduğu görülmüştür. Çoğu AMP'nin, mide asitleri veya intestinal peptidazlar tarafından hızla bozundukları ve absorbe edilmedikleri için biyolojik işlevlerini oral yoldan uygulandığında yerine getiremedikleri tespit edilmiştir (Vlieghe vd., 2010). Bazı sıklık ve/veya lineer peptidler oral yoldan verilebilmesine rağmen, bir çoğu enjeksiyonla uygulanmaktadır (Barreto-Santamaria vd., 2019). AMP'lerin plazmadaki yarı ömrünü artırmak için uygulanan stratejilerden biri sekansların kısaltılmasıdır. Bu yolla üretim maliyeti de önemli ölçüde düşürülmektedir (Svenson vd., 2010). Diğer bir strateji de, olası proteolitik kesim bölgelerinin tanımlanarak ve ilgili aminoasidin değiştirilmesi veya bunların peptid katlama veya siklizasyonla korunmasıdır (Falanga vd., 2017; Barreto-Santamaria ve ark., 2019). Asilasyon, albümin bağlama elemanlarının eklenmesi veya antikorlarla konjugasyon gibi modifikasyonlar, peptid yarı ömrünü dolaşımdaki moleküllere bağlayarak arttırmak için kullanılan yaklaşımlardır (Xie vd., 2010; Barreto-Santamaria vd., 2019).

1.4.2.1.Tuz Toleransı

Tuz toleransı, AMP'lerin *in vitro* kullanımlarındaki sağlamlıklarının artırılmasında oldukça önemlidir. Çünkü çoğu AMP'nin tuzla inaktive olduğu belirtilmiştir.

İndolisidinler, magaininler, baktenesinler ve defensinler gibi birçok katyonik AMP, yaklaşık 150 mM NaCl, 1 mM Mg^{2+} ve 2 mM Ca^{2+} fizyolojik tuz konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktivitelerini kısmen veya tamamen kaybederler (Ong vd., 2014). Yüksek tuz konsantrasyonları, katyonik peptidlerin anyonik mikrobiyal hücre yüzeyine elektrostatik tutunumunu azaltabilir. Katyonik AMP'lerin Gram-negatif bakterilere bağlanması, bakterinin dış zarında LPS ile bağlanmak için peptidlerle rekabet eden Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar tarafından engellenir (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015).

Human β -defensin-3 (HBD-3), tuza toleranslı birkaç AMP'den biridir. Bu peptidin tuza dayanıklılığının, C-terminalindeki "RRKK" motifinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Li vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada doğal HBD-28 peptidi, "RRKK" motifini içerek şekilde tasarlanmış ve yüksek tuz toleransına sahip geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite sergileyen hibrit HBD-28 varyantı elde edilmiştir (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015).

Peptidlerin antimikrobiyal aktivitesini ve tuz stabilitesini geliştirmek için bir diğer yaklaşım da, yüksek membran arayüz afinitesine sahip olan triptofan (W)'nin, hidrofobik uç etiketi olarak kullanılmasıdır. Pasupuleti vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, kininojenden türetilen kısa peptidlerin, "WWWW" ile etiketlendiğinde, yüksek iyonik kuvvet (150 mM NaCl) altında etiketsiz peptidlere kıyasla daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Öte yandan Chu vd. (2013), kısa ve W bakımından zengin AMP'lerin (KWWK ve Ac-KKWRKWLAKK-NH₂) β -naftilalanin ile son etiketlenmesinin, tuz varlığında proteaz direnci ve antimikrobiyal etkinliği için yeterli olduğunu bulmuştur. Yu vd. (2011), histatin türeviden P-113'teki W veya H kalıntılarını β -naftilalanin ve β -(4,4'-bifenil) alanin ile değiştirerek elde ettikleri analogların, 300 mM NaCl veya 2.5 mM $MgCl_2$ 'ye kadar yüksek tuz koşulları altında antimikrobiyal özelliklerini koruduğunu göstermiştir. Kim vd. (2013) hidrofobikliği %33 ile %46 arasında ve pozitif yükü +4 ile +5 arasında olan 7 α -sarmal peptid tasarlamış ve hidrofobikliğini arttırmak için tüm V kalıntılarını I veya L kalıntıları ile değiştirdiklerinde peptidlerin 150 mM NaCl koşullarında aktivitelerini koruduğunu bulmuşlardır (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015).

AMP'lerin tuz toleransının, uygun şekilde konumlandırılmış disülfür bağlantıları yoluyla oluşan dimerizasyon veya siklizasyon gibi yapısal değişiklikler ile de artırılabilceği bildirilmiştir (Ong vd., 2014). Nan ve Shin (2011) disülfid bağ pozisyonunun AMP'lerin tuz direnci üzerindeki etkisini araştırmak için, bir model peptid (K6L4W1) kullanarak bir disülfid bağından oluşan homo-dimerik peptidler elde etmişlerdir. Sonuç olarak, di-K(6)L(4)W(1)-N ve di-K(6)L(4)W(1)-C dimerik peptidlerinin 150 mM NaCl koşullarında antimikrobiyal aktivitelerini korudukları ve tuza dayanıklı α -heliks homo-dimerik AMP'ler tasarlanırken, merkezi konumdan ziyade molekülün N- veya C-terminalinde bir disülfid bağının varlığının daha etkili olabileceği gösterilmiştir.

1.4.2.2. Polar açı

Bir peptidin polar açısı, bir amfipatik sarmal peptidin polar ve polar olmayan yüzlerinin nispi oranına karşılık gelir. Bir yüzü tamamen polar aminoasit kalıntılarından oluşan ve diğer yüzü tamamen polar olmayan kalıntılardan oluşan sarmal bir peptid, 180°'lik bir polar açığa sahip olacaktır. Hidrofobik kalıntıların yoğunluğu, daha düşük bir polar açığa neden olmaktadır. Uematsu ve Matsuzaki (2000) tarafından hem sentetik hem de doğal olarak elde edilen peptidler üzerinde yürütülen çalışmalar, daha düşük bir polar açının ve dolayısıyla daha hidrofobik bir tarafın membran geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir. Polar açı, biyomembranlarda peptid kaynaklı gözeneklerin stabilitesi ile de ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, daha küçük polar açılara sahip antimikrobiyal peptidlerin, daha büyük polar açılara sahip peptidlere kıyasla daha yüksek membran geçirgenliği ve translokasyonu indükleyebildiğini de göstermişlerdir. Bununla birlikte, daha küçük polar açılara sahip peptidlerin oluşturduğu gözeneklerin stabilitesinin, daha büyük polar açılara sahip peptidler tarafından oluşturululardan daha düşük olduğu bulunmuştur (Dathe ve Wieprecht, 1999; Ebenhan vd., 2014).

1.4.2.3. Proteaz stabilitesi

AMP'lerin *in vivo* aktivitesini zayıflatan en önemli nedenlerden biri de proteaz stabilitesidir. AMP'ler için en önemli tehdidi oluşturan insan proteazları (ripsin ve kimotripsin), sırasıyla bazik (L ve R) ve hidrofobik kalıntılara (W ve F) sahip peptidleri hedef alır. Peptidleri, siklizasyon, terminal bölgelerinin modifikasyonu (N-terminal asetilasyon veya C-terminal amidasyonu) veya doğal olmayan aminoasitlerin (esas olarak

D-formundaki aminoasitler) dahil edilmesi gibi modifikasyonlarla proteazların etkisinden korumak mümkün olabilmektedir (Ong vd., 2014; Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015). Kim vd. (2013), tarafından yapılan bir çalışmada α -sarmal amfipatik yapıda tasarlanan *de novo* peptidler (GNU₁₋₇) proteolitik kesim bölgelerinden arındırılmıştır. Bu sayede, 12 saate kadar tripsin, kimotripsin ve aureolizine maruz kaldığında sindirilmeyen, eritrositlerin, keratinositlerin ve fibroblastların canlılığını etkilemeyen ve metisiline dirençli *S. aureus* ve vankomisine dirençli enterokoklara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösteren, GNU6 (RIIRPIIQIKQKIR) ve GNU7 (RLLRPLLQLLKQKLR) peptidlerini tasarlamayı başarmışlardır (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015).

AMP'lerin siklizasyonu ile oluşan yapısal kararlılığın, proteaz stabilitesini arttırdığına inanılır. Nguyen vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada uç etiketleme ve siklizasyon gibi bir dizi basit modifikasyonlar kullanılarak triptofan ve arginin kalıntıları bakımından zengin birkaç kısa antimikrobiyal peptid, tasarlanmıştır. Laktoferrinden türetilen triptofan ve arginin bakımından zengin heksapeptidlerin terminal modifikasyonu, stabilitelerini sırasıyla N-asetilasyon+C-amidasyon> N-asetilasyon> C-amidasyon şeklinde arttırmıştır (Nguyen vd., 2010). Ayrıca, Stromstedt vd. (2009), LL-37'den N-asetilasyon veya C-amidasyona ek olarak W ikamesi ile türettikleri EFK17 peptidinin proteaz stabilitesinin arttığını göstermiştir. Wang vd. (2010), ideal bir amfipatik α -sarmal yapıya sahip Lysin/Lizin açısından zengin model peptid "K₉L₈W"infarklı sayı ve dağılımda D-aminoasit içeren diastereometrik analoglarını tasarlamıştır. Sonuçlar, tripsin tarafından enzimatik bozunmaya tam direnç sağlamak için katyonik peptidlerde % 33'lük bir D-aminoasit ikamesinin gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca kısa katyonik peptidlerin triptofan, fenilalanin ve β -naftilalanin gibi 1 ila 5 hidrofobik aminoasit ile uç etiketlemesinin (özellikle C-terminalindeki Trp etiketlemesinin) proteaz stabilitesini ve antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur. Malmsten vd. (2011), GRRPRPRPRP (GRP10) ve RRPRPRPRP (RRP9) peptid sekanslarının C-terminal ucunun triptofan veya fenilalanin kalıntıları ile etiketlenmesinin, antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını göstermiştir. Özellikle 4W-etiketli RRP9WWW-NH₂ peptidinin, çok yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği ve proteolitik bozunmaya oldukça dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca W-etiketli peptidlerin, elastaz ve aureolizine karşı stabilite gösterdiği ve vankomisine dirençli enterokoklara, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* ve

metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015).

1.4.3.Yapı Toksisite İlişkisine Dayalı Yaklaşımlar

Sitotoksisite, antimikrobiyal peptid tasarımlarında dikkate alınması gereken önemli parametrelerden biridir (Lohner, 2001). Peptidlerin amfipatik yapıları mikroorganizmaların negatif yüklü zarlarıyla etkileşimlerine izin verirken, zarlarında zwitteriyonik lipidler bulunan ökaryotik hücrelerle etkileşimlerini sınırlamaktadır. Ayrıca, memeli hücrelerinin zarlarındaki yüksek kolesterol seviyeleri (%20-%30), mekanik sertliğini artırarak lipid çift tabakasını stabilize eder, bu durum zarın esnekliğini ve dolayısıyla AMP'lere karşı geçirgenliğini azaltır (Henriksen vd., 2006).

AMP'lerin bakteriyel hücrelere karşı seçiciliğini artırmak ve ökaryotik hücrelere karşı düşük sitotoksisite sergileyen yeni peptidler tasarlamak için çeşitli stratejiler bildirmiştir. Singh vd. (2016), *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite sergileyen 13 kalıntılı bir AMP olan α -MSH'yi tasarlarken, net pozitif yükteki artışın peptidin anti-stafilokok potansiyeline katkısını araştırmıştır. Polar yüksüz kalıntıların lizin ve alanin ile değiştirilmesi ile tasarlanan analoglarda artan katyonik yük, hücre seçiciliğinden ödün vermeden önemli bir aktivite artışına neden olmuştur.

Gong vd. (2019), tarafından yapılan bir çalışmada G (IHKK)nI-NH₂ genel formülüne (n = 2-4 ve AMP'ler sırasıyla G2, G3 ve G4) dayalı bir dizi sürfaktan benzeri α CAMP (α -heliks katyonik AMP'ler) tasarlanmıştır. Bunlar arasında, G3'ün güçlü bir biyoaktivite ve konak memeli hücrelerine karşı düşük sitotoksisite gösterdiği belirtilmiştir. Bir AMP'nin sahip olduğu hidrofobiklik ne kadar yüksek olursa, tüm hücre membranlarına nüfuz etme yeteneği de o kadar güçlüdür. Bu durum daha yüksek bir antimikrobiyal aktivite sağlamakta ancak aynı zamanda daha düşük bir seçiciliğe dolayısıyla konak memeli hücrelerinde daha yüksek bir sitotoksisiteye yol açmaktadır. Kim vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, AMP'lerin tasarımında; amfipatik yapıda olmasına, antimikrobiyal aktivite ve seçicilik için önemli olan yapısal özelliklerinin korunmasına ve proteaz-kesim bölgelerinden arındırılmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, daha önceki çalışmalardan edindikleri bilgiler ışığında, hem hidrofobik hem de polar yüz derinliklerini arttırmak için peptidlerin tasarımında V, L, I ve Q gibi uzun alifatik yan

zincirlere sahip aminoasitler kullanmışlardır. Önerdikleri peptidlerden ikisi, GNU6 ve GNU7, klinik olarak dirençli suşlar (metisiline dirençli *S. aureus* ve VRE gibi) ve mantarlar dahil olmak üzere bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. GNU5, GNU6 ve GNU7'nin hem endojen insan proteazlarına (tripsin ve kimotripsin) hem de istilacı mikroorganizmalardan (aureolisin) salgılanan proteaza dirençli olduğu ve insan hücrelerine karşı sitotoksiste göstermediği bildirilmiştir.

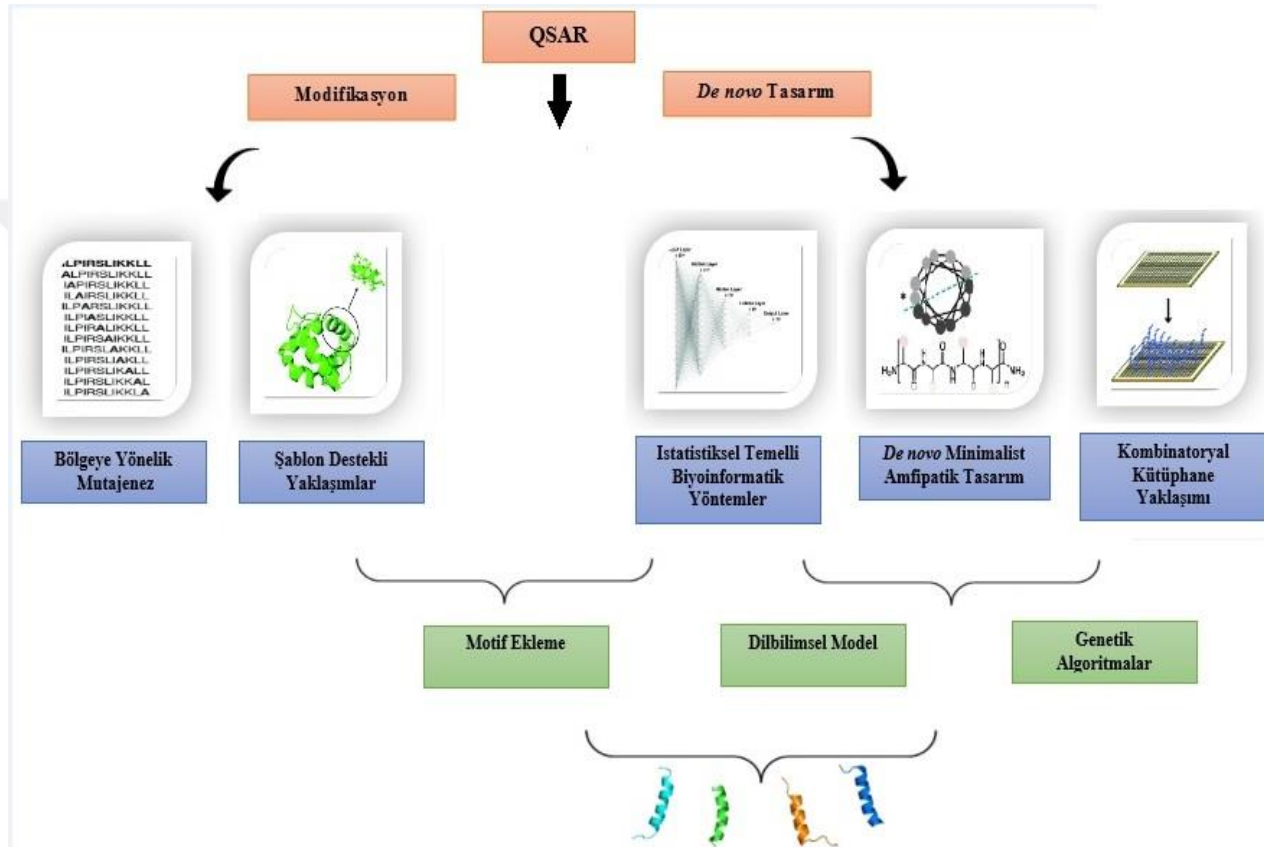
Sitotoksiste, peptid bazlı ilaçların geliştirilmesindeki en önemli zorluklardan biri olduğundan, peptid toksisitesini tahmin etmeye yönelik hesaplamalı yöntemlerin geliştirilmesi, yalnızca zamandan ve paradan tasarruf edilmesini sağlamakla kalmamakta aynı zamanda düşük toksisiteye sahip terapötik peptidlerin tasarlanmasını da kolaylaştırmaktadır. Gupta vd. (2013), bu durumu göz önünde bulundurarak, peptidlerin ve proteinlerin toksisitesini tahmin etmek için *in silico* modeller geliştirmiştir. Bu sayede, toksiditesinin tahmin edilmesine yardımcı olacak bir web sunucusu olan ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) geliştirilmiştir. Çalışmada ek olarak, C'nin toksik peptidlerde yüksek oranda ve hemen hemen tüm pozisyonlarda bulunduğu gösterilmiştir. Yine P, D ve H kalıntıların, toksik peptidlerde toksik olmayanlara kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur.

1.5. Sentetik Antimikrobiyal Peptidlerin Yapı-Aktivite İlişkisine Dayalı Tasarım Yaklaşımları

Sentetik AMP tasarımlarında temel amaç, peptidlerin antimikrobiyal aktivitelerini ve stabilitelerini arttırmak ve konakçıya karşı toksisitelerini en aza indirmektir. Sentetik AMP'lerin tasarımı ve yapı aktivite ilişkisi (SAR (Structure Activity Relationship)) çalışmaları incelendiğinde genel olarak beş yaklaşım benimsenmiştir. Bunlar;

- doğal peptidlerin şablon olarak kullanıldığı sekans modifikasyonları
- bölgeye yönelik mutajenez
- de novo* minimalist amfipatik peptidlerin tasarımı
- sık rastlanan aminoasit kalıntılarının kullanıldığı peptid tasarımları
- yeni öncü sekansların tanımlanmasını sağlayan biyoinformatik ve kombinatoriyal kütüphanelerin kullanılmasından oluşur.

Bunlardan ilki peptidlerin modifikasyonları ile ilgiliyken diğer üçü *de novo* tasarımı peptidler kapsamında incelenmiştir. Aşağıda peptid tasarımında kullanılan yaklaşımların şematik gösterimi verilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Özgün AMP dizilerinin elde edilmesinde kullanılan yapı aktivite ilişkisine dayalı tasarım stratejileri

Belirli bir peptid zincirindeki herbir aminoasidin fizikokimyasal özellikleri belirlenerek, söz konusu peptidin fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi edinilebilmektedir. Aminoasit bileşimindeki küçük değişiklikler bile bir peptidin tüm geometrik ve fizikokimyasal özelliklerinde büyük farklılıklara yol açabilmektedir. Peptidlerin yapı-aktivite ilişkilerinde dikkate alınan en önemli parametreler; aminoasit dizileri, ikincil yapı, net yük, hidrofobiklik ve amfipatiklik olarak sıralanabilir.

1.5.1. Dizi şablonları

Bazı araştırmacılar, peptidlerin antimikrobiyal aktivitesinin genel aminoasit kompozisyonları (bazik, asidik, alifatik veya aromatik) ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Hilper vd., 2006; Findlay vd., 2010). Bu özelliklerdeki çok küçük değişiklikler bile peptidlerin antimikrobiyal aktivitesini ve konakçı hücrelere karşı toksisitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bir çalışmada L-aminoasidinin, D-aminoasidi ile değiştirilmesinin düşük hemolitik aktivite ve yüksek antimikrobiyal aktiviteyle sonuçlandığı gösterilmiştir (Li vd., 2002; Kim vd., 2017; Barreto-Santamaria vd., 2019).

Sarmal yapılar için etkili bir cap kalıntısı olan glisinin, belirli bir peptidin N-terminallerindeki birinci kalıntıyla yer değiştirmesi (Zelezetsky ve Tossi, 2006), peptidleri parçalayan aminopeptidazlara karşı direnç kazandırmaktadır. Başka bir çalışmada da, karboksipeptidazlara direnç sağlamanın yolu olarak C-terminalinin amidasyonu gösterilmiştir. Gerçekleştirilebilecek diğer modifikasyonlar arasında yaygın olarak proteazlara karşı direnç sağlayabilen laktam halkası veya disülfid köprülerinin diziye dahil edilmesi yer almaktadır (Torres vd., 2014).

1.5.2. Doğal Peptidlerin Şablon Olarak Kullanıldığı Sekans Modifikasyonları

Doğal peptidlerin şablon olarak kullanıldığı sekans modifikasyonlarına dayanan stratejide, bitkiler, böcekler, amfibiler ve memeliler gibi çok çeşitli organizmadan elde edilen AMP sekansları sentetik tasarımlar için şablon olarak kullanılmaktadır. Şablon değişikliği ise, peptid sekansının kısaltılması, aminoasit değişimi, hibridizasyon ve/veya siklizasyon ile sağlanmaktadır. Bu yaklaşımın kullanılmasıyla elde edilen modifiye katyonik peptidlerin sayısı oldukça fazladır. AMP sekansının kısaltılmasıyla elde edilen kısa peptidler, terapötik uygulamalar için sentetik AMP'lerin büyük ölçekli üretimindeki maliyeti azaltabilmektedir. AMP'lerin siklizasyonu, lineer peptidlere kıyasla daha yüksek membran geçirgenliğine yol açmaktadır. Doğal olarak oluşan AMP dizilerinden kesilmiş fragmanların bir araya gelmesiyle oluşturulan hibrid peptidler ise, ana peptidlerin arzu edilen özelliklerinden yararlanmak için kullanılan etkili bir stratejidir. Böylece, düşük toksisite ve aktiviteye sahip bir AMP ile yüksek aktivitede fakat nispeten daha toksik başka bir AMP'nin sekanslarının kombinasyonu ile yüksek antimikrobiyal aktivite ve

düşük toksisiteye sahip yeni kimerik AMP'lerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Ong vd., 2014).

1.5.3. Bölgeye Yönelik Mutajenez

Bu yaklaşım, şablon peptidde bir veya birkaç aminoasit kalıntısının eklenmesi, silinmesi veya değiştirilmesine dayanmakta ve tek bir aminoasit değişikliğinin peptidin fonksiyonu üzerindeki etkisini anlaşılabilmesini amaçlamaktadır. Örneğin, alanin veya lizin taramaları sayesinde bir peptid zincirindeki tüm aminoasit yan zincirlerinin yapı ve işlev üzerindeki etkisi analiz edilebilmektedir. Başka bir örnek de, peptid dizisindeki kalıntıların karıştırılarak, aynı bileşime sahip ancak aminoasitlerin farklı sıralarda olduğu dizilerin üretildiği peptid karıştırmasıdır (Torres vd., 2019).

1.6. *De novo* Antimikrobiyal Peptid Tasarım Yaklaşımları

Yeni antimikrobiyal peptidlerin (AMP) tasarımında asıl amaç, peptid antimikrobiyal aktivite ve hücre seçiciliğini iyileştirmenin yanı sıra, tuz ve proteaz stabilitesini de arttırmaktır. Doğal veya sentetik model peptidlerin yapı-aktivite ilişkisini (SAR) inceleyen birçok çalışma, peptidlerin antimikrobiyal aktivitesinin, yapısal ve fizikokimyasal parametrelerdeki (örneğin; yük, hidrofobiklik ve amfipatiklik) değişimlerden etkilenebileceğini göstermiştir (Huang vd., 2010; Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015). Konak hücrelere karşı düşük toksisite, yüksek tuz toleransı ve proteolitik parçalanmaya direnç, AMP'lerin terapötik amaçlı kullanımlarında dikkate alınan kritik parametrelerdir. AMP'lerin bu özelliklerinde belirli iyileştirme sağlanabilmesi için, moleküler etki mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılması gerekmektedir. Bu amaçla yapısal ve fizikokimyasal parametrelerin incelendiği yapı-aktivite ilişkisi çalışmalarına, hesaplamalı yaklaşımların da dahil edildiği görülmüştür (Cytryńska ve Zdybicka-Barabas, 2015). Yapı aktivite, stabilite ve toksisite çalışmalarını esas alan *de novo* AMP'lerin tasarımında genel olarak üç yaklaşım benimsenmiştir. Bunlar;

1-*de novo* minimalist amfipatik peptidlerin tasarımı

2-sık rastlanan aminoasit kalıntılarının kullanıldığı peptid tasarımları

3-yeni öncü sekansların tanımlanmasını sağlayan biyoinformatik ve bütünleştirici (kombinatorial) kütüphanelerin kullanımına dayanan yaklaşım

Minimalist *de novo* tasarım yaklaşımı, doğal AMP'lerin antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen katyoniklik, amfipatiklik veya alfa-heliks, sheet-tabaka, siklik yapı gibi özelliklerinin anlaşılmasına dayanmaktadır. Bu yaklaşım, antimikrobiyal etki için gerekli olan en küçük motif veya farmakoforun tanımlanmasını sağlamakta ve kısa peptid sekansının sistematik modifikasyonlar yoluyla optimizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Örneğin; AMP'lerin *de novo* tasarımında, R ve K, fizyolojik koşullar altında protonlandıkları ve güçlü antimikrobiyal aktivite sağladıkları için temel aminoasitler arasında oldukça popülerdir. R kalıntılarının AMP dizisine dahil edilmesi daha yüksek antimikrobiyal aktivite sağlarken, K kalıntılarıyla karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek hemolitik aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Wiradharma vd., 2011; Ong vd., 2013).

Antimikrobiyal etkiyi arttırmanın bir yolu olarak amfipatik α -sarmalın optimize edilmesini amaçlayan bir çalışmada, kesintisiz hidrofobik ve kesintisiz katyonik bölge içeren peptidler tasarlanmış ve bu peptidlerin membran seçiciliğini arttırdığı görülmüştür. Bu tarz dizi değişikliğine dayanan tasarımlarda kullanılmak üzere bir takım araçlar önerilmiştir. Bunlardan ilki Schiffer ve Edmundson (1967) tarafından bulunan ve “sarmal tekerlek” adı verilen iki boyutlu bir gösterimdir. Aminoasitlerin sarmal peptid dizisi içerisinde belirli konumlara yerleştirilmelerini veya yer değiştirmelerini kolaylaştıran bu gösterim, peptidlerin biyolojik aktivitelerini etkileyen parametreleri optimize etmek için kullanılmıştır. Khara vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada hidrofobik ve katyonik yüzleri ayrılmış α -sarmal amfifil peptidler elde etmek için dört aminoasitten oluşan (X1Y1Y2X2)_n dizisi tasarlanmıştır. Burada, X1 ve X2 hidrofobik kalıntıları (L veya I veya W), Y1 ve Y2 katyonik kalıntıları (K), n ise tekrar birimini (2 veya 2.5 veya 3) ifade etmektedir. Sonuç olarak önerilen bu dizinin, $n \leq 3$ için mükemmel amfipatik yapılara sahip peptidlerin *de novo* tasarımını mümkün kıldığı gösterilmiştir. Ayrıca tasarlanan peptidlerden bakteri hücrelerine karşı seçiciliği en yüksek olan (LKKL)₃'ün hem Gram-negatif ve hem de Gram-pozitif bakteri membranlarının geçirgenliğini arttırdığı ve antibiyofilm etkisi gösterdiği bildirilmiştir.

Freceer vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da antibakteriyel etki mekanizmasını esas alan rasyonel bir tasarım stratejisi kullanılarak antimikrobiyal aktivite arttırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, lipopolisakkarit (LPS) ve Lipit A (LA) bağlanma bölgesine sahip

sentetik katyonik peptidlerin *de novo* tasarımı gerçekleştirilmiştir. Toplamda yedi adet peptid tasarlanmış ve peptidlerin her biri bir disülfid köprüsü aracılığıyla halkasal hale getirilmiştir. Ayrıca peptidler, bir GSG döngüsüyle bağlanan iki özdeş LPS ve LA bağlanma dizisini içerecek şekilde tasarlanarak (Ac-C-HBHB (P) HBH-GSG-HBHB (P) HBH-C-NH₂), amfipatik β -saç tokası benzeri yapılar oluşturulmuştur. Bu dizide hidrofobik kalıntılar (H) olarak A, V, F veya W tercih edilirken, katyonik kalıntılar (B), K veya R'i polar kalıntılar (P) ise S veya Q'i ile temsil edilmiştir. Çalışma sonunda *de novo* tasarlanmış V1-V7 peptidlerinin Gram-negatif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergiledikleri gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, AMP veritabanlarında sık rastlanan aminoasit kalıntılarının, peptid tasarımlarında farklı şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Bu yaklaşımlardan ilki, “doğal kaynaklı antimikrobiyal peptidlerden türetilen şablonlara” dayanan tasarım yaklaşımıdır. Örneğin; insan LL-37'den türetilen en küçük antibakteriyel peptid olan KR-12 şablon olarak kullanarak, tüm hidrofobik kalıntılar lösinlere ve tüm yüklü ve hidrofilik kalıntılar lizine dönüştürülmüş ve sonuçta KL-12 tasarlanmıştır. İkinci yaklaşım, veritabanından türetilen ve sık rastlanan kalıntıları içeren peptid motiflerinin birleştirilmesine dayanmaktadır. Örneğin; sadece G, L ve K kalıntılarından oluşan motifler kullanılarak yeni bir peptid olan GLK-19 tasarlanmıştır. GLK-19'un *E. coli*'ye karşı aktif olduğu ve MRSA'ya karşı zayıf aktivite gösterdiği bulunmuştur. Üçüncü yaklaşım ise, belirli bir peptid familyasındaki antimikrobiyal peptidlerin istatistiksel analizinden elde edilen aminoasit yüzdeleri temel alınarak yeni peptidlerin tasarlanmasına dayanmaktadır. Örneğin; MULTI-18'in aminoasit kompozisyonu, her kalıntının yüzdesinin, hedef peptiddeki toplam kalıntı sayısı (burada 18) çarpılması sonucunda elde edilmiştir. Böylece, elde edilen istatistiksel değerlere göre; 2 G, 2 A, 3 L, 3 K, 2 I, 1 F, 1 D, 1 V, 1 T, 1 S ve 1 N kalıntılarını içeren peptid motifleri oluşturulmuştur. Daha sonra bu motifler birleştirilerek çoklu peptid dizileri elde edilmiştir. Sarmal peptid yapısı amfipatiklik dikkate alınarak tasarlanmış ve sonuçta MULTI-18 elde edilmiştir (Wang vd., 2009). Yine yakın bir zamanda Decker vd. (2022), belirli aminoasitlerce zengin AMP'ler üzerine bir çalışma yapmış ve başta H, G, P, W ve R olmak üzere 20 aminoasidin tümünü APD veritabanındaki peptidlerde bulunma oranına göre incelemiştir. Buna göre, H, P ve R açısından zengin AMP'lerin memelilerde, A, G ve L açısından zengin AMP'lerin ise amfibilerde bol miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca,

AMP'lerde en sık rastlanan 10 aminoasidin A, C, G, H, I, k, L, P, R ve V olduğu belirtilmiştir. Ayrıca hiçbir doğal AMP'nin aynı anda L ve K açısından zengin olamadığı, P, W ve C açısından zengin peptidlerin ise aynı anda R açısından da zengin olabildiği belirtilmiş ve bu sonuçların, peptid tasarımlarına rehberlik edebileceği bildirilmiştir.

1.7. AMP Tasarımlarında Kullanılan Bilgisayara Destekli Yaklaşımlar

Günümüzde bilgisayar destekli metodolojilerle büyük veri kümelerinin analizi mümkün olmaktadır. Bilgisayar destekli tasarımlar, AMP sekanslarının kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri hakkında önemli bilgileri bir araya getirerek, sentezlenmeden önce aday bir sekansın antibakteriyel potansiyelinin tahminlenmesine imkanı sunmaktadır. (Hammami ve Fliss, 2010). AMP'leri keşfetmek, tasarlamak ve optimize etmek için çeşitli hesaplama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu hesaplama araçları arasında;

- makine öğrenim yöntemleri,
- de novo* tasarımı,
- dilibilimsel model,
- motif ekleme yöntemleri
- genetik algoritmalar

gibi AMP'lerin otomatik tasarımını mümkün kılan yaklaşımlar sayılabilmektedir.

AMP'lerin tahminlenmesinde çok sayıda bilgisayar destekli yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, bilinen AMP dizilerinin fizikokimyasal özelliklerini öğrenmek için genellikle makine öğrenimi algoritmalarından yararlanmaktadır (Yan vd., 2020). Şu anda, AMP'lerin biyolojik işlevini tahmin etmek için geliştirilen bilgisayar destekli yöntemlerin en önemli sorunlarından biri, verimli bir tasarım süreci için girdi olarak standartlaştırılmış ve güvenilir biyolojik verilere duyulan ihtiyaçtır. Bu nedenle de doğal AMP'lerin tanımlanması giderek daha önemli hale gelmektedir. Antimikrobiyal peptid veri tabanları sayesinde, makine öğrenimi algoritmalarının test edilmesi kolaylaşmaktadır. AMP'lerin deneysel olarak incelenmesi hem zaman alıcı hem de maliyetlidir, bu nedenle *in silico* tahmin modellerine ihtiyaç duyulmaktadır (Li ve Wang, 2016; Bhadra vd., 2018). Tablo 1.2.'de AMP'lerin antimikrobiyal aktivite, toksisite, stabilite, peptid-protein etkileşimi, ikincil yapı, toplanma eğilimi ve fizikokimyasal özellikleri bakımından tahminlenmesine izin veren biyoinformatik araçlar listelenmiştir.

De novo hesaplama yöntemleri, herhangi bir model dizi olmadan, yük, amfipatiklik ve yapı yönünden istenilen özellikleri sağlayabilen aminoasit frekans ve konum seçeneklerini kullanarak AMP dizilerinin üretilmesine dayanmaktadır (Porto vd., 2012). Dilbilimsel modelin aminoasit sekanslarını, bir dizi düzenli gramer kuralları bulunan bir dil olarak gördüğünü söyleyebiliriz. Loose vd. (2006), 20 aminoasit uzunluğunda yapay AMP'lerin rasyonel tasarımı için 684 “gramer” kuralının türetilmesine ve kombinasyonuna dayanan dilbilimsel bir model önermişlerdir. Bu “gramerler” aslında AMP “dilini” tanımlayan basit kurallardır. Örneğin, düzenli gramer olarak ifade edilen “QxEAGxLxKxxK” şablonu (“x” herhangi bir aminoasittir), sekropin olarak bilinen böcek AMP'lerinin % 90'ından fazlasında bulunmaktadır. Her bir “gramer” on aminoasitlik bir diziden oluşmaktadır. AMP'leri tanımlamak için gerekli olan bu düzenli gramerler, “Teiresias” desen keşif aracı kullanılarak bulunmuştur. Teiresias ile, Antimikrobiyal Peptid Veritabanındaki (APD) 12526 ökaryotik AMP sekansından, 684 düzenli gramer seti türetilmiş ve bu sayede 700 dilbilgisi tanımlanmıştır. Doğal olmayan AMP'leri tasarlamak için de, her biri 10 aminoasit uzunluğundaki iki gramer (veya yapı taşı) birleştirilerek, 20 aminoasit uzunluğunda gramer dizisi kombinasyonları elde etmişlerdir. Örneğin, [IVL]K[TEGDK]V[GA]K[AELNH][VA][GA]K gramerinde bulunan her köşeli parantezdeki aminoasitlerden birini seçme olasılığı dikkate alınarak 600 sekans türetilmiştir. Ardından doğal şablonlara benzemeyen bir peptid alt kümesi oluşturmak için, doğal AMP'ler ile birbirini takip eden altı veya daha fazla ortak aminoaside sahip diziler çıkarılmış ve geri kalan diziler benzerliklerine göre kümelendirilmiştir. Sonra da antimikrobiyal aktivitesini analiz etmek için 42 tanesi seçilmiştir. Bu yaklaşımın başarı oranını tahmin etmek zor olsa da, “gramer” yaklaşımı ile doğada bulunmayan AMP'leri tasarlamak mümkün olabilmektedir.

Tablo 1.2. AMP'lerin *in siliko* tahminlenmesinde kullanılan biyoinformatik araçlar

Biyoinformatik Araç	Tahmin	Link ve Referans
PepCalc	Birincil yapı tahminleri	https://pepcalc.com/ (Lear ve Cobb, 2016)
HeliQuest		https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py (Gautier vd., 2008)
Pep-FOLD3	2D ve 3D yapı tahminleri	https://bioserv.rpbs.univ-parisdiderot.fr/services/PEP-FOLD3/ (Shen vd., 2014)
SOPMA		https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html (Pradeep vd., 2012)
I-TASSER		https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/ (Zhang vd., 2008)
PSIPRED		http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/ (McGuffin vd., 2000)
CAMP _{R3}	Antimikrobiyal aktivite	http://www.camp3.bicnirrh.res.in/ (Waghu vd., 2016)
AntiBP2		http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/ (Lata vd., 2010)
AMPA		http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do (Torrent vd., 2012)
AmPEP		http://cbbio.cis.umac.mo/software/AmPEP/ (Bhadra vd., 2018)
ToxinPred	Toksisite	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php (Gupta vd., 2013)
HemoPI	Hemolitik aktivite	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hemopi/index.php (Chaudhary vd., 2016)
AGGRESKAN	Toplanma eğilimi	http://bioinf.uab.es/aggrescan/ (Conchillo-Solé vd., 2007)
TANGO		http://tango.crg.es/ (Linding vd., 2004)
ChemAGG		http://admet.scbdd.com/ChemAGG/index/ (Yang vd., 2019)
HDock	Doking tahmini	http://hdock.phys.hust.edu.cn/ (Yan vd., 2020)
HPEPDOCK		http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/ (Zhou vd., 2018)
ProtParam	Stabilite tahmini	https://web.expasy.org/protparam/ (Gasteiger vd., 2005)
Protein-Sol	Çözünürlük	https://protein-sol.manchester.ac.uk/ (Hebditch vd., 2017)

Antimikrobiyal peptidlerin tasarımında kullanılan bir başka hesaplama stratejisi de sekanslara eklenen otomatik aminoasit kalıplarıdır. Burada anlatılmaya çalışılan, birçok model diziden fonksiyonel veya yapısal bir motif tanımlandıktan sonra, bu motif hedef bir diziye eklenerek yeni biyolojik fonksiyonların üretilebileceğidir. Bu ilkelere dayanılarak ve yukarıda bahsedilen dilbilimsel modeller de dikkate alınarak, bir peptid

sekansına (AMP ya da değil) bir antimikrobiyal motif eklenmesinin yeni AMP'lerin üretilmesi ya da geliştirilmesine katkı sağlayacağı varsayılmıştır (Porto vd., 2018). Buna dayanarak, Joker adında yeni bir rasyonel tasarım algoritması geliştirilmiştir. Bu algoritma, antimikrobiyal modellerin kümülatif olmayan bir şekilde peptid dizisine sokulmasına dayanan kayar pencere (sliding window) sistemini kullanarak peptid dizisi üzerinde değişiklikler yapmaktadır (Porto vd., 2018). Joker'in başarısını test etmek için yapılan çalışmalarda araştırmacılar tasarladıkları 84 AMP'den 55'inin bakterilere karşı aktif olduğunu ve bunun da %65'lik bir doğruluk oranına karşılık geldiğini bulmuşlardır.

Bilgisayar destekli yöntemler genellikle basittir, ancak AMP'lerin etki mekanizmaları veya oldukça karmaşık bir yapıya sahip mikrobiyal membranlarla nasıl etkileşime girdiği ile ilgili çok az bilgi sağlar. Bu nedenle, son zamanlarda peptid-membran etkileşimlerini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için ek yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Mekanizma tabanlı yaklaşımlar içinde moleküler dinamik (MD) simülasyonları, AMP'ler ve bakteri zarları arasındaki etkileşimler hakkında atomik düzeyde bilgi sağlayan en güçlü yöntemlerden biridir. Simülasyonun zaman ölçeği yeterince uzunsa (spesifik AMP'ye ve membran tipine bağlı olarak yaklaşık 20 ila 100 ns arasında değişir), membran bozulması veya gözenek oluşumunun doğrudan gözlemlenmesi mümkün olabilmektedir (Wang vd., 2016). Bu yöntem, AMP'lerin temel etki tarzlarını aydınlatmak için kullanılmış ve yeni AMP'ler tasarlamak için kullanılmıştır. Peptidomimetikler, biyolojik aktivitelerini korumak ve stabilite, proteolize direnç ve biyoyararlanım gibi doğal peptidlere özgü sorunların üstesinden gelmek için doğal peptidleri konformasyon olasılıklarına yakın bir şekilde taklit etmek üzere üretilen moleküllerdir. MD simülasyonları, AMP'ler dışında gözenek oluşturuç mekanizmalarla hareket eden antimikrobiyal peptidomimetikler için de başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Vagner vd., 2008; Torres vd., 2019).

1.8. AMP'lerin Üretim Yöntemleri

1.8.1. Doğal Kaynaklardan Ekstraksiyon Yöntemi ile AMP Üretimi

AMP'lerin doğal kaynaklardan ekstraksiyonu geleneksel bir üretim yöntemi olup, zaman alıcı ve yüksek maliyetli bir süreçtir. Bu yöntem AMP'lerin çeşitli biyolojik kaynaklardan ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması üzerinedir. Ancak, AMP'lerin, çoğu organizma

tarafından düşük konsantrasyonlarda üretildiği düşünüldüğünde, yüksek verimli üretimler için birçok canlı türüne zarar verme riski bulunmaktadır (Rai vd., 2016; Barashkova vd., 2020; Cunha, 2021; Sultana vd., 2021). Örneğin; Li vd. (2008) denizkestanesi (*Strongylocentrotus droebachiensis*) kaynaklı Strongylocin'ni sadece karakterize etmek için 66 adet denizkestanesi kullanmışlardır. Daha yüksek miktarlarda üretim için 500 adet daha denizkestanesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu da doğal kaynaklardan ekstraksiyon yönteminin endüstriyel amaçlı üretim için her zaman uygun bir aday olmadığını göstermektedir (Li vd., 2008; Parachin vd., 2012).

1.8.2. Kimyasal Sentez Yöntemi ile AMP Üretimi

AMP'lerin kimyasal sentezle elde edilmesinde, katı faz peptid sentezi (solid-phase peptide synthesis, SPPS) yöntemi kullanılmaktadır. SPPS'in temel mantığı sentezlenmek istenen peptidin ilk aminoasidinin katı bir desteğe (resin veya boncuk) tutundurulup sabitlenmesi ve sonraki aminoasitlerin sırasıyla eklenerek hedef peptid zincirinin elde edilmesine dayanmaktadır. Kimyasal sentez sırasında fonksiyonel grupları koruyarak istenmeyen reaksiyonların gerçekleşmesini engellemek amacıyla, N α -koruma grupları (floren-9-metoksikarbonil (fmoc), tert-butoksikarbonil (Boc)) ve yan zincir koruma gruplarına (karboksil, amin, hidroksil vb.) ihtiyaç duyulmaktadır (Jensen, 2013; Münzker vd., 2017; Li ve Brimble, 2019). SPPS, peptidin karboksil ucundan (C-terminali) amino terminaline (N-terminali) doğru ilerlediğinden, N α -koruma grupları ve yan zincir korumalı gruplar da peptid zincirine C $\rightarrow$ N yönünde bağlanmaktadır. Sentez sırasında bağlanan her bir aminoasitten sonra N α -koruma grupları çıkartılır. Yan zincir koruyucu gruplarını etkilemeden gerçekleştirilen bu çıkarma işlemi sonrası, polipeptid zincirinin bir sonraki bağlanma döngüsü için hazır hale gelmesi sağlanır. İstenilen aminoasit dizisi elde edildikten sonra peptid katı destekten ayrılır. Bu sırada eş zamanlı olarak peptid zincirindeki yan zincir koruma grupları da uzaklaşır (Amblard vd., 2006; Jensen, 2013).

SPPS, peptid sentezinde sık tercih edilen bir yöntem olsa da, yüksek maliyeti ve uzun zincirli peptidlerin sentezindeki zorluklar nedeniyle endüstriyel ölçekli üretimleri için uygun bulunmamıştır. Kimyasal sentez sırasındaki her bir aminoasit için gerekli olan karmaşık adımlar, peptid zincirlerindeki hata oranını da arttırmaktadır. Ayrıca diziye dahil edilecek her bir ilave aminoasitle birlikte, sentez için gerekli olan toksik reaktiflerin kullanımı da artmaktadır (Wibowo vd., 2019).

1.8.3. Rekombinant DNA Teknolojisi ile AMP Üretimi

Rekombinant DNA teknolojisi, doğal kaynaklardan izolasyon ve kimyasal sentez ile karşılaştırıldığında, peptidlerin yüksek miktarda ve daha düşük maliyetle üretimini sağlamaktadır. Farklı özelliklere ve kökenlere sahip AMP'leri kodlayan genlerin, prokaryotik veya ökaryotik konaklarda ekspresyonu gerçekleştirilebilir. Son yıllarda bakteri, maya, memeli hücreleri, böcek hücre kültürleri (bakulovirüs) ve bitkiler gibi çeşitli ekspresyon sistemleri kullanılarak çok sayıda AMP üretilmiştir. Peptidlerin kimyasal sentezinin maliyeti tipik olarak 100-600 \$/g aralığındadır, bu durum AMP'lerin seri üretimlerini önemli derecede engellemektedir (Yeung vd., 2011). Yüksek üretim maliyeti sorununa en umut verici çözüm olarak rekombinant ekspresyon sistemlerinin kullanıldığı üretim teknikleri öne çıkmaktadır (Li, 2011). AMP'lerin maliyet etkin üretimi için çok sayıda biyolojik ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. *Escherichia coli* basit ve detaylı olarak açıklanmış bir ekspresyon sistemi olması nedeniyle en çok tercih edilen rekombinant biyoreaktör olarak kabul edilmektedir (Glazyrina vd., 2010). Ancak AMP'lerin bakterilerde yüksek miktarlarda ifade edilmesi, özellikle konak için toksik olan peptidlerin ekspresyon sistemine zarar vermesinden dolayı oldukça zor olmaktadır. Son zamanlarda, farklı organizmalara ait proteinlerin büyük ölçekli ifadesi için mükemmel bir konakçı olan metilotrofik maya *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)'i öne çıkarmıştır (Cereghino vd., 2002).

1.8.3.1. Prokaryotik Ekspresyon Sistemlerinde AMP'lerin Üretimi

AMP'lerin rekombinant yöntemle üretiminde en yaygın kullanılan prokaryotik mikroorganizma *Escherichia coli* (*E.coli*) olmuştur. Protein Veri Bankasına (PDB) göre, heterolog peptid veya proteinlerin yaklaşık %99'u bir *E. coli* ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmektedir. Bunun en önemli nedeni, *E. coli*'nin genomik yapısının ve DNA manipülasyon protokollerinin iyi bilinmesidir. Ayrıca, düşük üretim maliyeti ve çok hızlı çoğalma özelliği sayesinde, *E. coli*'de rekombinant peptidlerin üretimi nispeten kolaydır. AMP'lerin prokaryotik ekspresyon sistemlerinde üretimlerinde karşılaşılan en büyük zorluk, konak bakterilere karşı toksik etkiye bulunmaları ve proteolitik bozunmaya karşı duyarlı olmalarıdır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için en sık tercih edilen strateji, AMP'leri, bir füzyon proteini ile birleştirmektir. Ayrıca, prokaryotlarda translasyon sonrası modifikasyonlar gerçekleşmediği düşünülecek olursa,

ekspresyonunda post-translasyonel modifikasyonlara (disülfid bağları gibi) ihtiyaç duyan bir AMP, prokaryotik konaklarda üretim için uygun bulunmamaktadır (Ingham ve Moore, 2007; Li, 2011; Puertas vd., 2011; Yi vd., 2015).

1.8.3.2. Bitki Ekspresyon Sistemlerinde AMP'lerin Üretimi

Bitkilerdeki bakteriyel ve fungal kaynaklı hastalıklar, tarımsal ürünlerin verimini ve kalitesini düşürerek ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu ekonomik kayıplar bir takım tarım ilaçlarıyla önlenmeye çalışılsa da, ilaçların çevreye ve insana verdiği zarar daha büyük kayıplara neden olmaktadır (Holaskova ve ark., 2015). Bu sorunların üstesinden gelme çabası AMP'lerin bitkilerde heterolog ekspresyonunun önünü açmıştır (Holaskova vd., 2015; Islam vd., 2021). Örnek olarak kanola bitkisinde bezelyeye ait olan defensin DRR206 peptidinin ekspresyonu sağlanarak kanola bitkisinin *Leptosphaeria maculans* mantarına karşı direnci arttırılmıştır (Wang vd., 1999).

Bitki ekspresyon sistemleri, yeni terapötik AMP'lerin üretiminde alternatif bir yol olarak görülmektedir. Örneğin, hem bitki hem de insan patojenlerine karşı etkili olan *de novo* tasarlanmış SP1-1 peptidi, tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkisinde; balıklarda viral enfeksiyonlara karşı etkili olan interferon- α 1 peptidi ise patates (*Solanum tuberosum*) ve pirinçte (*Oryza sativa*) ifade edilmiştir (Fukuzawa vd., 2010; Zeitler vd., 2013). AMP'ler bitkinin yaprak, tohum, kök gibi çeşitli bölgelerinde ifade edilebilir. Bu güne kadar bitki biyoreaktörleri sayesinde, farmakoloji ve gıda gibi alanlarda uygulama potansiyeli olan birçok AMP'nin, düşük maliyetli ve büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilmiştir (Leite vd., 2018).

1.8.3.3. Maya Ekspresyon Sistemlerinde AMP Üretimi

Mayalar, rekombinant proteinlerin ekspresyonunda kullanılan bir diğer önemli konaklardır. Bu ekspresyon sistemler genel olarak, düşük maliyetli olmaları, genetik manipülasyonlara izin vermeleri, besiyerlerinde hızlı ve yoğun gelişim göstermeleri, genetik olarak çok iyi karakterize edilmiş olmaları, istenilen post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmeleri ve fermentasyon ortamına kolay adapte olabilmeleri gibi avantajları nedeniyle çok fazla tercih edilmektedir (Gellison vd., 1992). Maya ekspresyon sistemleri, metilotrof ve metilotrof olmayan sistemler olarak iki gruba

ayrılmaktadır. Bunlar arasında *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'in en fazla kullanılan maya ekspresyon sistemleri bulunmakla birlikte rekombinant protein üretiminde metilotrofik mayaların daha fazla avantaja sahip olduğu görülmektedir. Bugüne kadar *S. cerevisiae*, çok sayıda heterolog proteinin başarılı bir şekilde üretimine izin vermiş olsa da protein hiperglikosilasyonu ve düşük protein verimi gibi bazı sorunlara neden olduğundan, alternatif maya ekspresyon sistemlerini ihtiyaç duyulmuştur (Gellissen ve Hollenberg 1997; Cregg vd., 1987; Gellissen vd., 1992).

P. pastoris mikrobiyal protein üretimi için en yaygın kullanılan ve üzerinde en çok çalışma yapılan mikroorganizma olarak dikkat çekmektedir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminin güçlü ve yüksek verimli promotörlerden biri olan alkol oksidaz 1 (AOXI) promotörüne sahip olması, insanlara karşı bilenen bir patojenitesinin olmaması, glikolizasyon, metilasyon gibi çeşitli post transyonal modifikasyonlara uygun olması ve ortamdan kolayca saflaştırılabilecek endojen proteinler üretme kabiliyetine sahip olması bu ekspresyon sistemini diğerlerine oranla daha çok tercih edilmesinin temel nedenleridir (Báez vd., 2005; Balamurugan vd., 2007; Duan vd., 2011).

P. pastoris enerji ve karbon kaynağı olarak metanol kullanan metilotropik bir maya olup, metilottrof olmayan *S. cerevisiae* ile kıyaslandığında oldukça avantajlıdır. *P. pastoris*, fermentatif mayalara kıyasla daha fazla yoğunlukta hücre kültürü üretebilmektedir (Gellissen ve Hollenberg, 1997). *P. pastoris*, endojen proteinleri az miktarda salgıladığından kültür ortamında üretilen proteinin büyük çoğunluğunu, AOX1 promotörünün kontrolü altında ifade edilen heterolog proteinler oluşturmaktadır (Liu vd., 1995; Brierley, 1998). Fermentatif organizmalarda, fermentasyon süresince üretilen etanol ve asetik asit türevi yan ürünler zamanla toksik seviyeye ulaşırken, *P. pastoris*'te ise böyle bir olumsuzluk görülmemektedir (Cereghino vd., 2002). Ayrıca, *P. pastoris* yüksek seviyedeki metanol konsantrasyonunda gelişebildiğinden, kültür ortamındaki diğer mikroorganizmaların elimine edilmesi mümkün olmaktadır (Buckholz ve Geelson, 1991; Gellison vd., 1992; Romanos vd., 1992).

P. pastoris, düşük maliyetli olması, hızlı ekspresyon yeteneği, genetik düzeyde kolaylıkla manipüle edilebilir olması, heterolog proteinleri hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek miktarlarda üretebilmesi ve glikozilasyon, disülfid bağı oluşumu, proteinlerin doğru şekilde katlanması gibi ökaryotik post-translasyonel modifikasyonları

gerçekleştirebilmesi nedeniyle oldukça popüler ekspresyon sistemi haline gelmiştir (Cereghino ve Cregg, 2000; Cregg vd., 2000). Ayrıca *P. pastoris* ekspresyon sisteminin GRAS (Generally Recognized As Safe, genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde olması ve ticari olarak bir kit şeklinde temin edilebilmesi de diğer önemli avantajlarıdır (Kjeldsen vd., 1999; Cregg vd., 2000). Bugüne kadar *P. pastoris* ekspresyon sistemi çok sayıda AMP'nin üretiminde kullanılmıştır. Tablo 1.3'de bunlardan bazılarına örnek verilmiştir. (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ifade edilen bazı AMP'ler

AMP	Orijin	Kaynak	Referans
Plectasin	Mikroorganizma	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Zhang vd., 2011
Enterosin L50 (EntL50A)		<i>Enterococcus faecium</i> L50	Basanta vd., 2010
Enterosin L50 (EntL50B)			
Defensin (Pdc1)	Bitki	<i>Zea mays</i> (Mısır)	Kant vd., 2009
Snakin-1		<i>Solanum tuberosum</i> (Patates)	Kuddus vd., 2016
PaDef (SN-1)		Meksika avokadosu	Meng vd., 2017
Hispidalin		<i>Benincasa hispida</i> (Kış kavunu)	Meng vd., 2019
Ac-AMP2		<i>Amaranthus caudatus</i> (Horoz ıbiğiçiçeği)	Huang vd., 2021
β -Defensin (msBD-1)		<i>Ovis</i> (Koyun)	Zhao ve Cao, 2012
ABP-dHC-cecropin	Hayvan	<i>Hyphantria Cunea</i> (Dut güvesi)	Sang vd., 2017
VpDef		<i>Venerupis philippinarum</i> (Japon midyesi)	Meng vd., 2018
NK-lysin		<i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)	Wang vd., 2018
Tachyplesin I		<i>Tachyplesus tridentatus</i> (Japon at nalı yengeci)	Li vd., 2019
MnALF4		<i>Macrobrachium nipponense</i> (Tatlı su karidesi)	Tang vd., 2020
Melittin		<i>Apis mellifera</i> (Avrupa arısı)	Moridi vd., 2020
Fowlicidin-2		Tavuk	Xing vd., 2016
Trombocidin-1	İnsan	<i>Homo sapiens</i> (insan)	Yazdi vd., 2019
Hepcidin			Rashid vd., 2009
β -Defensin 2 (hPAB- β)			Chen vd., 2011
MP1102	Tasarım	NZ2114 peptidi baz alınarak tasarlanmıştır..	Mao vd., 2015
PAF102		PAF26 peptidi baz alınarak tasarlanmıştır.	Popa vd., 2019
LL-37Ta1		LL-37 ve Ta1 peptidi baz alınarak tasarlanmıştır.	Ahmed vd., 2019
EF-1		PlnE ve PlnF peptidi baz alınarak tasarlanmıştır.	Liv vd., 2020
LfcinBD		LfcinB peptidi baz alınarak tasarlanmıştır	Wang vd., 2021

1.9. AMP'lerin Gıda Sanayinde Kullanımı

Kimyasal koruyuculara karşı ilginin azalması ile birlikte doğal koruyuculara olan talep artmıştır. Bu durum doğal kaynaklardan elde edilen ve gıdalarda bulunan bakteri ve mantarlar üzerinde önleyici etkisi olan AMP'lerin, potansiyel gıda koruyucu olarak giderek daha fazla ilgi görmesine neden olmuştur. Ayrıca, AMP'lerin asitlere, alkalilere ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olmaları nedeniyle güvenli, raf ömrü uzun ve az işlem görmüş gıda taleplerini karşılamada da iyi bir alternatif olarak görülmektedirler (Huan vd., 2020).

Bakteriyosinler çeşitli bakterilerce sentezlenen, gıda kaynaklı patojen veya bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişmesini önleyen protein yapısında doğal antimikrobiyal maddelerdir. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan nisin, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından “genel olarak güvenli (GRAS)” olarak kategorize edilmiş olup birçok ülkede gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Khan ve Oh, 2016). Bununla birlikte, bugüne kadar yalnızca nisin ve polilisin gıda katkı maddeleri olarak FDA tarafından onaylanmıştır (Santos vd., 2018). Bunların dışında *Pediococcus acidilactici*'nin ürettiği bir bakteriyosin olan Pedocin PA-1 de gıda koruyucu olarak kullanılmakta ve piyasada ALTA 2431 ticari adıyla satılmaktadır. Bazı ülkelerde Pedocin PA-1, koruyucu gıda katkı maddesi olarak etin bozulmasına neden olabilen *L. monocytogenes* gelişmesini engellemek için kullanılmaktadır (Settanni ve Corsetti, 2008). Yine *Enterococcus faecalis* kaynaklı Enterocin AS-48 meyve ve sebze sularını, *Enterococcus faecium* kaynaklı enterosin CCM4231 ise soya sütünde koruyucu olarak kullanılmaktadır (Rai vd., 2016; Santos vd., 2018; da Silva Malheiros vd., 2010). Diğer taraftan AMP'lerin gıdalarda direkt kullanımının yanında, aktif paketlemede kullanımlarına yönelik çalışmalar da gıda endüstrisinde büyük bir potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Örneğin, nişasta biyofilmleriyle birlikte kullanılan ϵ -poli-L-lizin'nin *Aspergillus parasiticus* (aflatoksin üreticisi) üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Luz vd, 2018).

Sonuç olarak gittikçe artan antibiyotik direnci ve doğal kaynaklı antimikrobiyal maddelere doğru yönelim, alternatif antimikrobiyal bileşiklerin keşfine ve üretimine duyulan ihtiyacı artırmıştır. Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında yüksek aktivite ve stabiliteye sahip peptidlerin *de novo* tasarımı için bir yöntem geliştirilmiş ve bu yöntemle

tasarlanan peptidlerin rekombinant yöntemlerle üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler DBAASP veritabanından seçilerek bu peptidlerdeki korunmuş motifler tespit edilmiş ve bu motiflerin farklı kombinasyonlarından oluşan özgün AMP dizileri oluşturulmuştur. Daha sonra bu dizilerden bir seçim stratejisi uygulanarak belirlenen kriterlere uygun 2 peptid (L12-22 ve L12-49) rekombinant yöntemle üretilmek üzere seçilmiştir. Seçilen bu peptidleri kodlayan DNA dizileri pPICZαA vektörüne bağlanarak *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmış ve ardından *P. pastoris* konak hücrelerinde ekspresyonu sağlanmıştır. Böylece doğal AMP'lere alternatif olarak tasarlanan yüksek aktivite ve nispeten düşük toksiditeye sahip sentetik AMP'lerin düşük maliyetli ve standart aktivitede üretimini sağlayacak yeni bir yöntem ortaya koyulmuştur.

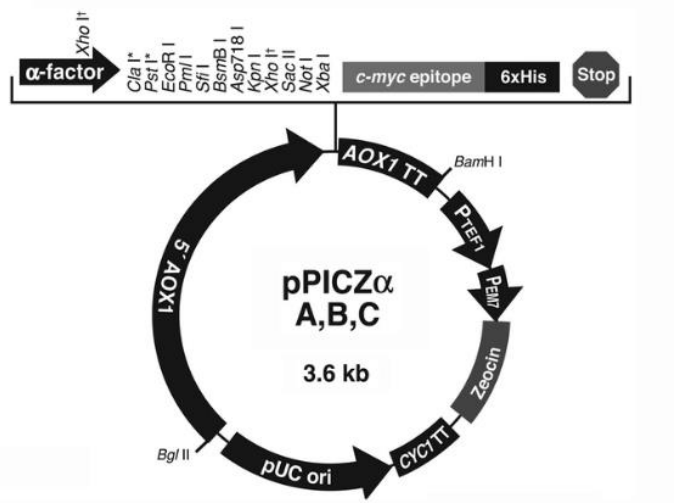
2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

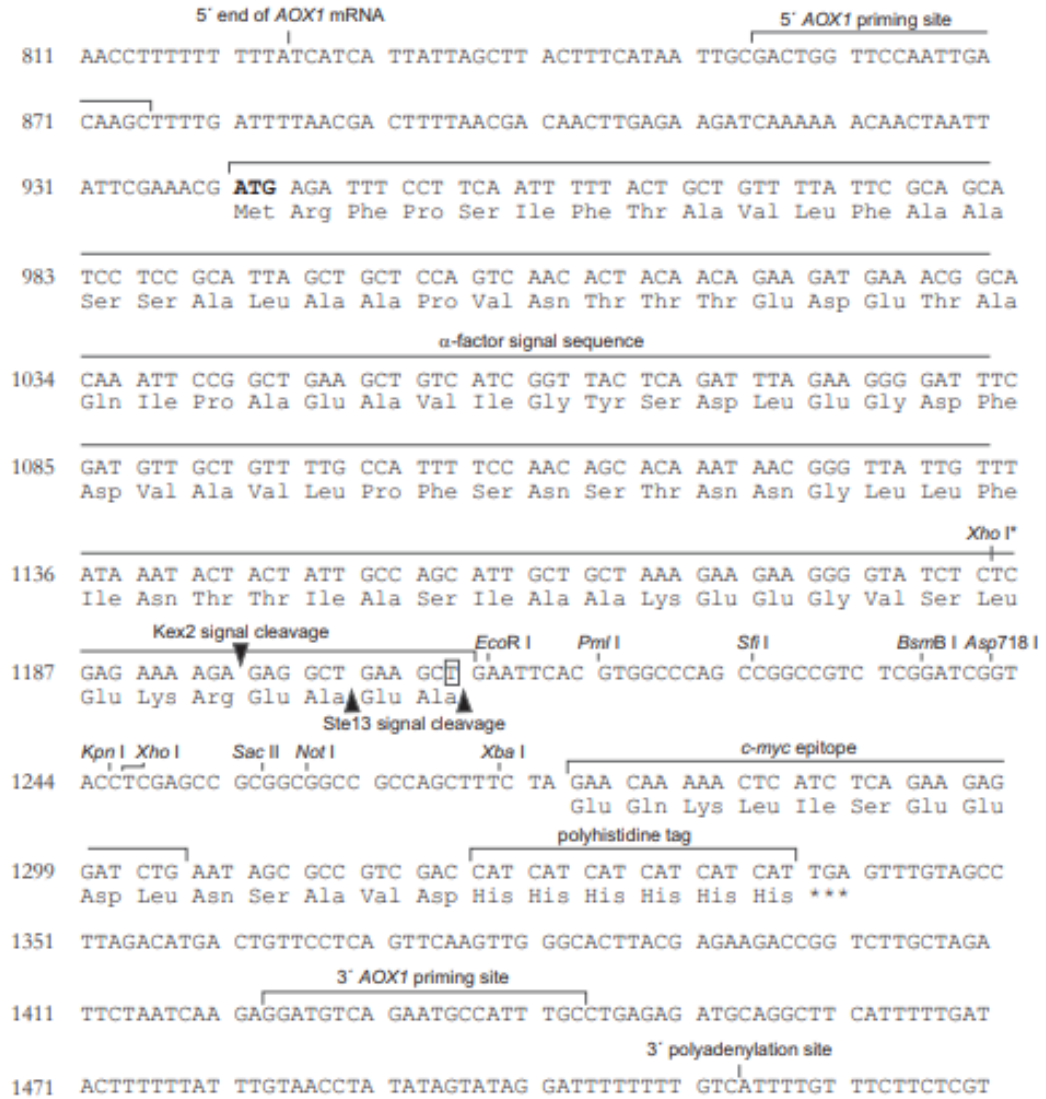
2.1.1. Mikroorganizma Suşları ve Vektör

Tez çalışması kapsamında tasarlanan L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA dizilerinin klonlanmasında *E. coli* DH5 α suşu (MAX Efficiency® Invitrogen, ABD), ekspresyonunda ise *P. pastoris* GS115 (ThermoFisher, C18100, ABD) suşu kullanılmıştır. Klonlama ve ekspresyon vektörü olarak, AOX1 promotorüne, α -sekresyon sinyal faktörüne, zeosin direnç genine sahip pPICZ α A vektörü (ThermoFisher, V19020, ABD) tercih edilmiştir (Şekil 2.1) (Li vd., 2007). pPICZ α A vektörüne ait çoklu klonlama bölgesinin nükleotid dizisi Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. pPICZ α A vektörü

(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)



Şekil 2.2. pPICZa A vektörü çoklu klonlama bölgesi nükleotid dizisi

(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)

2.1.2. Kültür Ortamları

Tez çalışmasında L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA dizilerinin klonlanmasında kullanılan *E. coli* DH5 α hücreleri, LB (Luria-Bertani) (Neogen-7279A, ABD) sıvı besiyerinde geliştirilmiş ve pozitif *E. coli* DH5 α klonlarını seçebilmek için LB agara 50 μ g/ml zeosin (ThermoFisher, R25001, ABD) ilave edilmiştir. *P. pastoris* hücrelerinin çoğaltılması amacıyla maya ekstraktı pepton dekstroz (YPD) (VWR, J903, ABD) besiyeri kullanılırken, transforme edilmiş *P. pastoris* hücrelerinin geliştirilmesinde

100-1000 µg/ml zeosin içeren sorbitollü maya ekstraktı pepton dekstroz (YPDS) agar kullanılmıştır.

Rekombinant peptidlerin çalkalamalı kültür ortamında ekspresyonunu gerçekleştirmek için birinci kültür aşamasında tamponlanmış karmaşık gliserol kültür ortamı (buffered glycerol complex medium, BMGY), ikinci aşama olan ekspresyon aşamasında ise tamponlanmış karmaşık metanol kültür ortamı (buffered methanol complex medium, BMMY) kullanılmıştır. Besiyerlerinin içeriklerine dair detaylı bilgiye EK-1’de yer verilmiştir.

2.1.3. Enzimler

Tez çalışmasında, PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla, Taq DNA polimeraz (TransGen Biotech AP401-01, Çin) enzimi, DNA dizilerinin pPICZαA vektörüne ligasyonu için de T4 DNA ligaz (TransGen Biotech FL101-01, Çin) enzimi kullanılmıştır. Ayrıca, hedef peptidleri kodlayan DNA dizilerinde ve pPICZαA vektöründe, yapışkan uçların oluşturulması amacıyla *EcoRI* ve *NotI* enzimleri kullanılmış olup, rekombinant vektörlerin linerizasyonu amacıyla da *SacI* enzimi (TransGenbio, Çin) tercih edilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin tanıma sekansları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tanıma sekansları

Enzim	Tanıma dizisi ve kesim noktaları
<i>EcoRI</i>	5'-G▼AATT C-3'
<i>NotI</i>	5'-GC▼GGCC GC-3'
<i>SacI</i>	5'-GAGCT▼C-3'

2.1.4. Oligonükleotidler

Tez çalışmasındaki oligonükleotidlerin sentezi, Sentebiolab Biyoteknolojik Ürünler Ltd. Şti. (Ankara) tarafından yapılmıştır. Oligonükleotidlerin 1xTE buffer (10mM Tris: 0.1mM EDTA; pH 8.0) kullanılarak 100 µM konsantrasyonda hazırlanan stok solüsyonları -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.1.5. Tampon ve Stok Çözeltiler

Tez çalışması kapsamındaki tamponlar ve stok solüsyonlarının hazırlanışı ile ilgili detaylı bilgiler EK 2’de verilmiştir.

2.1.6. Sekans Analizi

Dizileme hizmeti Medsantek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. (İstanbul) tarafından yapılmıştır.

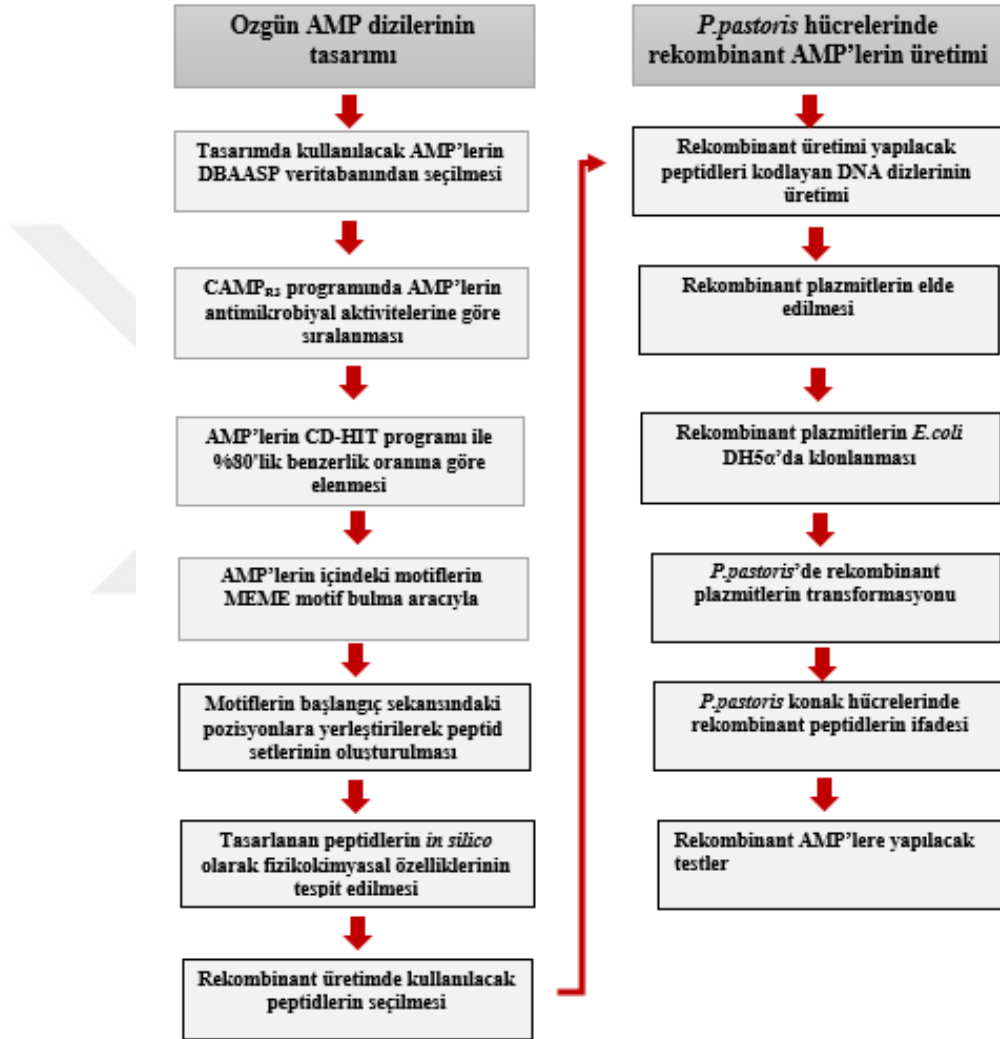
2.1.7. Etik Kurul Onayı

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından tez çalışması kapsamında kullanılmak üzere alınan 01/06/ 2022 tarihli ve 22/110 numaralı Etik Kurul Onay Belgesi Ek 3’de verilmiştir.

2.2. YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptid üretimine yönelik olarak *de novo* peptidler tasarlanmış ve bu tasarlanan peptidlerden iki tanesinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *P. pastoris* konak hücrelerinde üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler ($MİK \leq 100 \mu g/ml$) DBAASP (<https://dbaasp.org/home>) veritabanından belirli seçim kriterleri gözetilerek seçilmiştir. Seçilen peptidler CAMP_{R3} (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) programı kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerine göre skorlanmıştır. Ardından antimikrobiyal aktivitesi yüksek (≥ 0.5) peptidler, benzerlik oranına (%80) göre CD-HIT (<http://cd-hit.org>) programı kullanılarak elenmiş ve bu şekilde tasarlanacak peptidlerin özgünlüğü arttırılmaya çalışılmıştır. Daha sonra geriye kalan peptidlerdeki tekrarlanan (recurring) motifler, MEME Suite 5.5.0 (<https://meme-suite.org/meme/>) motif bulma aracı kullanılarak belirlenmiş ve bu motiflerden en yüksek skora sahip olanlar seçilmiştir. Daha sonra *de novo* peptidlerin tasarımında kullanılmak üzere motiflerden (M) ve joker (X) aminoasidinden oluşan bir başlangıç sekansı oluşturulmuştur. Bu başlangıç sekansı kullanılarak yüksek skorlu motiflerin farklı kombinasyonlarından oluşan özgün peptid dizileri elde edilmiştir. Ardından peptidlerin performansı *in silico* olarak test edilerek en yüksek skora sahip peptidler belirlenmiştir. Son olarak, tasarlanan bu peptidleri kodlayan

DNA dizileri pICZ α A vektörüne bağlanarak *E. coli* DH5 α hücrelerinde klonlanmış ve ardından *P. pastoris* konak hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Özgün peptid dizilerinin tasarım ve üretim aşamaları Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek çalışmaların akış planı

2.2.1. Tez Çalışmasında Üretilen Peptidlerin Biyoinformatik Analizi

Tez çalışması kapsamında tasarlanan peptid dizilerinin moleküler ağırlığı, net yükü, izoelektrik noktası ve suda çözünürlüğü Peptide property calculator (<https://pepcalc.com/>) programı, hidrofobikliği PEPTIDE 2.0 (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php) programı, hidrofobik momenti HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Peptidlerin hidropatiklik indeksi Expasy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) programı ile kararsızlık indeksi, GRAVY değerleri ve boman indeksi ise Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) programı ile belirlenmiştir. Peptidlerin antimikrobiyal aktiviteleri CAMP_{R3} (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) programı, hemolitik potansiyeli HemoPI (<http://crdd.osdd.net/raghava/hemopi/design.php>) programı ile toksisitesi ise ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php>) programı ile tahminlenmiştir. Peptidlerin *de novo* yapı tahmininde Pep-FOLD3 (<https://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>) programı, İkincil yapının tahmininde PSIPRED 4.0 (<https://bio.tools/psipred>) ve SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsasop_ma.html) programı kullanılmıştır. Peptidlerin üç boyutlu yapılarının tahminlenmesinde PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) web aracı, transmembran bölgelerinin tahminlenmesinde TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) web sunucusu ve ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) aracı kullanılmıştır.

Ayrıca peptidlerinin bakteriyel membranla etkileşimini tahminlemek için HDock programı (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hdock/>) kullanılmış ve reseptör protein olarak (PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1BY3/pdb>) elde edilen *Escherichia coli*'ye ait FhuA (pdb kodu:1BY3) membran proteini ile tasarlanan peptidlerin etkileşimi tahminlenmiştir.

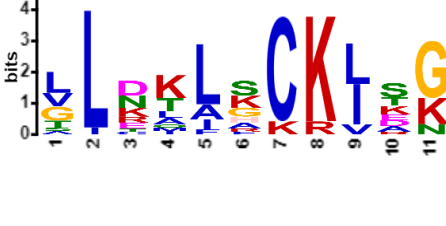
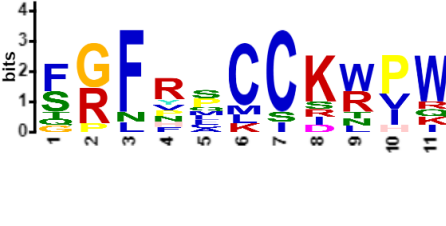
2.2.2. Peptid Dizilerinin Tasarımı

Bu tez çalışmasında yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidlerin tasarımı için en kapsamlı AMP veritabanlarından biri olan DBAASP veritabanından (<https://dbaasp.org/>) seçilen peptidlerdeki korunmuş peptid fragmentlerinin (motiflerin) tespit edilmesi ve daha sonra bunların kombine edilerek yeni peptid dizilerinin oluşturulmasına dayanan bir tasarım stratejisi izlenmiştir. Bu amaçla; özgün AMP'lerin tasarımında kullanılmak üzere yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler ($MİK \leq 100 \mu g/ml$), DBAASP veritabanı taranarak belirlenmiştir. Peptidler, hedef mikroorganizma grubu (Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler), peptid uzunluğu (<50 amino asit), peptid kompleksliği (monomer) ve sentez tipi (ribozomal) gibi veritabanı filtreleme stratejileri kullanılarak elde edilmiştir. Ardından peptidler CAMP_{R3} (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/>) programı kullanılarak antimikrobiyal etkinliklerine göre skorlanmış ve antimikrobiyal aktivite skoru ≥ 0.5 olan peptidler seçilmiştir. Daha sonra motiflerin özgünlüğünü arttırmak için benzerlik oranı %80'in üzerinde olan peptidler, CD-HIT programı (<http://cd-hit.org>) kullanılarak çıkartılmış ve geriye kalan peptidler, korunmuş motiflerin elde edilmesinde kullanılmıştır. Tasarım için gerekli olan motiflerin elde edilmesinde kullanılan peptidlerin listesi EK 4.'de verilmiştir.

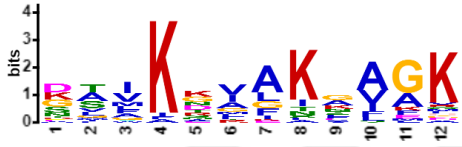
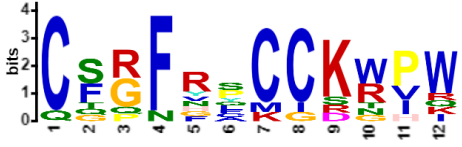
2.2.2.1. Peptid Verisetindeki Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi

Motif seçiminde kullanılmak üzere oluşturulan peptid verisetindeki korunmuş motiflerin belirlenmesinde, MEME Suite 5.5.0 (<https://meme-suite.org/meme/>) motif bulma aracı kullanılmıştır. MEME motif keşif aracında, motif seçim kriteri olarak en az 10 antimikrobiyal peptid ile eşleşme gösteren (minimum size:10) 11, 12 ve 13 aminoasit uzunluğundaki her bir motif sınıfından en düşük değerine sahip (istatistiksel olarak en önemli) 5'er adet motif seçilmiştir (Tablo 2.2, Tablo 2.3 ve Tablo 2.4).

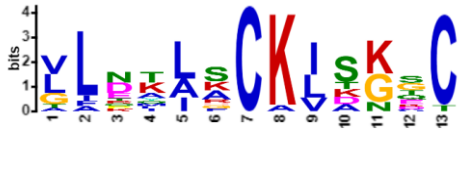
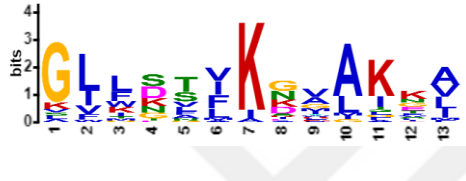
Tablo 2.2. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 11 aminoasit uzunluğundaki motifler

Logo	Önerilen Motif	E-değeri	Motif Benzerlik Matrisi				
			1.	2.	3.	4.	5.
	M1 LLDKLSC KISG	4.9e-015	--	0.41	0.17	0.2	0.45
	M2 GLLDTIK NVAK	1.9e-008	0.41	--	0.15	0.21	0.4
	M3 CPSGERY SGYC	1.3e-009	0.17	0.15	--	0.18	0.21
	M4 FGFRSCC KWPW	2.3e+000	0.2	0.21	0.18	--	0.22
	M5 IASVGND IYNF	5.1e+010	0.45	0.4	0.21	0.22	--

Tablo 2.3. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 12 aminoasit uzunluğundaki motifler

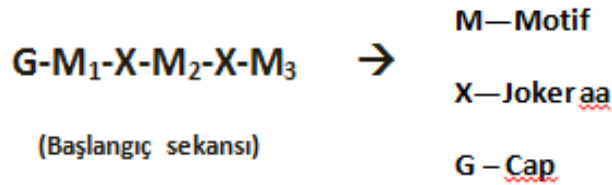
Logo	Önerilen Motif	E-değeri	Motif Benzerlik Matrisi				
			1.	2.	3.	4.	5.
	M6 SLLNKLS CKLSG	1.6e-015	--	0.45	0.25	0.3	0.26
	M7 DAIKKVA KAAGK	6.2e-013	0.45	--	0.13	0.21	0.17
	M8 CSFRFSC CKWPW	4.8e-008	0.25	0.13	--	0.19	0.2
	M9 ACLRGEC HFGRC	4.5e-006	0.3	0.21	0.19	--	0.4
	M10 HCRARGR LGGYC	7.2e+005	0.26	0.17	0.2	0.4	--

Tablo 2.4. MEME algoritması kullanılarak elde edilen 13 aminoasit uzunluğundaki motifler

Logo	Önerilen Motif	E-değeri	Motif Benzerlik Matrisi				
			1.	2.	3.	4.	5.
	M11 VLDKLSC KISKSC	2.1e-018	--	0.35	0.2	0.38	0.3
	M12 GLLDTVK GVAKKA	5.3e-015	0.35	--	0.15	0.5	0.21
	M13 GRCRSGE RYSGYC	1.3e-012	0.2	0.15	--	0.17	0.27
	M14 KVGKAIG KALPAI	4.7e+010	0.38	0.5	0.17	--	0.21
	M15 KASCARR SGYCAF	1.7e+008	0.3	0.21	0.27	0.21	--

2.2.2.2. *De novo* Peptid Dizilerinin Tasarımında Kullanılacak Başlangıç Sekansının Oluşturulması

Peptid dizilerinin *de novo* tasarımı için kullanılmak üzere bir başlangıç sekansı (şablon) oluşturulmuştur. Literatürdeki benzer çalışmalardan farklı olarak, başlangıç şablonu doğal peptid sekansları yerine, motifler ve bir joker aminoasit (X) kullanılarak oluşturulmuştur. MEME motif keşif aracı kullanılarak belirlenen 11, 12 ve 13 aa uzunluğundaki motiflerlerden 3 farklı motif sınıfı oluşturulmuş ve bu motifler (M), GM1(X)M2(X)M3 başlangıç sekansındaki M pozisyonlarına sırasıyla yerleştirilerek tüm motiflerin 3'lü kombinasyonlarını içeren peptid dizileri elde edilmiştir (Tablo 2.5). Ayrıca başlangıç sekansının N terminalinde aminopeptidazlara direnç kazandırılması amacıyla bir cap yani kapatma aminoasidi olarak G (Glisin) kullanılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Başlangıç şablonu

AMP veritabanlarında bulunan peptidlerin aminoasit kompozisyonu incelendiğinde bazı aminoasitlerinin daha fazla tekrar ettiği gözlenmektedir (Khara vd., 2017). Örneğin, toplam 2619 AMP sekansına sahip bir AMP veritabanı olan APD incelendiğinde, AMP'lerde en çok G, K ve L aminoasitlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca AMP'lerin *de novo* tasarımı R ve K, fizyolojik koşullar altında protonlandıkları ve güçlü antimikrobiyal aktiviteler gösterdikleri için bazik aminoasitler arasında oldukça popülerdir. Ayrıca peptidlerin hem hidrofobik hem de polar yüz derinliklerini G, L, I gibi uzun alifatik yan zincirlerine sahip aminoasitlerin artırdığı bildirilmiştir (Khara vd., 2017). Bu nedenle bu tez çalışmasında "X" yani joker aminoasit olarak K, L, I, R aminoasitleri kullanılmıştır. Bu sayede başlangıç şablonuna yerleştirilen 11 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 36, 12 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 39, 13 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 42 aminoasit uzunluğundaki özgün diziler elde edilmiştir (EK 5).

Tablo 2.5. Motiflerin başlangıç şablonuna yerleşim pozisyonlarına göre oluşturulan peptid kombinasyonları

Peptid kodu	11 aa'lik set	Peptid kodu	12 aa'lik set	Peptid kodu	13 aa'lik set
X11-1	GM1XM2XM3	X12-1	GM6XM7XM8	X13-1	GM11XM12XM13
X11-2	GM1XM2XM4	X12-2	GM6XM7XM9	X13-2	GM11XM12XM14
X11-3	GM1XM2XM5	X12-3	GM6XM7XM10	X13-3	GM11XM12XM15
X11-4	GM1XM3XM2	X12-4	GM6XM8XM7	X13-4	GM11XM13XM12
X11-5	GM1XM3XM4	X12-5	GM6XM8XM9	X13-5	GM11XM13XM14
X11-6	GM1XM3XM5	X12-6	GM6XM8XM10	X13-6	GM11XM13XM15
X11-7	GM1XM4XM2	X12-7	GM6XM9XM7	X13-7	GM11XM14XM12
X11-8	GM1XM4XM3	X12-8	GM6XM9XM8	X13-8	GM11XM14XM13
X11-9	GM1XM4XM5	X12-9	GM6XM9XM8	X13-9	GM11XM14XM15
X11-10	GM1XM5XM2	X12-10	GM6XM10XM7	X13-10	GM11XM15XM12
X11-11	GM1XM5XM3	X12-11	GM6XM10XM8	X13-11	GM11XM15XM13
X11-12	GM1XM5XM4	X12-12	GM6XM10XM9	X13-12	GM11XM15XM14
X11-13	GM2XM1XM3	X12-13	GM7XM6XM8	X13-13	GM12XM11XM13
X11-14	GM2XM1XM4	X12-14	GM7XM6XM9	X13-14	GM12XM11XM14
X11-15	GM2XM1XM5	X12-15	GM7XM6XM10	X13-15	GM12XM11XM15
X11-16	GM2XM3XM1	X12-16	GM7XM8XM6	X13-16	GM12XM13XM11
X11-17	GM2XM3XM4	X12-17	GM7XM8XM9	X13-17	GM12XM13XM14
X11-18	GM2XM3XM5	X12-18	GM7XM8XM10	X13-18	GM12XM13XM15
X11-19	GM2XM4XM1	X12-19	GM7XM9XM6	X13-19	GM12XM14XM11
X11-20	GM2XM4XM3	X12-20	GM7XM9XM8	X13-20	GM12XM14XM13
X11-21	GM2XM4XM5	X12-21	GM7XM9XM10	X13-21	GM12XM14XM15
X11-22	GM2XM5XM1	X12-22	GM7XM10XM6	X13-22	GM12XM15XM11
X11-23	GM2XM5XM3	X12-23	GM7XM10XM8	X13-23	GM12XM15XM13
X11-24	GM2XM5XM4	X12-24	GM7XM10XM9	X13-24	GM12XM15XM14
X11-25	GM3XM1XM2	X12-25	GM8XM6XM7	X13-25	GM13XM11XM12
X11-26	GM3XM1XM4	X12-26	GM8XM6XM9	X13-26	GM13XM11XM14
X11-27	GM3XM1XM5	X12-27	GM8XM6XM10	X13-27	GM13XM11XM15
X11-28	GM3XM2XM1	X12-28	GM8XM7XM6	X13-28	GM13XM12XM11
X11-29	GM3XM2XM4	X12-29	GM8XM7XM9	X13-29	GM13XM12XM14
X11-30	GM3XM2XM5	X12-30	GM8XM7XM10	X13-30	GM13XM12XM15
X11-31	GM3XM4XM1	X12-31	GM8XM9XM6	X13-31	GM13XM14XM11
X11-32	GM3XM4XM2	X12-32	GM8XM9XM7	X13-32	GM13XM14XM12
X11-33	GM3XM4XM5	X12-33	GM8XM9XM10	X13-33	GM13XM14XM15
X11-34	GM3XM5XM1	X12-34	GM8XM10XM6	X13-34	GM13XM15XM11
X11-35	GM3XM5XM2	X12-35	GM8XM10XM7	X13-35	GM13XM15XM12
X11-36	GM3XM5XM4	X12-36	GM8XM10XM9	X13-36	GM13XM15XM14
X11-37	GM4XM1XM2	X12-37	GM9XM6XM7	X13-37	GM14XM11XM12
X11-38	GM4XM1XM3	X12-38	GM9XM6XM8	X13-38	GM14XM11XM13
X11-39	GM4XM1XM5	X12-39	GM9XM6XM10	X13-39	GM14XM11XM15
X11-40	GM4XM2XM1	X12-40	GM9XM7XM6	X13-40	GM14XM12XM11
X11-41	GM4XM2XM3	X12-41	GM9XM7XM8	X13-41	GM14XM12XM13
X11-42	GM4XM2XM5	X12-42	GM9XM7XM10	X13-42	GM14XM12XM15
X11-43	GM4XM3XM1	X12-43	GM9XM8XM6	X13-43	GM14XM13XM11

Tablo 2.5 (devamı)

X11-44	GM4XM3XM2	X12-44	GM9XM8XM7	X13-44	GM14XM13XM12
X11-45	GM4XM3XM5	X12-45	GM9XM8XM10	X13-45	GM14XM13XM15
X11-46	GM4XM5XM1	X12-46	GM9XM10XM6	X13-46	GM14XM15XM11
X11-47	GM4XM5XM2	X12-47	GM9XM10XM7	X13-47	GM14XM15XM12
X11-48	GM4XM5XM3	X12-48	GM9XM10XM8	X13-48	GM14XM15XM13
X11-49	GM5XM1XM2	X12-49	GM10XM6XM7	X13-49	GM15XM11XM12
X11-50	GM5XM1XM3	X12-50	GM10XM6XM8	X13-50	GM15XM11XM13
X11-51	GM5XM1XM4	X12-51	GM10XM6XM9	X13-51	GM15XM11XM14
X11-52	GM5XM2XM1	X12-52	GM10XM7XM6	X13-52	GM15XM12XM11
X11-53	GM5XM2XM3	X12-53	GM10XM7XM8	X13-53	GM15XM12XM13
X11-54	GM5XM2XM4	X12-54	GM10XM7XM9	X13-54	GM15XM12XM14
X11-55	GM5XM3XM1	X12-55	GM10XM8XM6	X13-55	GM15XM13XM11
X11-56	GM5XM3XM2	X12-56	GM10XM8XM7	X13-56	GM15XM13XM12
X11-57	GM5XM3XM4	X12-57	GM10XM8XM9	X13-57	GM15XM13XM14
X11-58	GM5XM4XM1	X12-58	GM10XM9XM6	X13-58	GM15XM14XM11
X11-59	GM5XM4XM2	X12-59	GM10XM9XM7	X13-59	GM15XM14XM12
X11-60	GM5XM4XM3	X12-60	GM10XM9XM8	X13-60	GM15XM14XM13

2.2.2.3. Üretimde Kullanılan Peptidlerin Seçimi

MEME motif keşif aracı kullanılarak belirlenen motifler, başlangıç sekansındaki N-terminal, C-terminal ve merkez pozisyonlarına sırasıyla yerleştirilmiştir. Ardından motiflerin 3'lü kombinasyonlarını içeren peptid dizileri elde edilmiştir. Başlangıç sekansındaki joker aa yerine L, K, R ve I aminoasitlerinden yalnızca biri kullanılarak tasarlanan her bir dizinin 4 farklı versiyonu elde edilmiştir. Örneğin; 11 aminoasit uzunluğundaki motiflerin başlangıç sekansına sadece L joker aminoasidi yerleştirilmesiyle elde edilen peptid kombinasyonları “L11” peptid seti olarak adlandırılmıştır. K joker aminoasidi yerleştirilmesiyle K11, R joker aminoasidi yerleştirilmesiyle R11 ve I joker aminoasidi yerleştirilmesiyle de I11 peptid setleri elde edilmiştir. Aynı işlem 12 aa ve 13 aa uzunluğundaki motifler için de tekrar edildiğinde toplamda 12 peptid seti (“L11” “K11”, “I11” ve “R11” ; “L12”, “K12”, “I12” ve “R12”; “L13”, “K13”, “I13” ve “R13”) elde edilmiştir.

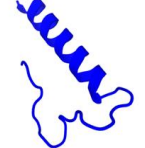
Tasarlanan peptidlerin antimikrobiyal aktivitesi CAMP_{R3} programı, toksisitesi ToxinPred, hemolitik aktivitesi ise HemoPI ile tahmin edilirken; hidrofobikliği PEPTIDE 2.0 programı, net yükü ve izoelektrik noktası ise PepCalc kullanılarak hesaplanmış ve antimikrobiyal aktivite skoru ≥ 0.5 , hidrofobikliği %30-%50 arasında ve net yükü +2-+9 aralığında, izoelektrik noktası >9, hemolitiklik skoru <0.5 ve non-toksik olan peptidler

seçilmiştir. Bu kriterler uygulandıktan sonra geriye kalan peptidlerin (EK 3) Expasy-ProtParam kullanılarak stabilite değerleri belirlenmiş ve stabilitesi en yüksek olan peptid setlerinden 4 tanesi (24 adet peptid) seçilmiştir (Tablo 2.6). Bu 4 peptid seti içerisinde de net yükü en yüksek olan peptid seti (L12-3, L12-10, L12-15, L12-22, L12-49, L12-52) belirlenmiştir. Bu peptid setindeki 6 peptidin tamamı M6, M7 ve M10 motifleri ile L joker aa kullanılarak elde edildiğinden fizikokimyasal özellikleri de aynı bulunmuştur (Şekil 2.5). Motiflerin peptid dizisi içerisindeki konumlarının değişimi fizikokimyasal özelliklerini değiştirmese de enerji skorları (sOPEP) ve docking skorlarını değiştirmektedir. Dolayısıyla bu 6 farklı peptid için önce sOPEP skorları ve daha sonra docking skorları belirlenmiştir. Peptidlerin sOPEP skorları Pep-FOLD3 (<https://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEPFOLD3>) programı ile belirlenmiş ve en düşük sOPEP skoruna sahip iki peptid (L12-49 ve L12-22) üretilmek üzere seçilmiştir. Seçilen L12-49 ve L12-22 peptidlerinin docking skorları, bir peptid-protein docking programı olan HDock (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hdock/>) kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 2.6. Stabilitesi en yüksek peptid setlerinin fizikokimyasal özellikleri ve In Siliko analizi ile elde edilen tahmini antimikrobiyal aktivite skorları

PEPTİDLER	AA	Kİ	pI	N	H	h	T
K11-3, K11-10, K11-15, K11-22, K11-49, K11-52	0.968	Stabil (-10.80)	9.93	2.9	36.5	58.33	Non-toksik
R11-3, R11-10, R11-15, R11-22, R11-49, R11-52	0.913	Stabil (2.98)	10.05	2.9	36.4	55.56	Non-toksik
K11-1, K11-4, K11-13, K11-16, K11-25, K11-28	0.875	Stabil (4.61)	9.45	3.8	31.3	44.44	Non-toksik
L12-3, L12-10, L12-15, L12-22, L12-49, L12-52	0.960	Stabil (9.92)	10.71	7.9	30.1	69.23	Non-toksik

AA: Antimikrobiyal Aktivite, Kİ: Kararsızlık indeksi, pI: İzoelektrik nokta, N: Net yük, H: Hidrofobiklik, h: Helisite, T: Toksidite.

PEPTİDLER	PEPTİD SEKANSLARI	3D YAPISI	sOPEP skoru
L12-49	G HCRARGRLGGY CL SLLNKLSCCKLS GL DAIKKVAKAAGK		-64.3806
L12-22	G DAIKKVAKAAGK LH CRARGRLGGY CL SLLNKLSCCKLSG		-61.6268
L12-15	G DAIKKVAKAAGK L SLLNKLSCCKLSG LH CRARGRLGGYC		-57.9078
L12-10	G SLLNKLSCCKLSG LH CRARGRLGGY CL DAIKKVAKAAGK		-57.5619
L12-3	G SLLNKLSCCKLSG L DAIKKVAKAAGK LH CRARGRLGGYC		-57.1333
L12-52	G HCRARGRLGGY CL DAIKKVAKAAG KL SLLNKLSCCKLSG		-56.986

Şekil 2.5. M6, M7ve M10 motifleri ve L joker aminoasidi kullanılarak oluşturulan peptid kombinasyonlarının sOPEP ve Doking skorları

2.2.3. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Tespiti ve Kodon Optimizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında tasarlanan L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA dizileri, protein dizisini nükleik asit dizisine çevirmeye yarayan EMBOSS Backtranseq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) tahminleme programı kullanılarak elde edilmiştir. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin aminoasit dizileri ve bu dizilere karşılık gelen DNA dizileri Tablo 2.7’de verilmiştir. Daha sonra *P. pastoris* kodon kullanım sıklığı tablosundan (<https://www.genscript.com/tools/codonfrequency->

table) L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA dizilerinin kodon optimizasyonu yapılmıştır. Ayrıca restriksiyon kesim enzimi tanıma programı (<http://www.restrictionmapper.org/>) kullanılarak hedef peptidleri kodlayan DNA dizilerindeki restriksiyon enzimi kesim bölgelerinin kontrolü yapılmıştır.

Tablo 2.7. L12-49 ve L12-22 peptidlerine ait aminoasit ve nükleik asit dizileri

Peptid kodu			Uzunluk
Aminoasit dizisi	L12-49	GHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSDLAIKKVAKAAGK	39aa
	L12-22	GDAIKKVAKAAGKLHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSG	39aa
Nükleik asit dizisi	L12-49	5'- GGTCATTGTAGAGCTAGAGGTAGATTGGGTGGTACTG TTTGTCTTTGTTGAACAAGTTGTCTTGTAAAGTTGTCTGGT TTGGATGCTATTAAGAAGGTTGCTAAGGCTGCTGGTAA G-3'	117bç
	L12-22	5'- GGTGATGCTATTAAGAAGGTTGCTAAGGCTGCTGGTAA GTTGCATTGTAGAGCTAGAGGTAGATTGGGTGGTACT GTTTGTCTTTGTTGAACAAGTTGTCTTGTAAAGTTGTCTG GT-3'	117bç

aa:aminoasit, bç:baz çifti

2.2.4. L12-49 ve L12-22 Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Üretimi

L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA dizileri belirlendikten sonra C- terminal ucuna sırasıyla 6x Histidin etiketi (CATCATCATCATCAT), iki adet stop kodonu (TAA ve TGA), *NotI* enzim kesim bölgesi ve üç adet stabilite bazı (A,T ve C) eklenmiştir. N-terminal ucuna ise, iki adet stabilite bazı (C ve G) ve *EcoRI* enzim kesim bölgesi eklenmiş ve toplam uzunluğu 160 baz çifti (bç) olan iki adet DNA dizisi elde edilmiştir (Şekil 2.6).

L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizileri, öz yinelemeli (rekürsif) PCR yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Bu amaçla herbir peptidi kodlayan DNA dizileri orta kısımlarındaki 15 nükleotid ile birbirini tamamlayacak şekilde ikiye bölünmüş ve biri 88 (L12-49-F ve L12-22-F) diğeri 87 (L12-49-R ve L12-22-R) bç uzunluğunda iki adet oligonükleotid elde edilmiştir. Bu oligonükleotidlerin sentezi Sentebiolab firması

tarafından yapılmıştır (Tablo 2.8 ve Tablo 2.9). Öz yinelemeli PCR ile L12-49-F ve L12-22-F oligonükleotidleri sırasıyla L12-49-R ve L12-22-R oligonükleotidlerine 3' uçlarındaki 15 nükleotidden bağlanarak (annealing) amplifiye edilmiş ve böylece L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan 160 bç uzunluğunda iki DNA fragmenti elde edilmiştir. L12-49 ve L12-22 fragmentlerini amplifiye etmek için hazırlanan PCR reaksiyon karışımları ve sıcaklık döngüleri Tablo 2.10'da gösterilmiştir.

L12-49

CAT

5'-**CGGAATTC** GGT CAC TGT AGA GCT AGA GGT AGA TTG GGT GGT TAC TGT TTG TCT TTG
Gly His Cys Arg Ala Arg Gly Arg Leu Gly Gly Tyr Cys Leu Ser Leu

GAT ATT

TTG AAC AAG TTG TCT TGT AAG TTG TCT GGT TTG GAC GCT ATC AAG AAG GTT GCT AAG GCT
Leu Asn Lys Leu Ser Cys Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ile Lys Lys Val Ala Lys Ala

GCT GGT AAG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAA TGA **GCGGCCGCATC-3'**
Ala Gly Lys *** **

L12-22

GAT ATT CAT

5'-**CGGAATTC** GGT GAC GCT ATC AAG AAG GTT GCT AAG GCT GCT GGT AAG TTG CAC TGT
Gly Asp Ala Ile Lys Lys Val Ala Lys Ala Ala Gly Lys Leu His Cys

AGA GCT AGA GGT AGA TTG GGT GGT TAC TGT TTG TCT TTG TTG AAC AAG TTG TCT TGT AAG
Arg Ala Arg Gly Arg Leu Gly Gly Tyr Cys Leu Ser Leu Leu Asn Lys Leu Ser Cys Lys

TTG TCT GGT CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAA TGA **GCGGCCGCATC-3'**
Leu Ser Gly *** **

Şekil 2.6. L12-49-6His ve L12-22-6His'e ait nükleotid ve aminoasit dizileri. Kırmızı renkle gösterilenler *P. pastoris* kodon kullanım sıklığı tablosu kullanılarak elde edilen kodonlardır. Yeşil renkte gösterilenler *EcoRI*, mavi renkle gösterilenler *NotI* restriksiyon enzimine ait bölgeleri gösterir. Mor renkli olanlar ise, stabilite bazlarıdır. ***; stop kodonunu ifade eder.

Tez çalışmasında tasarlanan peptidleri kodlayan DNA fragmentlerini amplifiye etmek amacıyla primer3 Input (<https://primer3.ut.ee/>) programı kullanılarak GPF/GPR ortak primerleri tasarlanmıştır. pPICZα-A vektöründeki AOX bölgesinin amplifikasyonu

amacıyla ticari ekspresyon kitinde (Invitrogen, ABD) bulunan 5'AOX1 ve 3'AOX1 primerleri kullanılmıştır (Tablo 2.8)

Tablo 2.8. Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer	Baz Dizisi	Tm (°C)	Amplikon uzunluğu
GPF	GAGAGGCTGAAGCTGAATTC	51	~250
GPR	TTGGTTCTAGAAAGCTTGCGG	52	
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	52	588*
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	52	

*pPICZαA vektörünün AOX primerler ile çoğaltıldığında elde edilen bölgenin uzunluğu Tm: Erime sıcaklığı

Tablo 2.9. L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerinin sentezinde kullanılan oligonükleotidler

Primer	Baz dizisi (5'-3')	Dizi uzunluğu	Amplikon uzunluğu
L12-49-F	CGGAATTCGGTCATTGTAGAGCTAGAGGTAGAT TGGGTGGTTACTGTTTGTCTTTGTTGAACAAGTT GTCTTGTAAGTTGTCTGGTTT	88	160bç
L12-49-R	GATGCGGCCGCTCATTAATGATGATGATGATGA TGCTTACCAGCAGCCTTAGCAACCTTCTTAATA GCATCCAAACCAGACAACCTA	87	
L12-22-F	CGGAATTCGGTGATGCTATTAAGAAGGTTGCTA AGGCTGCTGGTAAGTTGCATTGTAGAGCTAGAG GTAGATTGGGTGGTTACTGTTT	88	160bç
L12-22-R	GATGCGGCCGCTCATTAATGATGATGATGATGA TGACCAGACAACCTTACAAGACAACCTTGTTCAAC AAAGACAACACAGTAACCAACC	87	

Altı çizilmiş baz çiftleri rekürsif PCR'da birbirinin tamamlayıcısı olan oligonükleotidlerdir. Kırmızı renkli olanlar ise *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimi kesim dizileridir.

Tablo 2.10. Peptidleri kodlayan oligonükleotidlerin amplifikasyonu için hazırlanan reaksiyon karışımları ve PCR koşulları

PCR Reaksiyon Karışımı		PCR Reaksiyon Koşulları			
Bileşen	Hacim (μ l)	Aşama	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
10X Reaksiyon	5	İlk Denatürasyon	60	94	1
2.5 mMdNTPs	4	Denatürasyon	20	94	
Taq DNA polimeraz	1	Bağlanma	20	65	35
İleri Primer (10 μ M)	1	Uzama	30	72	
Geri Primer (10 μ M)	1	Son Uzama	300	72	1
Deiyonize Su	38				
Toplam reaksiyon hacmi	50				

2.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü

PCR ürünlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Bu amaçla 2 g agaroz (TransGen Biotech, GS201-01, Çin) üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklenerek hazırlanan karışım, mikrodalga fırında 200°C sıcaklıkta iyice çözündürüldükten sonra 50-55 °C'ye soğutulmuş ve üzerine 10 μ l ethidium bromide (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, 1239-45-8, ABD) eklenmiştir. Kalıba dökülen jel katılaştıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiş ve kuyucuklara PCR ürünleri, 2 μ l 6X DNA yükleme boyasıyla (TransGenbio, GH101-01, Çin) karıştırılarak yüklenmiştir. Daha sonra jel 1X TAE buffer (242g Tris, 57,1 ml asetik asit, 0.5M EDTA) içerisinde 100-5000 bp'lik DNA marker (TransGenbio, BM321-01, Çin) ile birlikte 80 V'da 40-45 dk yürütülmüş ve PCR ürünleri UV ışık altında (Bio-Rad, Gel-Doc XR, ABD) görüntülenmiştir.

2.2.6. Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

2.2.6.1. L12-49-6His ve L12-22-6His Peptidlerini Kodlayan DNA Fragmentlerinin ve Ekspresyon Vektörünün Ligasyona Hazırlanması

L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerine ait PCR ürünlerinin saflaştırılmasında ticari bir saflaştırma kiti (Macherey-Nagel 740609.50, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak 100 μ l PCR ürününe 200 μ l bağlama tamponu (NTI) eklenmiş ve elde edilen

karışım spin kolona aktarılmıştır. Kolondaki karışım, oda sıcaklığında, 11.000xg'de 30 sn santrifüj edildikten sonra alt faz uzaklaştırılmış ve ardından yıkama işlemine geçilmiştir. Bunun için, 700 µl yıkama tamponu (NT3) spin kolona eklenmiş ve oda sıcaklığında 11.000xg'de 30sn santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Daha sonra yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması için spin kolon boş halde, oda sıcaklığında, 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiş ve ardından kolon kapakları açık bir şekilde 2 dk bekletilmiştir. Son olarak 20 µl elüsyon tamponu (NE) spin kolonlara eklenmiş ve 5 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığında 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek PCR ürünleri saf bir şekilde elüe edilmiştir. Daha sonra saflaştırılmış PCR ürünleri ve pPICZα-A ekspresyon vektörü, yapışkan uçların oluşturulması amacıyla, *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. . PCR ürünleri ve pPICZα-A vektörünün kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımları Tablo 2.11 ve Tablo 2.12'de verilmiştir. Hazırlanan bu reaksiyon karışımları 37°C'de 2 saat bekletilmiş ve ardından 65°C'de 20 dk ısıtım işlemi uygulanarak enzimler inaktive edilmiştir. Kesimden sonra ticari saflaştırma kiti (Macherey-Nagel, #740609.50, Almanya) kullanılarak PCR ürünleri saflaştırılmış ve ligasyona hazır hale getirilmiştir.

Tablo 2.11. PCR ürünlerinin *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
10X Flycut®Buffer	2 µl
Flycut®EcoRI	0.5 µl
Flycut®NotI	0.5 µl
DNA (rPCR ürünü)	10 µl (~1µg)
Nükleaz içermeyen su	7 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 2.12. pPICZ α -A vektörünün *Eco*RI ve *Not*I restriksiyon enzimleri ile kesimi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
10X Flycut®Buffer	2 μ l
Flycut® <i>Eco</i> RI	0.5 μ l
Flycut® <i>Not</i> I	0.5 μ l
DNA (pPICZ α -A vektörü)	2 μ l(1 μ g)
Nükleaz içermeyen su	15 μ l
Toplam Hacim	20 μ l

Ekspresyon vektörünün saflaştırılmasında ise aynı saflaştırma kitinin (Macherey-Nagel 740609.50, Almanya) jelden DNA ekstraksiyon protokolü uygulanmıştır. Bunun için, *Eco*RI ve *Not*I restriksiyon enzimleri ile kesilen ekspresyon vektörü %1,5'lik (w/v) agaroz jelde 80 V'da 40-60 dk yürütülmüştür. Jeldeki bantlar, UV ışınlarına maruz bırakılmadan dikkatli bir şekilde kesilmiş ve kit protokolü uygulanarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle hedef bantları içerecek şekilde kesilen jeller tüplere alınmış ve 100 mg jel başına 200 μ l NTI tamponu eklendikten sonra 50°C'de 10 dk bekletilerek çözüldürülmüş ve ardından spin kolonlara aktarılmıştır. Daha sonraki saflaştırma adımları ise PCR ürünü saflaştırma protokolüne göreyapılmıştır.

2.2.6.2. Ligasyon

L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan yapışkan uçlu DNA fragmentlerinin (insert DNA) yapışkan uçlu pPICZ α -A vektörüne ligasyonunda kullanılacak insert DNA miktarı aşağıdaki formülle hesap edilmiştir. T4 DNA ligaz enzimi (TransGenbio, FL101-01, Çin) kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 2.13'da verilmiştir. Ligasyonun gerçekleşmesi için reaksiyon karışımı 25°C'de 2 saat bekletilmiş ve böylece L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerinin pPICZ α -A vektörüne bağlanması sağlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler pPICZ α A-L12-49-6His ve pPICZ α A-L12-22- 6His olarak isimlendirilmiştir.

$$\text{Insert DNA miktarı (ng)} = 100 \text{ ng vektör DNA} \times \frac{A \text{ bç (insert DNA)}}{3600 \text{ bç (vektör DNA)}} \times \frac{6}{1}$$

A: İnsert DNA'nın uzunluğu (bç)

Tablo 2.13. Ligasyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (L12-49)	Miktar (L12-22)
pPICZα-A vektörü	4 µl (~100ng)	4 µl (~100ng)
Vektöre bağlanacak DNA (insert DNA)	2 µl (~30ng)	2 µl (~30ng)
5X T4 Ligasyon tamponu	2 µl	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µl
Nükleaz içermeyen su	1 µl	1 µl
Toplam Hacim	10 µl	10µl

2.2.7. Rekombinant Plazmitlerin *E. coli* DH5α Hücrelerinde Klonlanması

2.2.7.1. Kompetent *E. coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent *E. coli* DH5α hücrelerinin elde edilmesi amacıyla, *E. coli* DH5α kültüründen LB agar besiyerine ekim yapıldıktan sonra $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kolonilerden bir tane seçilip içerisinde 5 ml LB sıvı besiyeri olan 100 ml'lik erlenmayere inoküle edilmiştir. Ardından erlenmayer çalkalayıcılı inkübatöre (IKA, KS 4000i, Almanya) alınarak, 37°C ve 220 rpm'de, 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra erlenmayerdeki kültür ortamının tamamı 50 ml'lik LB sıvı besiyerine aktarılmış ve aynı koşullarda (37°C ve 220 rpm) inkübasyonuna devam edilmiştir. Kültürün spektrofotometre (Shimadzu, UV-1700, Japonya) ile 600 nm'de absorbans değeri ölçülmüş ve OD₆₀₀ değeri 0,5-0,6 aralığına ulaşmıncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir. OD₆₀₀ değeri istenilen aralığa ulaştığında kültür ortamı 25°C 'de 4000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 200R, Almanya). Santrifüj sonrasında elde edilen hücre pelleti üzerine 100 mM CaCl₂ çözeltisinden 15 ml eklenmiş ve 4 saat boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından 4°C 'de 4000xg'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen hücre pelleti, 2 ml soğuk gliserol+CaCl₂ çözeltisiyle süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspanسیونları porsiyonlanarak -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

2.2.7.2. Rekombinant pPICZαA Plazmidlerinin ve Boş pPICZαA Vektörünün Kompetent *E. coli* DH5α Hücrelerinde Klonlaması

pPICZαA-L12-49-6His ve pPICZαA-L12-22-6His rekombinant plazmitleri, daha önceden hazırlanarak -80°C'ye alınmış kompetent *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmıştır. Bu amaçla buz üzerinde soğutulmuş 500µl'lik bir mikrosantrifüj tüpüne, -80°C'de muhafaza edilen kompetent *E. coli* DH5α kültüründen 10 µl ve ligasyon karışımından da 1 µl ilave edilerek hafifçe karıştırılmıştır. Karışım buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Ardından ısı şok uygulamak için karışım önce 42°C'lik ısıtıcı bloğa alınarak 45 sn, daha sonra da hemen buz üzerine alınarak 2 dk bekletilmiştir. Isıl şok uygulamasından sonra karışımın üzerine oda sıcaklığındaki 200 µl'lik LB sıvı besiyeri eklenmiş ve hafifçe karıştırılarak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımından 100 µl alınmış ve 50 µg/ml zeosinli LB agara yayma yöntemiyle ekilmiştir. Ekim yapılan petriler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Petrilerde gelişen kolonilerin, hedef DNA dizilerini içerip içermediği doğrulanarak pozitif *E. coli* DH5α klonları belirlenmiştir. Ayrıca aynı işlem basamakları takip edilerek linearize edilmiş boş pPICZαA vektörü de *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmıştır.

2.2.7.3. *E. coli* DH5α Klonlarını Doğrulanması

2.2.7.3.1. *E. coli* DH5α Klonlarından Plazmid DNA izolasyonu

E. coli DH5α klonlarından plazmid DNA izolasyonunda ticari plazmid izolasyon kiti (Trans EasyPure® Hipure Plazmid Miniprep Kiti TransGenbio, EM111-01, Çin) kullanılmış ve kit protokolüne uygun olarak aşağıda bildirilen işlem basamakları takip edilmiştir.

-Klonlama sonrasında zeosinli (50 µg/ml) LB agarda geliştirilen *E. coli* DH5α kolonilerinden 5-10 adet seçilmiş ve her bir koloni 5 ml'lik zeosinli LB sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

-İnkübasyon süresi sonunda kültür oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilerek üst fazı uzaklaştırılmıştır.

- Santrifüjden sonra kalan pellete, 250 µl süspansiyon tamponu (RB) ilave edilmiş ve pellet iyice süspanse edildikten sonra üzerine 250 µl lizis buffer (LB) eklenen tüpler 5-6 defa alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 350 µl nötürleştirme tamponu (NB) eklenmiş ve 6-7 defa hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Tüpler oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12.000xg'de 5 dk santrifüj edilerek üst fazı ayrılmıştır.
- Ayrılan süpernatant temiz bir spin kolona aktarılmış ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek alta geçen faz atılmıştır.
- Spin kolona 650 µl yıkama tamponu (WB) ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek alta geçen faz atılmıştır.
- Ardından kolon ikinci kez 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilerek WB solüsyonundan kalan alkol uzaklaştırılmış ve alta geçen faz atılmıştır.
- Daha sonra kolon kapağı açılıp 2 dk bekletilmiş ve kalan alkol tamamen uçurulmuştur.
- Son olarak spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpünün içine yerleştirilmiş ve 30 µl elüsyon tamponu (EB) ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra mikrosantrifüj tüpü oda sıcaklığında 10.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen plazmid DNA'ların konsantrasyonları, nanodrop UV-Vis spektrometre (Quawell, Q5000, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.7.3.2. Plazmid DNA'ların PCR ile Kontrolü

E. coli DH5α klonlarından izole edilen plazmid DNA'ların, hem pPICZαA vektörünü hem de L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerini içerip içermediği kontrol edilmiştir. Bu amaçla *E. coli* DH5α klonlarından izole edilen plazmidler, önce pPICZαA vektöründeki AOX bölgesini hedefleyen 5'AOX1 ve 3'AOX1 primerleri; daha sonra her iki peptidi kodlayan DNA fragmentleri için ortak olan GPF/GPR primerleri ile amplifiye edilmiştir. PCR reaksiyonlarında Tablo 2.14'da

verilen reaksiyon karışımı ve koşulları kullanılmıştır. PCR ürünlerinin kontrolü %2'lik agaroz jelde yürütülerek yapılmıştır.

Tablo 2.14. Plazmid DNA'ların kontrolünde kullanılan PCR reaksiyon karışımı ve uygulanan reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyon Karışımı		PCR Reaksiyon Koşulları			
Bileşen	Hacim (μ l)	Aşama	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
10X Reaksiyon	5	İlk Denatürasyon	60	94	1
2.5 mMdNTPs	4	Denatürasyon	20	94	
Taq DNA polimeraz	1	Bağlanma	20	(45)-(52)***	35
İleri Primer* (10 μ M)	1	Uzama	30	72	
GeriPrimer ** (10 μ M)	1	Son Uzama	300	72	1
DNA (100 ng/ μ l)	2				
Deiyonize Su	36				
Toplam reaksiyon hacmi	50				

*: GPF/5' AOX primerlerinden herhangi biri

**: GPR /3' AOX primerlerinden herhangi biri

***: 45°C hedef DNA dizisi primerleri için, 52°C AOX primerleri için bağlanma sıcaklığıdır.

2.2.7.3.3. Plazmid DNA'ların Sekans Analizi ile Kontrolü

E. coli DH5 α klonlarından izole elde edilen plazmid DNA'ların 5' AOX1/3' AOX1 primerleri ile amplifikasyonu sonucunda beklenen uzunlukta (693 bp) PCR ürünleri üreten ve hedef peptidleri kodlayan DNA fragmentlerini içerdiği belirlenen klonların, AOX bölgesi için dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla MedSanTek (İstanbul) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. DNA dizi analiz sonuçları rekombinant plazmidlerin AOX dizisi ile karşılaştırılmış ve doğruluğu teyit edilen klonlar, zeosinli (50 μ g/ml) LB sıvı besiyerine alınarak 18 saat geliştirilmiştir. Ardından %30 oranında gliserol eklenip -80°C'de saklanmıştır.

2.2.8. *P. pastoris* GS115 Hücrelerine Transformasyon

2.2.8.1. Rekombinant Plazmidlerin Linear Hale Getirilmesi

Doğrulanmış *E. coli* DH5 α klonlarından izole elde edilen rekombinant plazmidler, *P. pastoris* hücrelerine transforme edilmeden önce *SacI* enzimiyle linearize edilmiştir. Bu amaçla Tablo 2.15’de verilen reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışım 37°C’de 2 saat bekletilerek linearizasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.15. Plazmid linearizasyonu için hazırlanan karışım

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
10X Flycut®Buffer	5 μ l
<i>SacI</i>	1 μ l
Plazmid DNA*	1.5 μ g
Steril ddH ₂ O	50 μ l’ye tamamlanır.

* pPICZ α A-L12-49 /pPICZ α A-L12-22/ pPICZ α A plazmidlerinin herhangi biri

Linearizasyon tamamlandıktan sonra *SacI* enziminin inaktivasyonu için reaksiyon karışımı 80°C’de 20 dk bekletilmiş ve ardından 2 μ l’si agaroz jelde yürütülerek plazmidin kesilip kesilmediği kontrol edilmiştir. Linearizasyonu teyit edilen plazmidlerin saflaştırılması amacıyla reaksiyon karışımına 3 hacim %100’lük etanol ve 1/10 hacim 3M sodyum asetat ilave edilerek -20°C’de 2 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 4°C’de 15.000xg’de 30 dk santrifüj edilen karışımın üst fazı nazikçe uzaklaştırılmış, kalan pellet ise üzerine 1 ml %70’lik etanol eklenerek 4°C’de 14.000xg’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst faz dökülerek kalan pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet ~15 μ l steril distile su ile çözündürülerek transformasyona hazır hale getirilmiştir.

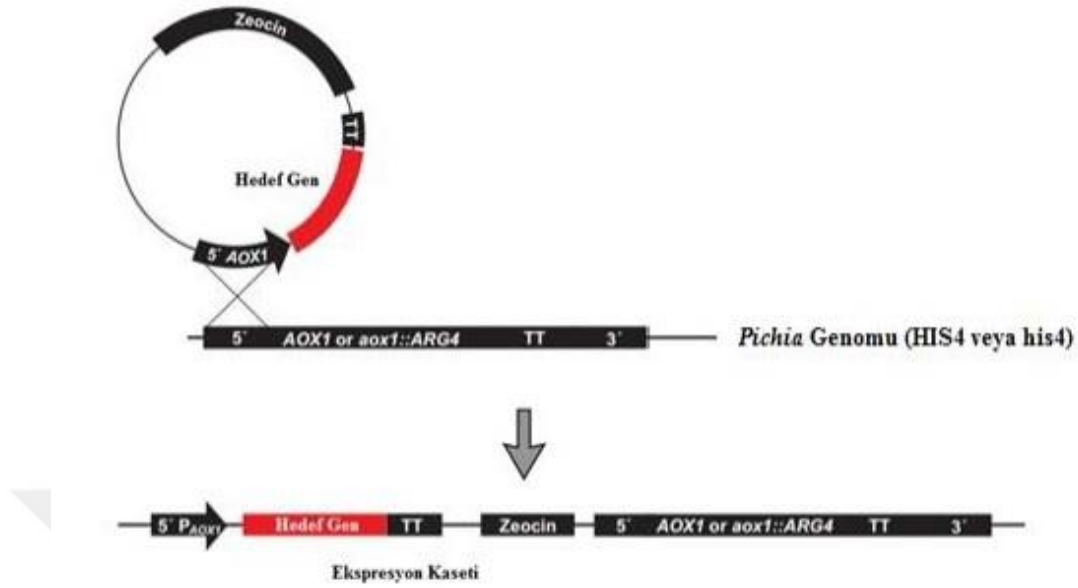
2.2.8.2. *P. pastoris* GS115 Hücrelerinin Transformasyona Hazırlanması

P. pastoris GS115 hücreleri YPD agara ekilerek 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından gelişen koloniler arasından bir tane seçilerek içerisinde 5 ml steril YPD sıvı besiyeri bulunan 50 ml’lik erlenmayere alınmış ve 250 rpm’e ayarlanmış çalkalayıcılı inkübatörde 28-30°C’de 1 gece (~18-20 saat) inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda içerisinde 500 ml’lik steril YPD sıvı besiyeri bulunan 2 litrelik erlenmayere bu kültürden 0,1-0,5 ml aktarılmıştır. Daha sonra OD₆₀₀ değeri 1,3–1,5 aralığına ulaşınca kadar çalkalayıcılı inkübatörde 28-30°C’de inkübasyona devam

edilmiştir. Kültürün OD₆₀₀ değeri hedeflenen aralığa ulaştığında 1500xg'de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Daha sonra hücre pelletine soğutulmuş steril saf sudan 500 ml eklenerek süspanse edilmiş ve tekrar 1500xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra pellete bir kez daha 250 ml soğutulmuş steril saf su eklenmiş ve iyice süspanse edildikten sonra tekrar 1500xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pellete 1M sorbitol'dan 20 ml eklenerek süspanse edilmiş ve yine 1500xg'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Son olarak elde edilen pellet son hacmi 1,5 ml olacak şekilde 1M sorbitol içerisinde süspanse edildikten sonra 80 µl'lik porsiyonlar halinde mikrosantrifüj tüpler içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8.3. Kompetent *P. pastoris* GS115 Hücrelerine Transformasyon

Lineer hale getirilen plazmidler, elektroporasyon yöntemiyle kompetent *P. pastoris* GS115 hücrelerine transforme edilmiştir. Bu amaçla daha önceden 80 µl'lik porsiyonlar halinde hazırlanan kompetent *P. pastoris* GS115 hücrelerine 10 µg (~10-12 µl) plazmid DNA eklenmiştir. Ardından bu karışım buz üzerinde bekletilen 0,2 cm'lik soğuk elektroporasyon küvetine alınarak 5 dk bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda elektroporatör (BioRad, MicroPulser Electroporator, ABD) cihazına yerleştirilen küvete, 1,5 kV'ta elektrik akımı sağlayan "Sc2" programı kullanılarak 5 ms süre ile elektroporasyon uygulanmıştır. Elektroporasyondan sonra küvetlere hızlıca 1:1 oranında soğutulmuş 1M sorbitol:YPD sıvı besiyeri karışımından 1 ml eklenmiştir. Daha sonra bu karışım, 1.5 ml'lik tüpe alınıp 30°C'de 3 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hücre karışımından 200 µl alınarak 200 µg/ml zeosin içeren YPDS agara yayma yöntemiyle ekilmiş ve 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. *P. pastoris* GS115 genomuna Şekil 2.7'de şematize edildiği gibi entegre olan rekombinant plazmidler, konak hücrelerin zeosinli besiyerinde gelişmesini mümkün kılmıştır.



Şekil 2.7. Rekombinant plazmidin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu
(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf).

Zeosinli YPDS agarda gelişen *P. pastoris* kolonilerinden 10-15 tanesi 1000 µg/ml'lik zeosin içeren YPD agara ekilerek 28-30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu şekilde zeosin direnç seviyeleri belirlenen kolonilerden iyi gelişim gösterenler seçilmiş ve tekrar 200 µg/ml'lik zeosinli YPD agar plakalara ekilip 28-30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler YPD agardan alınıp, zeosinli (200 µg/ml) YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve bir gece boyunca geliştirildikten sonra %30 oranında gliserol eklenerek -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8.4. *P. pastoris* GS115 Transformantlarının Doğrulanması ve Transkripsiyon Kontrolü

2.2.8.4.1. *P. pastoris* GS115 Transformantlarından DNA İzolasyonu

Zeosin direnç seviyeleri belirlendikten sonra YPD agar plakalarda gelişen *P. pastoris* GS115 kolonileri, DNA izolasyonu için, 5 ml zeosinli (200 µg/ml) YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve ardından 250 rpm'de 28-30°C'de 1 gece (~18-20 saat) boyunca inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonunda hücreler 4°C’de 12.000xg’de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmış, sonra da kalan pellete 400 µl STET (50 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris ve %5 Triton X-100) tamponu eklenerek süspanse edilmiştir.
- Süspansiyon 2 ml’lik tüplere aktarılarak 5–10 sn boyunca vortekslenildikten sonra ısıtıcı blokta 95°C’de 15 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra 56°C’ye soğutulan tüplere 20 µl proteinaz K (Sigma-Aldrich, P6556, ABD) eklenerek vortekslenmiş ve 56°C’de 15 dk aralıklarla vortekslenip 2-3 saat beklemeye bırakılmıştır.
- Bekleme süresi sonunda tüplere %10’luk CTAB ve 0,7 M NaCl çözeltisinden 300 µl eklenip 65°C’de 15 dk bekletilmiştir.
- Tüpler oda sıcaklığına getirilerek, 500 µl fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenmiş ve 20 dk karıştırılmıştır.
- Karıştırma işleminden sonra tüpler oda sıcaklığında 20.000xg’de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra temiz tüplere alınan süpernatantlar üzerine 250 µl %2’lik CTAB eklendikten sonra 65°C’de 10 dk boyunca beklemeye bırakılmıştır.
- Tekrar oda sıcaklığına soğutulan tüplere 500 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklendikten sonra 15 dk karıştırılmış ve ardından oda sıcaklığında 20.000xg’de 15 dk santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjden sonra üst faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 550 µl izopropanol ile 20 µl 3M sodyum asetat eklenerek -20°C’de 2-3 saat bekletilmiştir.
- Daha sonra 4°C’de 20.000xg’de 20 dk santrifüj işlemi uygulanan tüplerin, üst fazı uzaklaştırılmış ve kalan pellete 500 µl %70’lik soğuk etanol eklenmiştir.
- Tüpler 20.000xg’de 10 dk santrifüjlenmiş ve üst faz uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Kuruma tamamlandıktan sonra tüplere, 100 µl TE tampon ilave edilmiş ve 15–20 dk bekletilerek DNA çözündürülmüştür.

-DNA konsantrasyonları, nanodrop UV-Vis spektrometre (Quawell, Q5000, ABD) ile ölçüldükten sonra -20° C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.8.4.2. *P. pastoris* GS115 Transformantlarının PCR analizi ile Doğrulanması

P. pastoris GS115 transformantlarından izole edilen DNA’lar, L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerine spesifik olarak tasarlanmış GPF/GPR primerler ile amplifiye edilerek transformantların genomuna bu DNA dizilerinin entegre olup olmadığını kontrol edilmiştir. Ayrıca Mut fenotipinin (Mut⁺ veya Mut^s) belirlenmesi için de izole edilen DNA’ların AOX1 bölgesine ait primerler (5’AOX1/3’AOX1) ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan reaksiyon karışımları ve uygulanan reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 2.16 ve Tablo 2.17’de verilmiştir. Amplifikasyon ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Tablo 2.16. *P. pastoris* transformantlarının doğrulanması için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyon Karışımı		PCR Reaksiyon Koşulları			
Bileşen	Hacim (µl)	Aşama	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
10X Reaksiyon	5	İlk Denatürasyon	60	94	1
2.5 mMdNTPs	4	Denatürasyon	20	94	
Taq DNA polimeraz	1	Bağlanma	20	(45)	35
İleri Primer* (10µM)	1	Uzama	30	72	
GeriPrimer ** (10µM)	1	Son Uzama	300	72	1
DNA (100 ng/µl)	2				
Deiyonize Su	36				
Toplam reaksiyon hacmi	50				

*, GPF, **, GPR

Tablo 2.17. AOX1 bölgesinin tespiti için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyon Karışımı		PCR Reaksiyon Koşulları			
Bileşen	Hacim (μ l)	Aşama	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
10X Reaksiyon	5	İlk Denatürasyon	60	94	1
2.5 mMdNTPs	4	Denatürasyon	20	94	
Taq DNA polimeraz	1	Bağlanma	20	(52)	35
İleri Primer* (10 μ M)	1	Uzama	120	72	
GeriPrimer ** (10 μ M)	1	Son Uzama	300	72	1
DNA (100 ng/ μ l)	2				
Deiyonize Su	36				
Toplam reaksiyon hacmi	50				

*; 5'AOX1 primer **; 3'AOX1 primer

PCR sonrasında L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerini içerdiği tespit edilen Mut⁺ fenotipine sahip transformantlar sırasıyla *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His olarak isimlendirilmiştir. Transformantlar zeosinli (200 μ g/ml) YPD sıvı besiyerinde bir gece geliştirildikten sonra %30 oranında gliserol eklenerek -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8.4.3. *P. pastoris* GS115 Transformantlarından RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi

P. pastoris GS115/pPICZ α A-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His transformantlarında transkripsiyonun kontrolü reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile yapılmıştır. Transformantlardan RNA ekstraksiyonu, ticari RNA ekstraksiyon kiti (TransGenbio, ER101-01, Çin) kullanılarak aşağıda verilen kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir:

- *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His stok kültüründen YPD agar plakalara (200 μ g/ml'lik zeosinli) ekilip 28-30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra gelişen koloniler, 5 ml'lik zeosinli (200 μ g/ml) YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 30°C'de 250 rpm'de 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyondan sonra 4°C'de 12.000xg'de 5 dk santrifüj edilen kültürün üst fazı uzaklaştırılmıştır.
- Kalan hücre pelletine 500 µl steril saf su eklenmiş ve iyice süspanse edilen karışım 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktararak 4°C'de 12.000xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra kalan pellete 100µl TE/lizozim tamponundan eklenerek kuvvetli bir şekilde vortekslenmiş ve hücreler tampon içerisine homojen bir şekilde dağılmıştır.
- Daha sonra homojenata β-merkaptöetanol içeren bağlama tamponundan (BB4) 350 µl eklenmiş ve iyice vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 5 dk beklemeye bırakılmıştır.
- Bu sürenin sonunda karışım oda sıcaklığında (25°C'de) 12.000xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra süpernatant temiz bir tüpe alınarak üzerine 250 µl %70'lik etanol eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra tamamı spin kolona aktarılmıştır.
- Ardından oda sıcaklığında 12.000xg'de 30 sn santrifüj edilen spin kolonun altına geçen faz uzaklaştırılmıştır.
- Spin kolonun üzerine temizleme tamponundan (CB4) 500 µl eklenmiş ve oda sıcaklığında (25°C'de) 12.000xg'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- Daha sonra alta geçen faz uzaklaştırılmış ve spin kolona üzerine DNase I solüsyonundan (70 µl DNase I reaksiyon tamponu + 10 µl DNase I) 80µl eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir.
- Bekletme süresi sonunda spin kolona 500 µl CB4 tamponundan eklenmiş ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 30 sn santrifüj edilerek alta geçen faz uzaklaştırılmıştır.
- Daha sonra spin kolona 500 µl yıkama tamponu (WB4) eklenmiş ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 30 sn santrifüj edilmiş ve ardından aynı yıkama işlemine bir kez daha tekrar edilmiştir.
- Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra bir kez de boş olarak oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilen spin kolon, 2 dk kapağı açık bir şekilde bekletilerek kalan etanol uzaklaştırılmıştır.

- Spin kolon üzerine 40 µl RNase içermeyen su eklendikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dk bekletilip, 12.000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

- Elüe edilen RNA'lar buz üzerine alınıp, nanodropta (Quawell, Q5000, ABD) konsantrasyonları ölçülmüş ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Konsantrasyonları belirlenen RNA'lar, hem hedef peptid dizilerine spesifik GPF/GPR ortak primerleri ve hem de AOX1 bölgesine ait 5'AOX1/3'AOX1 primerleri kullanılarak RT-PCR ile analiz edilmiştir. Bu amaçla Tablo 2.18'de verilen RT-PCR reaksiyon karışımları ve reaksiyon koşulları kullanılmış ve elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Tablo 2.18. RT-PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyon Karışımı		PCR Reaksiyon Koşulları			
Bileşen	Miktar (µl)	Aşama	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
Reaksiyon Mixi	10	Ters	1800	45	1
RNA Template	1,5(~30ng)	Trankripsiyon			
İleri Primer* (10µM)	0,4	İlk denatürasyon	300	95	1
GeriPrimer ** (10µM)	0,4	Denatürasyon	30	95	
Enzim Mix	0,4	Bağlanma	30	(45-52)***	35
Deiyonize Su	20µl'ye tamamlanır.	Uzama	40	72	
Reaksiyon hacmi	50	Son uzama	300	72	1

*:GPF, 5'AOX primerlerinden herhangi biri

**:GPR, 3'AOX primerlerinden herhangi biri

***:45°C hedef DNA primerleri için, 52°C AOX primerleri için bağlanma sıcaklığıdır.

2.2.9. Rekombinant Peptidlerinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.2.9.1. Rekombinant Peptidlerinin Ekspresyonu

Rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin ekspresyonu için -80°C'de muhafaza edilen *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-22-6His transformantları zeosinli (200 µg/ml) YPD agara çizilmiş ve 30°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Ardından agar üzerinde gelişen tek kolonilerden bir tane alınmış ve 50 ml'lik BMGY besiyeri ortamına inoküle edildikten sonra 250 rpm'e

ayarlanmış çalkalayıcı inkübatörde 30°C’de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyona OD₆₀₀ değeri 2-6 aralığına ulaşmaya kadar devam edilmiş ve istenilen aralığa ulaşıldığında inkübasyon sonlandırılarak hücreler 3000xg’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz uzaklaştırılmış ve kalan pellet BMMY besiyeri içerisinde OD₆₀₀ değeri 1.0’e eşitleninceye kadar çözündürülmüştür. Daha sonra BMMY kültür ortamı 2 litrelik erlenmayerlere aktarılmış ve erlenmayerlerin ağzı çift katlı steril gazlı bezle kapatılıp 30°C’de 250 rpm’de 96 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sırada ekspresyonu indüklemek için, her 24 saatte bir kültür ortamına %1 oranında metanol (Merck, 106009, ABD) eklenmiştir. 96 saatin sonunda BMMY besiyeri ortamı 4°C’de 12.000xg’de 20 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür ve rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerini içeren kültür süpernatantı steril şişelere aktarılmıştır. Ardından hedef peptidlerin varlığını kontrol etmek için, kültür süpernatantlarından örnek alınmış ve Trisin-SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ve Western Blot analizleri yapılmıştır.

2.2.9.2. Rekombinant Peptidlerin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi

Rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerini içeren kültür süpernatantının olduğu şişeler buz üzerine konularak son konsantrasyonu %60 (w/v) olacak şekilde amonyum sülfat (Merck, 101217, ABD), azar azar eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 500 rpm hızla karıştırılan kültür süpernatantının içerisindeki amonyum sülfat tamamen çözündükten sonra 1 gece boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra süpernatant 4°C’de 25.000xg’de 15 dk santrifüjlenerek rekombinant peptidler çöktürülmüş ve üst faz uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet, ~1-2 ml 1 M fosfat tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Peptid çözeltisi sırasıyla 10 kDa (Ultracel Amicon Ultrafiltrasyon Diski Millipore, PLGC07610, ABD) ve 3 kDa (Ultracel Amicon Ultrafiltrasyon Diskleri; Millipore, PLBC07610, ABD) ultrafiltrasyon filtrelerinden geçirildikten sonra hedef peptidlerin kontrolü için, SDS -PAGE jeline yüklenmiştir.

2.2.10. Rekombinant Peptidlerin Analizi

2.2.10.1. Rekombinant Peptidlerin SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Tez çalışmasında üretilen rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin moleküler ağırlıkları <30 kDa olduğundan Trisin-SDS-PAGE analizi uygulanmıştır

(Schägger, 2006). Rekombinant peptidler %4'lük poliakrilamid yükleme jeline yüklendikten sonra %16'luk ayırma jelinde ayrımı gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.19).

Tablo 2.19. SDS-PAGE örnek yükleme ve ayırma jellerinin bileşimi

Jel içeriği	%16'luk Jel	%4'luk
AB-6 Tamponu	2 ml	1 ml
Jel Tamponu (3X)	2 ml	3 ml
Üre	2.16 gr	-
Ultra Saf Su	2 ml	8 ml
APS(%10)	20 µl	90 µl
TEMED	2 µl	9 µl

SDS-PAGE analizinde kullanılan jelin hazırlanması için jel kalıbına, elektroforez cam plakaları yerleştirilmiştir. İlk olarak yürütme jeli olan %16'luk jel hazırlanarak dökülmüştür. Daha sonra % 100'lük izopropanol eklenerek jelin yüzeyinin düzgün olması sağlanmıştır. Yaklaşık yarım saat beklenerek ilk jel katılaşmış ve jelin yüzeyindeki izopropanol pipetle çekilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra katılaştıran %16'luk yürütme jelinin üzerine, hazırlanan %4'lük yükleme jeli dökülmüş ve jelle tarak yerleştirilerek kuyucuklar oluşturulmuştur. Polimerleşme tamamlandıktan sonra tarak jelden çıkartılmış ve cam plakalar kasete yerleştirilip Mini-PROTEAN® tetracell (Bio-Rad, 1660827EDU, ABD) cihazının tankına konulmuştur. Kasetin cam plakaları arasında kalan iç kısma üst elektrot tamponu (katot tamponu), kasetin dışında kalan kısma ise alt elektrot tamponu (anot tamponu) eklenmiştir. Bu sırada örnekler jelle yüklenmeden önce, trisin örnek buffer (Bio-Rad, 1610739,ABD) ile 1:1 oranında karıştırılmış ve ısıtıcı blokta 95°C'de 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra jelin kuyucuklarına 10-20 µl arasında hazırlanan örneklerden ve 7 µl protein marker'dan (Bio-Rad, 1610377, ABD) yüklenmiştir. Örnekler ayırma jeline geçene kadar (~1 saat) 30V'da, ayırma jeline geçtikten sonra da 200V'da ~90 dk yürütülmüştür. Yürütme tamamlanınca cam plakalar arasındaki jel çıkarılıp % 50 metanol (h/h) ve % 5 asetik asit (h/h) içeren solüsyonda 20 dk bekletilerek sabitlenmiştir. Fiksasyonun ardından jel % 50 (h/h) metanol solüsyonu içerisinde 10 dk bekletilmiştir. Ardından yıkama işlemine geçilmiş ve ultra saf su içerisinde 2 saat bekletilerek yıkanan jel, %0.02'lik (a/h) sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) içerisine alınarak 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel, ultra saf su içerisinde 1 dakika süreyle 2 kez yıkanmıştır. Yıkanan jel taze hazırlanan % 0,1 (a/h)'lik soğuk gümüş nitrat (AgNO_3) ile 20 dakika

muamele edilmiş ve bu sürenin sonunda tekrar saf su ile 1 dakika yıkanmıştır. Ardından jelin içinde bulunduğu kap değiştirilerek son bir kez daha 1 dakika süreyle saf su ile yıkanmıştır. Son aşamada jel, % 0,04 (h/h) formalin ve % 2 (a/h) sodyum karbonat (Na_2CO_3) içeren jel geliştirici (developer) solüsyona alınarak bantlar belirginleşinceye kadar beklenmiş ve ardından % 5 asetik asit (h/h) içeren jel sonlandırma solüsyonuna alınarak gümüş boyama işlemi tamamlanmıştır (Mortz ve ark., 2001).

2.2.10.2. Rekombinant Peptidlerin Western Blot Analizi

SDS-PAGE jelinde molekül ağırlığına göre ayrılan proteinlerin PVDF membrana transferi için ıslak transfer (wet transfer) sistemi (Bio-Rad Protean II sistemi Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Bu amaçla ilk önce PVDF membran %100'lük metanol içerisinde 5 dk bekletilerek aktif hale getirilmiş ardından 1X transfer tamponu (TBS; 192 mM glisin, 25 mM Tris, %15 metanol) içerisine konulmuştur. Aynı şekilde transfer kaseti, pedleri ve filtre kağıtları da transfer tamponun içerisine alınmış, PVDF membran aktifleşene kadar yaklaşık 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra membrana aktarım için kullanılan jel tutucunun, siyah tarafından başlanarak beyaz yüzüne doğru sırasıyla ped, filtre kağıdı, PVDF membran, jel, filtre kağıdı, ped yerleştirilmiştir. Jel membrane üzerine yerleştirilirken hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel tutucu modüle yerleştirildikten sonra elektroforez tankına konulmuştur. Membrana aktarım işlemi, transfer tampon içerisinde 75V'da 30 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra PVDF membran, jelden dikkatlice ayrılmış ve yıkama tamponunda (PBST; 10mM NaHPO_4 , 0.15 M NaCl, %0.05 Tween 20) 5 dk süreyle 2 kez yıkanmıştır. Ardından PVDF membran %3'lük yağsız süt tozu (Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk, Merck, 104239, ABD) içeren yıkama tamponundan (PBST) oluşan bloklama tamponuna alınmış ve 1 saat boyunca karıştırıcıda çalkalanarak bloklanmıştır. Daha sonra PVDF membran, %3'lük yağsız süt tozu içeren PBST içinde 1:20.000 oranında seyreltilmiş HRP Anti-6xHis-tag antikör (Biolegend, 652503, ABD) ile birlikte çalkalanarak bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün yıkama tamponunda 5 dk süreyle 3 kez yıkama işlemi uygulanmış ve daha sonra görüntüleme işlemine geçilmiştir. Bu amaçla yıkamadan sonra PVDF membran, ECL solüsyonuyla (Bio-rad, Western ECL Substrate, 1705061, ABD) muamele edilmiş ve membranın kemilüminesans görüntüsü, (Bio-rad, ChemiDoc Imaging Systems, 17001402, ABD) cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.10.3.Rekombinant Peptidlerin ELISA Testi ile Miktar Tayini

Rekombinant peptidlerin miktar tayininde His-Tag ELISA kiti (GenScript, L00436, ABD) kullanılmıştır. Yarışmalı ELISA metoduna göre çalışan bu kit, His-Tag antikor ile kaplı 96 kuyucuktan oluşan bir plate içermektedir. Analiz His-Tag ELISA kitinde belirtilen talimatlar doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- Miktar tayininde kullanılacak kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için kit içerisindeki 0, 1, 3, 9, 27, 81, 243, 729 ng/ml konsantrasyonlardaki 8 adet standardın her birinden platedeki kuyucuklara 50'şer µl yüklenmiştir.
- Daha sonra her bir peptid numunesinden 50 µl alınarak kuyucuklara yüklenmiştir.
- Kuyucuklardaki standard ve örneklerin üzerine 50 µl Anti-His monoklonal antikor eklenip oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dk bekletilmiştir
- Bekletme süresi sonunda, kuyucuklardaki sıvı dökülüş ve kuyucuklar 260 µl 1X yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanmıştır.
- Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100 µl antikor izleyicisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir.
- Bekletme süresi sonunda, plate içerisindeki sıvı dökülüş ve kuyucuklar 1X yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkanmıştır.
- Yıkanan kuyucuklara 100 µl TMB substrat eklendikten sonra oda sıcaklığında 10-15 dk bekletilmiştir.
- Son aşamada her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonundan eklenmiş ve mikroplaka okuyucu (ThermoScientific, 51119100, İngiltere) kullanılarak örneklerin ve standardın 450 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.
- Standardlara ait absorbans değerleri, kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılmış ve oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak peptid örneklerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.2.10.4. Rekombinant Peptidlerin Agar Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Aktivitelerinin Test Edilmesi

Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant peptidlerin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon metodu ile tespit edilmiştir (Liu vd., 2018). Rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin antimikrobiyal aktivitesi 10 gram-negatif bakteri, 6 gram-pozitif bakteri ve 3 maya suşuna karşı test edilmiştir. Bu amaçla -80°C’de muhafaza edilen bakteri suşları LB agar besiyerine maya suşları ise malt ekstrakt agar (MEA) besiyerine ekilerek 1 gecelik taze kültürler elde edilmiştir. Bakterilerde OD₆₀₀ değeri MRD (Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)) çözeltisi ile 0,2-0,3 olacak şekilde ayarlanmış kültürler kullanılırken, mayalarda 0,5 McFarland’a ayarlanmış hücre kültürleri kullanılmıştır. Ardından OD₆₀₀ değeri ayarlanmış her bir bakteri kültüründen LB agara ve McFarland’ı ayarlanmış herbir maya kültüründen de MEA agara 100 µl karıştırılarak petrilere dökülmüştür. Petride katılan agarda 6 mm çapında delikler açılmış ve deliklere 30 µl rekombinant peptid örneklerinden yüklenmiş ve ardından test bakterilerinin inokule edildiği petrilere 37°C’de maya suşlarının inokule edildiği petrilere ise 35 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Pozitif kontrol olarak 200 µg/ml konsantrasyonda ampisilin (Oxoid, CT0003B, İngiltere) kullanılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda petrilere oluşan zonların çapları ölçülmüş ve zon çapları arasındaki farkın anlamlılığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir (Wang vd., 2015c; Liu vd., 2018).

2.2.10.5. Rekombinant Peptidlerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Analizi

Tez çalışmasında üretilen rekombinant peptidlerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) ölçümünde, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün (CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute) önerdiği sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. MİK değeri olarak, hücre gelişiminin inhibe edildiği en düşük peptid konsantrasyonu dikkate alınmıştır (Liu vd., 2018).

Logaritmik büyüme fazındaki bakteri kültürlerinin (Tablo 2.20) OD₆₀₀ değeri 0,2-0,3’e ayarlanırken, mayaların McFarland değeri 0,5’e ayarlanmış ve bakteri suşları LB sıvı besiyeri ile maya suşları ise malt ekstrakt broth (MEB) sıvı besiyeri kullanılarak 1:100

oranında seyreltilmiştir. Daha sonra bu bakteri veya maya kültürlerinden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu polistiren plate'e inokule edilmiştir. Ardından peptidlerin 1/2'lik seri dilüsyonlarından bakteri veya maya kültürünün bulunduğu kuyucuklara 50 µl ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan kuyucuğa, bakteri ve maya kültürü yerine sırasıyla steril LB broth veya MEB, pozitif kontrol olarak kullanılan kuyucuğa ise rekombinant peptid ilavesi yapılmayan saf bakteri veya maya kültürü eklenmiştir. Test edilen plate'ler bakteriler için 37°C'de, maya şuşları için de 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra plateler, mikropilaka okuyucuya (ThermoScientific, 51119100, İngiltere) yerleştirilmiş ve 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

Tablo 2.20. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan patojen mikroorganizma şuşları

Türler	Suş kodu
Gram-pozitif	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
Metisilin dirençli	ATCC 43300
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	
Gram-negatif	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Enterobacter sakazakii</i>	klirik izolat
<i>Eschericia coli</i>	ATCC 25922
<i>Eschericia coli</i> O157:H7	ATCC 43894
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	klirik izolat
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klirik izolat
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC27729
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 911
<i>Acinetobacter</i>	klirik izolat
Mantar	
<i>Candida. albicans</i>	ATCC 1223
<i>Candida albicans</i>	ATCC90023
<i>Candida galabrata</i>	klirik izolat

2.2.10.6. Rekombinant Peptidler ile Muamele Edilen Bakteri ve Maya Kültürlerinin SEM Görüntü Analizi

Rekombinant peptidlerin SEM görüntülerinin elde edilmesinde test suşu olarak *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *C. albicans* ATCC 10231 kullanılmıştır. SEM görüntü

analizinde kullanılacak *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 suşu 5 ml'lik LB broth'a, *C. albicans* ATCC 10231 suşu ise 5 ml'lik MEB'a inoküle edilmiş ve çalkalayıcı inkübatörde sırasıyla 37°C'de ve 35°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün orta logaritmik fazdaki hücreler 1000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Ardından üst faz uzaklaştırılmış ve hücreler, steril PBS (10 mM) (phosphate-buffered saline, Oxoid, BR0014G, İngiltere) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler, OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde PBS ile süspanse edilmiştir. Bakteri ve maya hücre süspanسیونuna eşit hacimde 1xMIK seviyesinde rekombinant peptid eklenerek 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücre ve peptid karışımı 5000xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Ardından PBS ile 3 kez yıkama yapılmış ve hücreler her seferinde 1000xg'de 5dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Son aşamada toplanan hücreler %2.5 (v/v) glutaraldehit içeren 500 µl'lik PBS içerisinde, bir gece boyunca 4°C'de sabitlenmiştir. Ertesi gün 5000xg' de 5dk santrifüj edilerek toplanan fikse edilmiş hücreler, iki kez de PBS ile yıkandıktan sonra 10'ar dakika boyunca %50'den %100'e kadar değişen 4 farklı etanol konsantrasyonu (%50, %70, %95 ve %100) ile muamele edilerek dehidre edilmişlerdir. Son olarak kurutma işlemi uygulanan bakteri hücrelerine altın kaplama yapılmış ve hücreler, Erciyes Üniversitesi Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM), taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss, Gemini 500, Almanya) altında incelenmiştir (Wang vd., 2015c).

2.2.10.7. Rekombinant Peptidlerin Hemolitik Aktivite Analizi

Rekombinant peptidlerin hemolitik aktivitesi, fare eritrositlerinden hemoglobin salımının spektroskopik ölçümüyle belirlenmiştir. Hemolitik aktivite testinde taze fare eritrositleri kullanılmıştır. Fare kırmızı kan hücreleri, lityum heparinli vakumlu tüplere alınmıştır. Kan hücreleri 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) ile üst fazın rengi berraklaşana kadar yıkanmıştır. Yıkanan eritrositlerden 2 ml alınarak aynı tamponla 50 ml'lik son hacme seyreltilmiştir. Antimikrobiyal peptidin 10 µl hacimde 1/2 seri dilüsyonları (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128), 90 µl %4'lük fare eritrositiyle karıştırılmıştır. Daha sonra da 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakılan hücreler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant kısmı alınarak 96 kuyucuklu polistiren plakelere her kuyucuğa 100µl olacak şekilde aktarılmıştır. Daha sonra, bir mikropilaka okuyucuda (Thermo Fisher Scientific, 51119100, İngiltere) absorbansları ölçülmüş ve %

hemoliz değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Meng vd., 2019). Negatif kontrol (%0 hemoliz) olarak peptid yerine PBS ve pozitif kontrol (%100 hemoliz) olarak da %0.2 Triton-X kullanılmıştır.

$$\text{Hemoliz yüzdesi} = 100 \times \frac{A_{\text{Numune}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{TritonX-100}} - A_{\text{PBS}}}$$

2.2.10.8. Rekombinant Peptidlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın ve Proteazların Etkisi

Rekombinant peptidlerin sıcaklık ve proteaz stabilitelerinin belirlenmesinde agar difüzyon yöntemi uygulanmış ve test suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Peptidlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi, 4°C, 24°C, 65°C veya 95°C olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta 1 saat bekletilerek test edilmiştir. Peptidlerin proteaz stabilitesi ise, 1:1 oranında 2.4≥U/g proteazla (Sigma, P4860-50ml, ABD) 37°C’de 4 saat muamele edilerek belirlenmiştir. Proteaz enzimi 100mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0) içinde çözülmüş ve muameleden sonra 65 °C’de 10 dk ısıl işlem uygulanarak enzimatik reaksiyonlar durdurulmuştur. Farklı sıcaklık dereceleri veya proteaz enzimi ile muamele edilen rekombinant peptidlerin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla test suşu olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922’den 100 µl alınarak 12ml’lik LB agar içeren petrilere dökülmüş ve agarın katılaşması beklenmiştir. Daha sonra katılaşan agardaki 5 mm çapındaki kuyucuklara, test edilecek numuneler, 30µl olacak şekilde yüklenmiştir. Ardından 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakılan petrilerde oluşan zon çapları ölçülmüş ve zon çapları arasındaki farkın anlamlılığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

Tez çalışması kapsamında yüksek antimikrobiyal aktivite ve stabiliteye sahip antimikrobiyal peptid üretimi için motif bazlı bir tasarım stratejisi geliştirilmiş ve bu stratejiye uygun olarak 2 adet peptid dizisi tasarlanmıştır. Tasarlanan peptidlerin rekombinant yöntemle üretimi için, bu peptidleri kodlayan DNA fragmentleri, pPICZαA ekspresyon vektörüne bağlandıktan sonra *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmış ve *P. pastoris* konak hücrelerine tranforme edilmiştir. Daha sonra *P. pastoris* transformantları çalkalamalı kültür ortamında metanol ile indüklenerek rekombinant peptidlerin üretimi gerçekleştirilmiş ve bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri analiz edilmiştir.

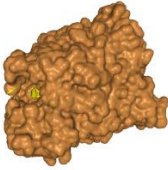
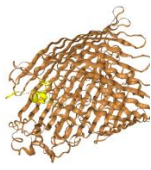
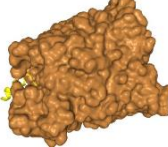
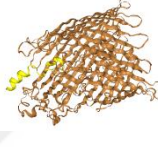
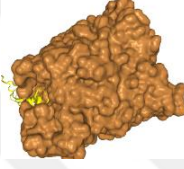
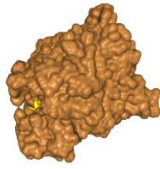
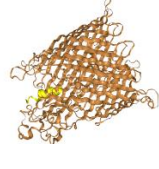
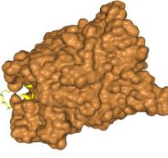
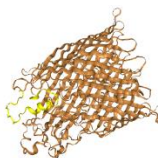
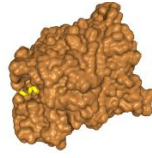
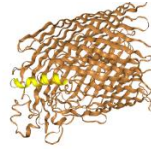
3.1. Tez Çalışmasında Tasarlanan Peptidlerin Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Tez çalışmasında, AMP'lerin *de novo* tasarımında kullanılan data setini oluşturmak üzere DBAASP veri tabanından belirlenen kriterlere uygun olarak seçilen peptidler kullanılmıştır. Seçilen peptid dizilerinin antimikrobiyal aktiviteleri CAMP_{R3} (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) uygulaması ile tahminlenmiş ve antimikrobiyal aktivite skoru ≥ 0.5 olan toplam 135 adet peptid dizisi belirlenmiştir. Daha sonra bu peptidler içerisinde benzerlik oranı $> 80\%$ olanlar CD-HIT (<https://sites.google.com/view/cd-hit>) programı kullanılarak elenmiştir. Geriye kalan 88 adet peptid dizisi MEME Suite 5.5.0 motif bulma aracına yüklenmiş ve motifler istatistiksel olarak önem derecesini tanımlayan E değerlerine göre sıralanmıştır. Daha sonra 11, 12 ve 13 aminoasit uzunluğundaki her bir motif sınıfından en düşük E değerine sahip (istatistiksel olarak en önemli) 5'er adet motif seçilmiştir.

Birbiri ile ilgili DNA veya peptid verisetindeki korunmuş motiflerin tespiti için geliştirilmiş bir motif keşif aracı olan MEME kullanılarak elde edilen motifler (M), M1(X)M2(X)M3(X) başlangıç şablonundaki M pozisyonlarına (M1,...,M15) sırasıyla

yerleştirilmiş ve tüm motiflerin 3'lü kombinasyonlarını içeren peptid sekansları elde edilmiştir. Tasarlanan bu peptid sekanslarındaki joker aminoasit olan (X) yerine K, I, L ve R aminoasitlerinden herhangi biri yerleştirildiğinde toplam 720 adet peptid dizisi elde edilmiştir. Örneğin; 11 aminoasit uzunluğundaki motifler için, 5 adet motif, 3'erli kombinasyonlar halinde başlangıç sekansına yerleştirildiğinde sadece L joker aminoasidi için toplamda 60 adet peptid dizisinden oluşan ve "L11" olarak adlandırılan bir peptid seti elde edilmiştir. Aynı işlem diğer üç joker aminoasit (K, I ve R) için de tekrar edildiğinde "K11", "I11" ve "R11" olarak adlandırılan toplamda 240 peptid dizisi içeren 4 adet peptid seti elde edilmiştir. Daha sonra 12 ve 13 aminoasit uzunluğundaki motifler de başlangıç sekansına yukarıda anlatılan şekilde yerleştirilmiş "L12", "K12", "I12" ve "R12" ile "L13", "K13", "I13" ve "R13" setleri elde edilmiştir. Böylece toplamda 720 peptid dizisi içeren 12 peptid seti elde edilmiştir.

Belirlenen bu 720 adet peptid HeliQuest (hidrofobik moment), PEPTIDE 2.0 (hidrofobiklik), PepCalc (izoelektrik nokta, net yük, suda çözünürlük), ProtParam (kararsızlık indeksi), CAMP_{R3} (antimikrobiyal aktivite), ToxinPred (tosisite), HemoPI (hemolitik aktivite), SOPMA (helisite) biyoinformatik araçları kullanılarak *in siliko* olarak analiz edilmiştir. Analiz edilen peptid setlerinden antimikrobiyal aktivite skoru ≥ 0.5 , hidrofobik aminoasit oranı %30-%50 ve net yükü +2- +9 aralığında olan ve izoelektrik noktası >9 olan 246 peptid seçilmiştir. Seçilen peptidlerin stabilitesi ProtParam aracı ile tahminlenmiş ve en yüksek stabiliteye sahip 4 peptid seti (24 peptid) belirlenmiştir. Bu 4 peptid seti içerisinde de net yükü en yüksek olan peptid seti (L12-3, L12-10, L12-15, L12-22, L12-49, L12-52) seçilmiştir. Bu peptid setindeki 6 peptidin tamamı M6, M7 ve M10 motifleri ve L joker aa kullanılarak elde edildiğinden fizikokimyasal özellikleri de aynı bulunmuştur. Elde edilen bu 6 peptid dizisi içerisinde sOPEP skoru en düşük olan L12-49 (GHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSDLAIKKVAKAAGK) ve L12-22 (GDAIKKVAAGAAGKLHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSCG) kodlu peptidler rekombinant yöntemle üretilmek üzere seçilmiştir (Şekil 3.1). L12-49 ve L12-22 peptidlerinin biyoinformatik araçlar kullanılarak tahminlenen fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktivite değerleri Tablo 3.1, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de verilmiştir.

PEPTİDLER	PEPTİD SEKANSLARI	3D YAPISI	sOPEP skoru	DOCKİNG		DOKİNG skoru
L12-49	GHCRARGRL GGYCLSLN KLSCKLSGLD AIKKVAKAA GK		-64.3806			-352.30
L12-22	GDAIKKVAK AAGKLHCRA RGRGGYCL SLLNKLCKL SG		-61.6268			-311.12
L12-15	GDAIKKVAK AAGKLSLN KLSCKLSGL HCRARGRLG GYC		-57.9078			-272.07
L12-10	GSLNKLCK LSGLHCRAR GRLGGYCLD AIKKVAKAA GK		-57.5619			-232.35
L12-3	GSLNKLCK LSGLDAIKKV AKAAGKLHC RARGRLGGY C		-57.1333			-302.06
L12-52	GHCRARGRL GGYCLDAIK KVAKAAGKL SLLNKLCKL SG		-56.986			-243.89

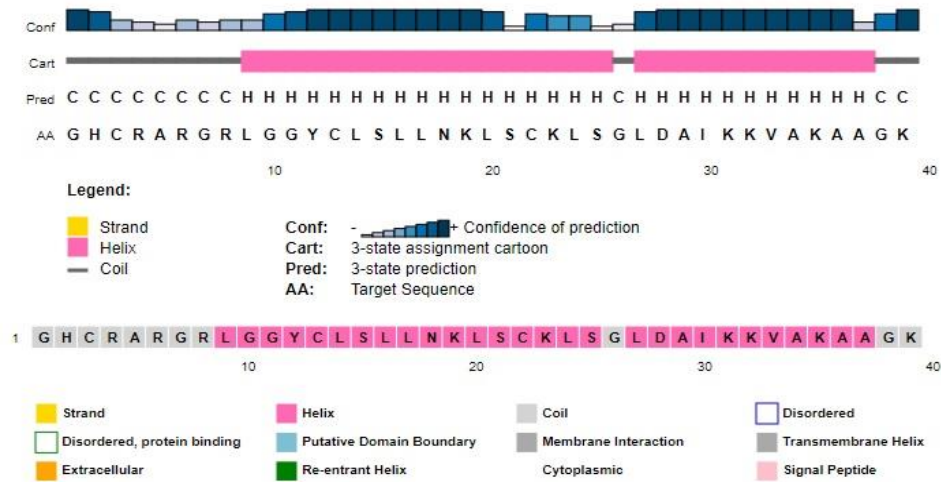
Şekil 3.1. M6, M7 ve M10 motiflerinin peptid içindeki farklı yerleşim pozisyonlarına göre oluşturulan peptidlerin sOPEP ve docking skorları

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin ikincil yapı tahminleri, SOPMA ve PSIPRED 4.0 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SOPMA yapısal analizine göre, L12-49 peptid dizisinin %76.93'sinin α -heliks, %7.69'inin β -tabaka ve %15.38'inin rastgele bobinlerden oluştuğu görülmüştür. L12-22 peptidinin yapısında ise, %66.67 α -heliks, %15.38 β -tabaka ve %12.82 rastgele bobin bölgeleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar her iki peptidde de α -heliks yapının baskın olduğunu göstermiştir.

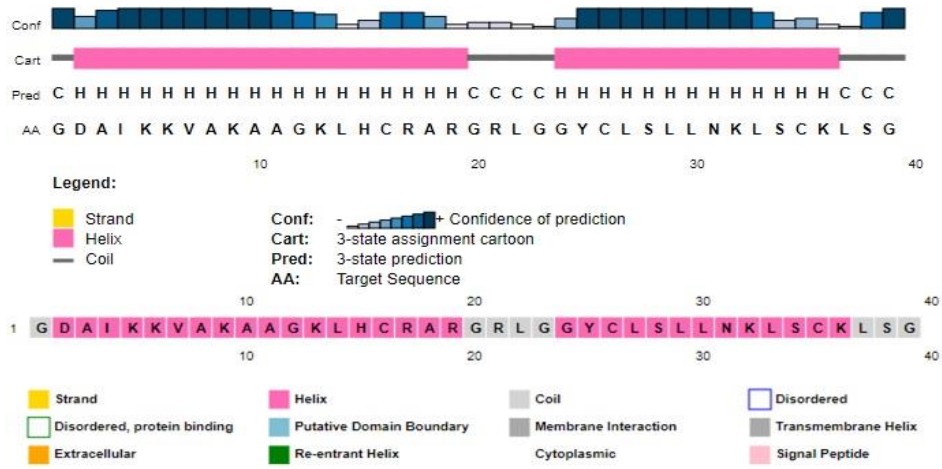
Tablo 3.1. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin SOPMA programı kullanılarak belirlenen ikincil yapı tahmin skorları

Biyoinformatik araç	Parametreler	L12-49	L12-49-6His	L12-22	L12-22-6His
SOPMA	Helisite (α -heliks)	76.93	66.67	66.67	62.22
	Beta dönüş (β -turn)	7.69	11.11	15.38	13.33
	Rastgele bobin (random coil)	15.38	22.22	12.82	24.44

PSIPRED 4.0 programı kullanılarak elde edilen yapı tahmin grafikleri incelendiğinde heliks yapı tahmini yönünden SOPMA ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Buna göre L12-49 peptidinin %72'sini sarmal yapılar, %28'ini ise rastgele bobinler oluştururken, L12-22 peptidi % 79 α -heliks, % 21 rastgele bobin bölgelerinden oluşmaktadır.

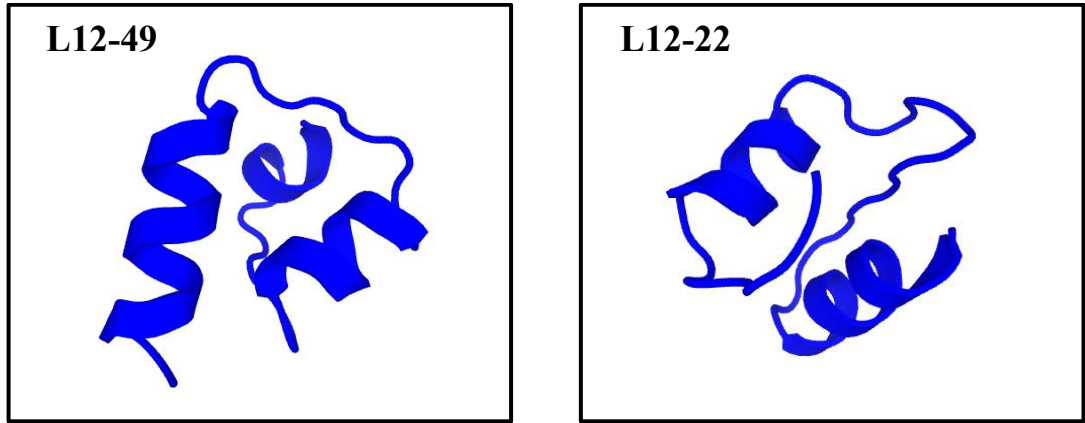


Şekil 3.2. L12-49 peptidinin PSIPRED 4.0 programı ile belirlenen ikincil yapı tahmin grafiği



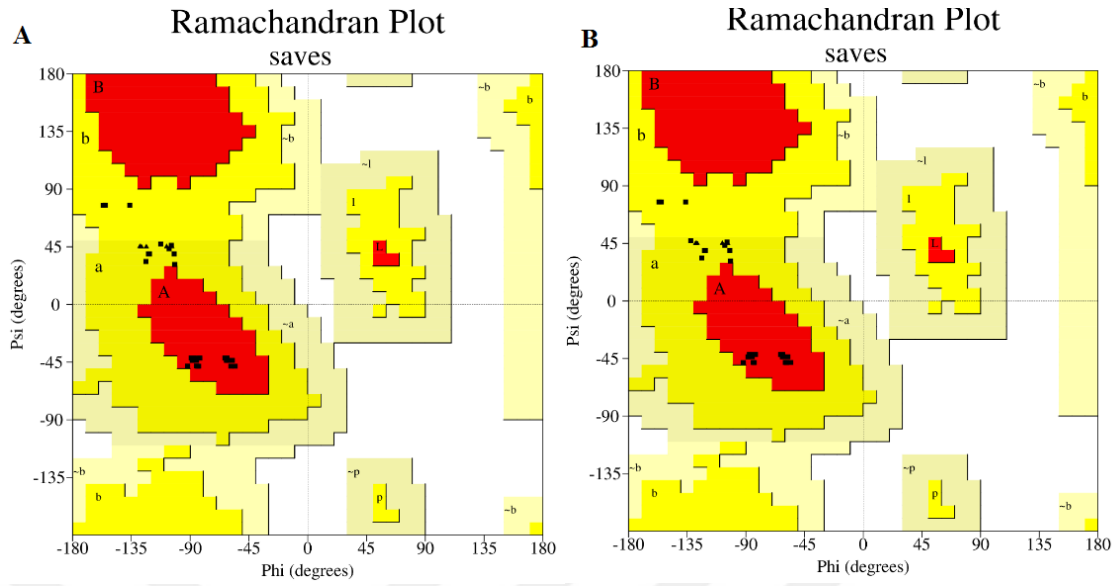
Şekil 3.3. L12-22 peptidinin PSIPRED 4.0 programı ile belirlenen ikincil yapı tahmin grafiği

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin üç boyutlu (3D) yapıları, *de novo* peptid yapılarının belirlenmesinde kullanılan çevrimiçi bir araç olan Pep-FOLD3 programı ile tahminlenmiştir (Şekil 3.4). Bu peptid setindeki 6 peptidin tamamının fizikokimyasal özellikleri aynı bulunmuştur. Dolayısıyla, Pep-FOLD3 sunucusundan elde edilen T_m ve sOPEP skorları bir seçim kriteri olarak kullanılmıştır. T_m puanı, iki yapı arasındaki benzerliğin bir ölçüsüdür; 0 ile 1 arasında bir değer alır. Burada 1, iki yapı arasındaki mükemmel bir eşleşme olduğunu gösterir. Pep-FOLD3, kullanılarak elde edilen modeller sOPEP enerji değerine göre kümelenir. sOPEP (en düşük optimize edilmiş potansiyel enerji modeli) skoru, tahmin edilen modellerin doğruluğunu gösteren bir değerdir ve en düşük sOPEP enerji değeri, en yüksek T_m değerine karşılık gelir. Pep-FOLD3 kullanılarak elde edilen modellerden doğruluğu en yüksek modeller en düşük sOPEP skoruna sahip modellerdir. Bu tez çalışmasında M6, M7 ve M10 motifleri ile L joker aa kullanılarak elde edilen 6 farklı peptid, sOPEP değerlerine göre sıralanmıştır. Bu peptidler içerisinde L12-49 ve L12-22'nin en düşük sOPEP skorlarına (sırasıyla -64.3806 ve -61.6268) sahip peptidler olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.5).



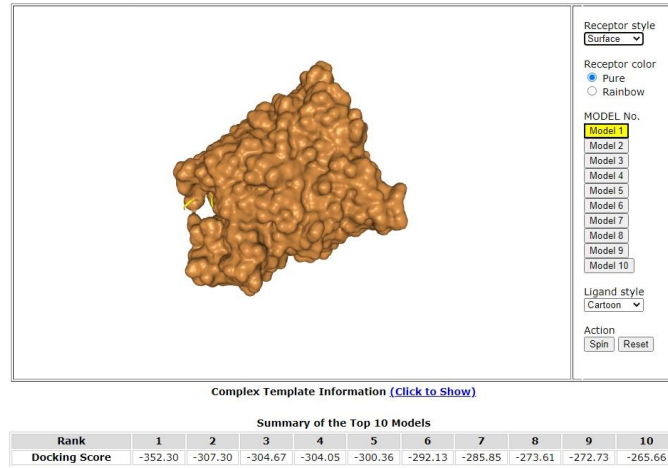
Şekil 3.4. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin 3D yapıları (Pep-FOLD3)

Peptidlerin üç boyutlu yapılarının doğrulanmasında Ramachandran grafiği kullanılmıştır. Ramachandran grafiğindeki Psi ve Phi açıları sayesinde olası ve olası olmayan ikincil yapılar tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada tasarlanan peptidlerin PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) web aracı kullanılarak elde edilen Ramachandran grafikleri incelendiğinde; L12-49 ve L12-22 peptidlerinin her ikisinde de Phi ve Psi değerlerinin beklenen alanlar içinde olduğu görülmektedir. L12-49 peptidi için, “en çok tercih edilen bölgelerde” kalıntıların %59.4’ü ve “izin verilen bölgelerde” ise kalıntıların %40.6’sı bulunurken; L12-22 peptidinde ise, “en çok tercih edilen bölgelerde” kalıntıların %60.6’sı, “izin verilen bölgelerde” ise kalıntıların %39.4’ü bulunmuştur. Her iki peptidde de izin verilmeyen bölgelerde kalıntı bulunmamıştır. Buna göre heliks yapıların tamamının sağ-el heliks yapıda oldukları, β -tabaka yapıların ise bulunmadığı görülmüştür (Şekil 3.5). Bu sonuçlar PSIPRED 4.0 programı kullanılarak elde edilen ikincil yapı tahmin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

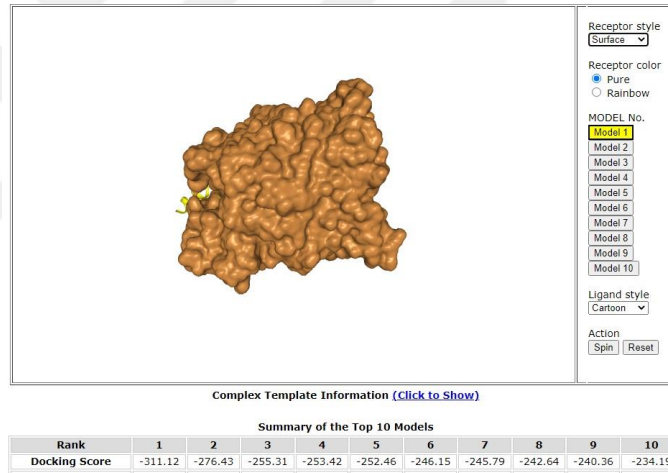


Şekil 3.5. Peptidlerinin tahmin edilen üç boyutlu yapılarına ait Ramachandran grafiği (PROCHECK). A: L12-49 peptidi, B: L12-22 peptidi. Kırmızı alanlar: tercih edilen bölgeler; koyu sarı alanlar: izin verilen bölgeler

Bu tez çalışması kapsamında L12-22 ve L12-49 peptidlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin anlaşılabilmesi için protein-peptid etkileşimlerini tahmin eden bir moleküler docking yazılım aracı kullanılmıştır. Bu aracın çalışma prensibi, protein ve reseptör yüzeyindeki bağlanma yerlerini tahmin etmeye, peptid yapısını hedef bağlanma bölgesiyle eşleştirmek için esnek bir yerleştirme yönteminin kullanılmasına ve en iyi yerleşim skorlarının belirlenmesine dayanmaktadır. HDock (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hdock/>) moleküler yerleştirmede kullanılan bir programdır. Tasarlanan peptidlerin *E. coli*'ye ait bir membran proteini olan *FhuA* proteini (pdb kodu:1BY3) ile etkileşim skorları HDock yerleştirme aracında belirlenmiş ve L12-49 peptidi için -352.30, L12-22 peptidi için ise -311.12 olarak bulunmuştur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Sonuçlar her iki peptidin de *E.coli*'ye ait *FhuA* proteini ile etkileşime girdiğini göstermektedir.

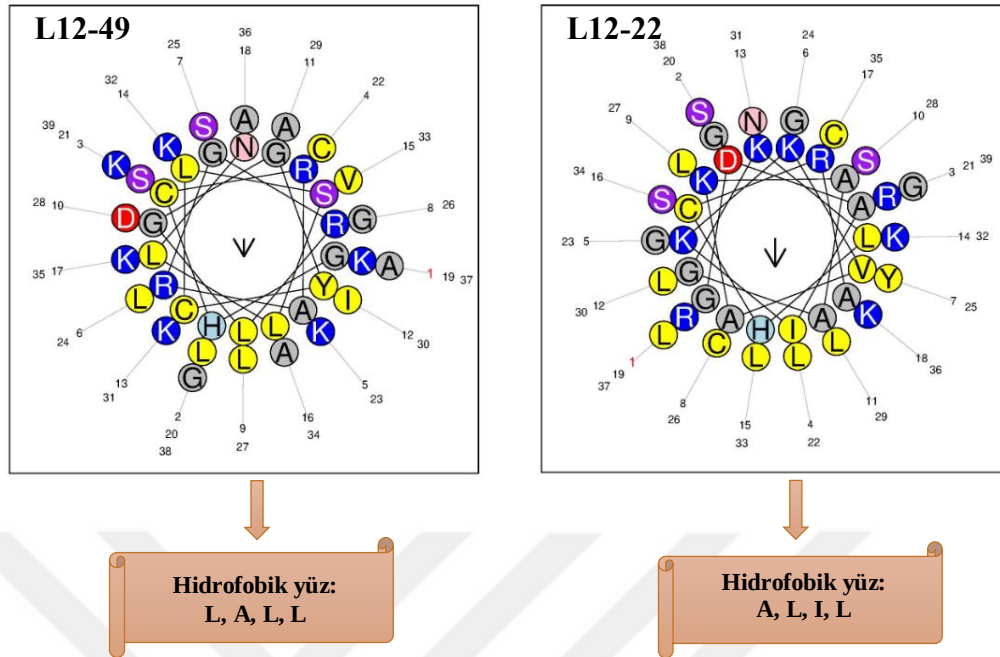


Şekil 3.6. L12-49 peptidi ile *E.coli* membran proteini *FhuA*'nın docking görseli. Sarı renkli kısım: Rekombinant peptid, Kahverengi renkli kısım: *E.coli* bakterisine ait *FhuA* proteini (HDOCK).



Şekil 3.7. L12-22 peptidi ile *E.coli* membran proteini *FhuA*'nın docking görseli. Sarı renkli kısım: Rekombinant peptid, Kahverengi renkli kısım: *E.coli* bakterisine ait *FhuA* proteini (HDOCK).

Tasarlanan L12-22 ve L12-49 peptidlerindeki hidrofobik yüzlerin sarmal çark modelinde gösterimi için HeliQuest (<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) programı kullanılmıştır (Şekil 3.8). HeliQuest bir sarmalın amfipatik karakterini analiz ederek sarmalın hidrofobik ve hidrofilik yüzlerindeki polar ve apolar kalıntıların ayrımını yapabilmektedir. Burada L12-22 ve L12-49 peptidlerinin her ikisi için de sarmal çark üzerindeki hidrofobik yüzlerin, dört hidrofobik kalıntı ile karakterize edildiği görülmüştür.



Şekil 3.8. L12-49 ve L12-22 peptidlerine ait sarmal çark modelleri. Mavi daireler: katyonik kalıntıları, sarı daireler: hidroforik kalıntıları, okun yönü: hidroforik momentin (μH) yönünü gösterir.

Peptidlerin membrane-litik etki gösterebilmesi için, suda çözünmesini sağlayacak kadar düşük hidroforikliğe, diğer taraftan hedef hücre membranının lipid çift tabakasının hidroforik bölgesi ile etkileşime girebilecek kadar da yüksek hidroforikliğe sahip olması gerekmektedir. Peptidin hidroforikliği arttırıldığında, fosfolipid membranlarla etkileşimi kolaylaşacağından antimikrobiyal aktivitesinde de artış beklenmektedir. Bununla birlikte yüksek oranda ($\geq 50\%$) hidroforik aminoasit içeren peptidlerin sulu çözeltilerde genellikle kısmen çözündüğü bilinmektedir. Öyleki hidroforiklik belirli bir değeri aştığında, sulu ortamda bulunan peptidler hedef hücresel yapılar yerine kendi kendine birleşeceğinden antimikrobiyal aktivite de düşecektir. Ancak AMP'ler aktivite gösterebilmeleri için sulu fazdan lipid membranlara geçmeleri gerektiğinden, her iki ortamda da çözünür olmaları beklenmektedir. Dolayısıyla, AMP'ler için hidroforikliğin kritik bir değere sahip olduğu ve aktiviteyi direkt olarak etkilediği bildirilmektedir. AMP'lerdeki hidroforik aminoasit oranının genellikle $30\%-50\%$ arasında olduğu bildirilmiştir. Tez çalışması kapsamında tasarlanan L12-49 ve L12-22 peptidlerin her ikisinin de hidroforisite değeri PEPTIDE 2.0 programı (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php) ile $35,9$ olarak hesaplanmıştır. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin C-terminaline 6XHis etiketi

eklenerek elde edilen L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerinin hidrofobisite değeri ise %31,1 olarak bulunmuştur (Tablo 3.2.).

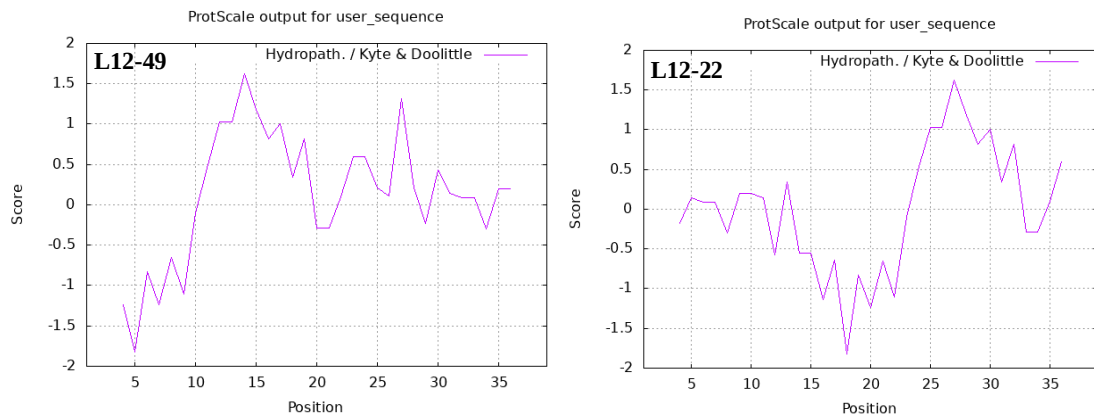
Peptidlerin çözünürlüğü, deneysel çalışmaların başarısını etkileyen kritik bir adımdır. Tasarlanan peptidlerin Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) programı ile çözünürlük değerleri tahminlenmiştir. Bu programa göre; çözünürlük değeri >0,45 olan proteinlerin, çözünürlüklerinin yüksek; <0,45 olan proteinlerin ise çözünürlüklerinin düşük oldukları kabul edilmektedir. Buna göre L12-49 ve L12-22 peptidlerinin her ikisi için de çözünürlük değeri, Protein-Sol programı ile 0,763 olarak tahminlenmiş, peptidlerin C-terminaline 6XHis etiketi eklendiğinde ise bu değer 0,735'e düşmüştür.

Tablo 3.2. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin biyoinformatik araçlar kullanılarak tahminlenen fizikokimyasal özellikleri

Biyoinformatik araçlar	Fizikokimyasal Özellikler	Peptidler			
		L12-49	L12-49-6His	L12-22	L12-22-6His
PepCalc Protein-Sol	Moleküler ağırlık	4057.87 g/mol	4880.7 g/mol	4057.87 g/mol	4880.7 g/mol
	Net yük	7.9	8.5	7.9	8.5
	İzoelektrik nokta	10.71	10.71	10.71	10.71
PEPTIDE 2.0 HeliQuest	Suda çözünürlük	0.763	0.735	0.763	0.735
	Hidrofobisite	%35,9	%31,1	%35,9	%31,1
	Hidrofobik moment	0.184	0.161	0.303	0.264
ProtParam	Alifatik indeksi	100.26	86.89	100.26	86.89
	GRAVY	-0.036	-0.458	-0.036	-0.458
	Kararsızlık indeksi	Stabil (17.04)	Stabil(16.10)	Stabil(14.86)	Stabil(14.21)
APD3	Boman indeksi	1.19 kcal/mol	1.65 kcal/mol	1.19 kcal/mol	1.65 kcal/mol

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin hidrofobik bölgelerini tespit etmek için ExPASy-ProtScale aracı (<http://web.expasy.org/protscale>) kullanılarak Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiği oluşturulmuştur. Kyte-Doolittle grafiğinde her aminoaside, -4.5 ile 4.5 arasında değişen bir hidrofobiklik puanı (4,5= en hidrofobik, -4,5= en hidrofilik) verilmekte olup,

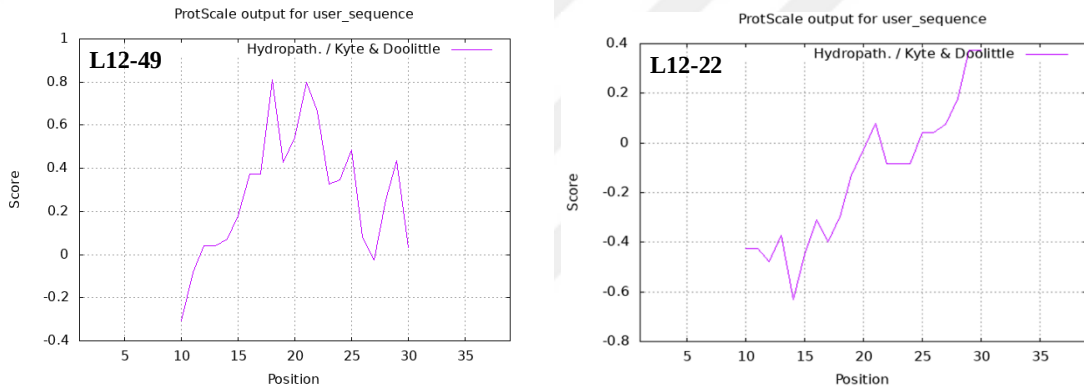
“0” eşiğinin üzerindeki bölgeler hidrofobik karaktere sahip aminoasitlerin bulunduğu bölgelerdir. Tepe noktaları hidrofobikliğin yüksek olduğu bölgeleri göstermektedir. Tepe noktası ne kadar yüksek olursa, bölgenin hidrofobikliği de o kadar yüksek olmaktadır. L12-49 peptidinin ProtScale aracında 7 aminoasitlik bir pencere boyutu kullanılarak elde edilen Kyte-Doolittle grafiği Şekil 3.9.’de gösterilmiştir. ProtScale hidrofobiklik sonuçlarına göre, 14. konumda bulunan L aminoasidinin 1.629 puanla en hidrofobik, 5. konumda bulunan A ise -1.829 puanla en hidrofilik aminoasit olarak belirlenmiştir. L12-22 peptidinin ProtScale tarafından oluşturulan hidrofobiklik grafiği incelendiğinde de yine benzer şekilde, en hidrofobik aminoasidin 1.629 puanla 27. konumdaki L, en hidrofilik aminoasidin ise -1.829 puanla 18. konumdaki A olduğu gözlenmiştir. Peptid dizilerinin pozitif yüklü N-terminal alanı ile birlikte hidrofobik C-terminal alanına da sahip olması, biyo-aktivite için oldukça önemli görülmektedir. L12-22 peptidinde, pozitif yüklü aminoasitlerin N-terminalde ve hidrofobik aminoasitlerin de C-terminalde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Her iki peptid dizisini oluşturan motifler aynı olsa da peptid içerisindeki konumlarının farklı olması, hidrofobik bölgelerin farklı şekilde dağılmasına yol açmıştır. Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiğine göre; L12-49 peptidinde merkez konumda, L12-22 peptidinde ise C-terminalde gözlenen yüksek hidrofobikliğin “SLLNKLCKLSG” motifinden, kaynaklandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.9. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin hidrofobikliğini gösteren Kyte-Doolittle grafiği. X eksen, aminoasit dizisi konumlarını; Y eksen, hidrofobiklik skorunu göstermektedir.

Kyte-Doolittle hidropatiklik indeksi, protein içinde bulunan potansiyel transmembran bölgelerin tahminlenmesinde de kullanılmaktadır. Kyte-Doolittle grafiğindeki en yüksek

tepe noktalarına sahip bölgeler, transmembran alanları olarak tanımlanmaktadır. Transmembran bölgelerini bulabilmek için daha büyük bir pencere boyutu kullanılmıştır. ProtScale aracında pencere boyutu 9 seçilerek oluşturulan Kyte-Doolittle grafiği (Şekil 3.10) incelendiğinde, L12-49 peptidinde 0'ın üzerinde skora sahip toplamda dört tepe noktası tespit edilmiştir. Özellikle 15-20 aminoasitler arasında en yüksek skora sahip iki pikin bulunduğu gözlenmiştir. İlk pikin tepe noktasının aynı zamanda peptidin en hidrofobik noktasına karşılık geldiği, ancak ikinci pikin tabanının da ilk pikten daha geniş olduğu dolayısıyla ilk pike göre daha fazla aminoasit içerdiği belirlenmiştir. L12-22 peptidinde ise transmembran bölgeler 25-35 aminoasitler arasında olup peptidin C-terminal pozisyonunda bulunmaktadır.



Şekil 3.10. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin transmembrane bölgelerini gösteren Kyte-Doolittle grafiği. X eksen, aminoasit dizisi konumlarını; Y eksen, hidrofobiklik skorunu göstermektedir.

Peptidlerin hidrofobiklik değerini belirlemek için kullanılan bir diğer yöntem de, ortalama hidropatiklik indeksinin (GRAVY) hesaplanmasıdır. GRAVY değeri, peptid dizisindeki tüm aminoasitlerin hidropati değerleri toplamının, peptid dizi uzunluğuna bölünmesiyle elde edilmektedir. Bir peptidin pozitif GRAVY değerleri hidrofobik olduğunu, negatif GRAVY değerleri ise hidrofilik olduğunu göstermektedir. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin her ikisinin de GRAVY değerleri -0,036 olarak hesaplanmış olup L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerinde bu değer -0,458'e düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan peptidlerin hidrofilik karakterde olduğunu göstermiştir.

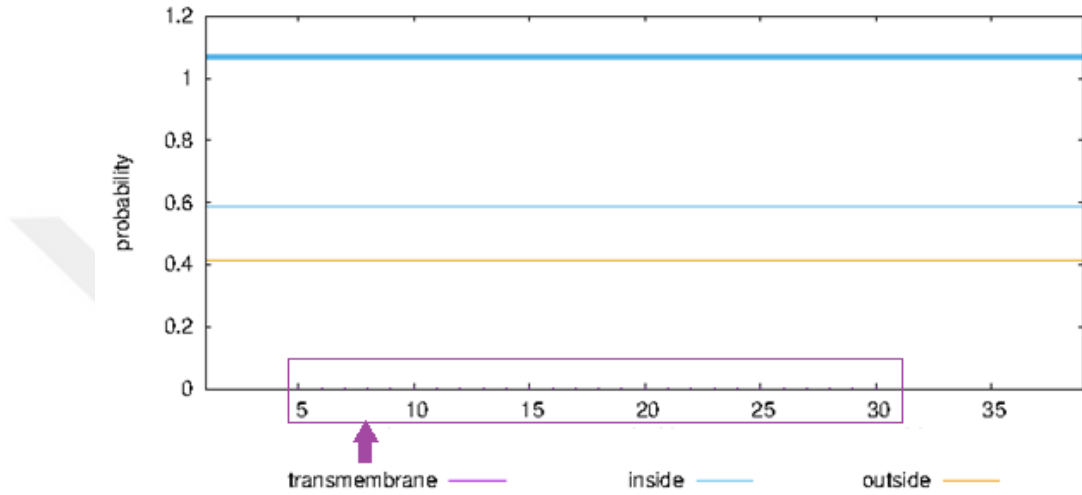
Peptidlerin transmembran bölgelerini tahminlemede kullanılan başka bir araç da TransMembrane Hidden Markov Model (TMHMM) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

TMHMM/) web sunucusudur. TMHMM, ayrıntılı transmembran bölge tahminleri yapan ve grafiklerini oluşturan daha gelişmiş bir uygulamadır. TMHMM, bir peptidin negatif yüklü bakteri hücre zarlarına bağlanma olasılığını analiz etmektedir. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin TMHMM aracı kullanılarak oluşturulan hücresel lokalizasyon tahminleri sırasıyla Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir. TMHMM, proteinlerde bulunan transmembran bölgeleri veya transmembran helikslerini tahminlemek için kullanılan bir biyoinformatik araçtır.

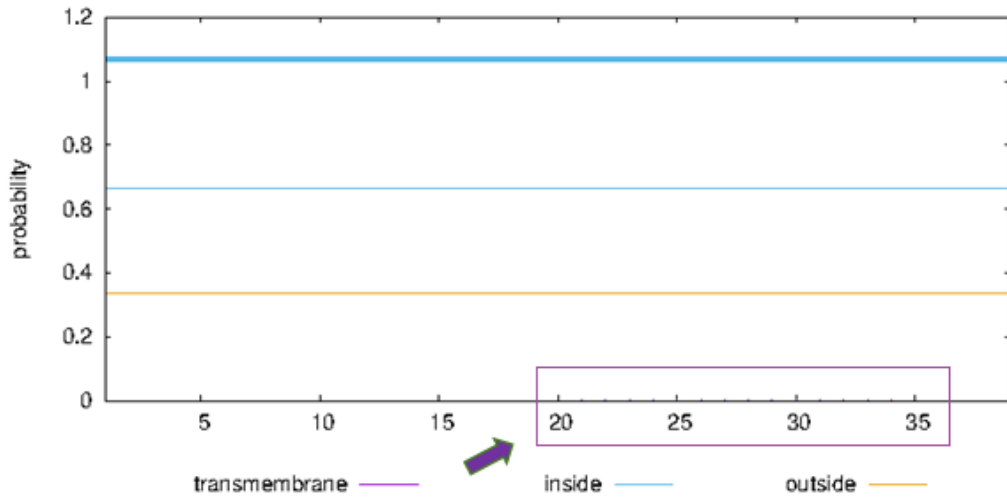
Proteinlerin transmembran bölgeleri, hücre zarını geçen ve lipid çift tabakasına yerleşen helikal yapılar olarak bilinir. TMHMM, hücre zarına gömülü veya tamamen hücre zarından geçen transmembran bölgelerin yerini ve sayısını tahmin etmek için geliştirilmiş bir modeldir. “Transmembran sarmal” terimi, proteinlerin hücre zarına giren helikal bölgelerini ifade etmek için kullanılır. Bu sarmallar, bir tarafı hücre içinde, diğer tarafı ise hücre dışında olacak şekilde hücre zarı ile etkileşime giren yapılar olarak tanımlanır. Bu helikal bölgeler, proteinin hücre zarına gömülmesini sağlar ve çeşitli biyolojik fonksiyonlar kazandırır.

TMHMM grafikleri, hedef protein içindeki olası transmembran bölgelerini göstermektedir. Grafiklerdeki mavi çizgiler, proteinin zarın içindeki bölgelerinin, sarı çizgiler ise zarın dışındaki bölgelerinin oranını göstermektedir. Mor renkle dikdörtgen içine aldığımız alan ise transmembran bölgelerdir. TMHMM web aracı ile N-terminal bölgenin zarın sitoplazma tarafında olma olasılığı L12-49 peptidi için 0.58763, L12-22 0.66541 peptidi için de olarak tahminlenmiştir. Dolayısıyla L12-49 ve L12-22 peptidinin transmembran özellik gösterdiği TMHMM 2.0 web aracı tarafından doğrulanmıştır. TMHMM 2.0 web aracına göre L12-49 peptidinin 5-30 aminoasitler, L12-22 peptidinde ise 20-35 aminoasitler arasındaki bölgeler transmembran bölgeleri göstermektedir. ExPASy-ProtScale programıyla elde edilen Kyte-Doolittle grafiğinde ise L12-49 peptidinin 15-30 aminoasitler L12-22 peptidinin de 25-35 aminoasitler arasındaki bölge transmembrane bölgeler olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla her iki peptid için de TMHMM ile tahmin edilen transmembran bölgelerin ProtScale aracı ile tahmin edilen transmembran bölgeler ile büyük oranda paralellik gösterdiği gözlenmiştir.

Ayrıca TMHMM web aracı ile transmembran sarmallarda bulunan aminoasit sayısı da tahminlenebilmektedir. Buna göre transmembran sarmallarda bulunan aminoasit sayısı L12-49 peptidi için 0.01244, L12-22 peptidi için ise 0.00239 olarak tahminlenmiştir. Dolayısıyla her iki peptidin de transmembran sarmal özellik göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 3.11. L12-49 peptidinin hücresel lokalizasyon tahmini (TMHMM)



Şekil 3.12. L12-22 peptidinin hücresel lokalizasyon tahmini (TMHMM).

Boman indeksi, bir peptid dizisindeki tüm aminoasitlerin çözünürlük değerlerinin toplamıdır. Yüksek bir Boman indeksi (>2.48), peptidin diğer proteinler ile yüksek bağlanma potansiyelini (ör. hormonlar) gösterirken, düşük bir Boman indeksi (≤ 1) düşük

bağlanma potansiyeli ve dolayısıyla düşük toksisiteye işaret etmektedir. L12-49 ve L12-22 peptidlerinin Boman indeksi her iki peptid için de 1.19 kcal/mol olarak hesaplanmış olup peptidlerin C-terminaline eklenen 6XHis etiketi Boman indeksini 1.65 kcal/mol'e yükseltmiştir. Dolayısıyla tasarlanan peptidlerin Boman indeksi orta bir değerde bulunmuştur.

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin hemolitiklik aktivite skorları HemoPI sunucusu kullanılarak belirlenmiştir. HemoPI sunucusu peptidlerin hemolitik aktivitelerini 0 ile 1 arasında değişen bir değerle skorlandırmaktadır. Burada, 1, peptidin hemolitik olma olasılığının yüksek olduğunu, 0 ise, hemolitik olmadığını göstermektedir. Buna göre L12-49 ve L12-22 peptidlerinin her ikisi için de hemolitiklik aktivite skoru 0.48 olarak tahminlenirken, L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerinde bu skor 0.47 olarak belirlenmiştir. Ayrıca peptidlerin toksiditesi ToxinPred web sunucusu ile de tahminlenmiş ve her iki peptid de toksik bulunmamıştır.

Peptidlerin kararsızlık ve alifatik indeksi, peptid stabilite tahmininde kullanılan fizikokimyasal özelliklerdir. ProtParam programı kullanılarak elde edilen kararsızlık indeksi 40'ın altında olan peptidlerin kararlı, 40'ın üzerinde olanların ise kararsız olduğunu göstermektedir. Buna göre L12-49 ve L12-22 peptidlerinin kararsızlık indeksi sırasıyla 17.04 ve 14.86 olarak belirlenmiştir. Tasarlanan L12-49 ve L12-22 peptidlerinin C terminaline 6xHis etiketinin eklenmesi durumunda kararsızlık indeksi sırasıyla 16.10 ve 14.21 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre her iki peptidin de stabilitesinin yüksek olduğu tahmin edilmiştir.

Bir proteinin alifatik indeksi, alifatik yan zincirlerin (alanin, valin, izölösün ve lösin) kapladığı nispi hacimdir. Bu indeks sayesinde peptidlerin ısıl stabiliteleri tahminlenebilmektedir. Buna göre daha yüksek bir alifatik indeks, yüksek bir ısıl stabiliteyle ilişkilendirilmiştir. L12-22 ve L12-49 peptidlerinin her ikisinin de alifatik indeksleri 100.26 olarak hesaplanmış olup, C-terminaline 6XHis etiketinin eklenmesiyle elde edilen L12-22-6His ve L12-49-6His peptidlerinde ise alifatik indeksin 86.89'a düştüğü bulunmuştur. Bu değerlere göre tasarlanan peptidlerin termostabilitelerinin yüksek olduğu tahmin edilmiştir (Tablo 3.3).

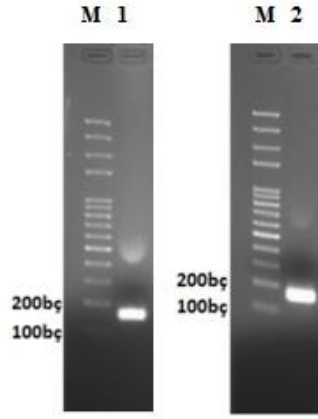
Tablo 3.3. Tasarlanan peptidlerinin in siliko olarak tahminlenen biyolojik aktivite sonuçları

Peptidler	Hemoliz(%)	Toksisite	Farklı Hücre Ortamlarındaki Yarılanma Ömrü			Antimikrobiyal Aktivite	
			<i>E.coli</i>	Maya	Memeli(h)	tahmin	olasılık
L12-49	0.48	Toksin değil	>10h	>20h	30	AMP	0.959
L12-49-6His	0.47	Toksin değil	>10h	>20h	30	AMP	0.785
L12-22	0.48	Toksin değil	>10h	>20h	30	AMP	0.989
L12-22-6His	0.47	Toksin değil	>10h	>20h	30	AMP	0.926
Referans aralığı	>0.5:hemolitik <0.5:hemolitik değil	-		-		>0.5:yüksek olasılık <0.5:düşük olasılık	

3.2. L12-49-6His ve L12-22-6His Peptidlerinin Üretimi

3.2.1. L12-49-6His ve L12-22-6His Peptidlerini Kodlayan DNA Dizilerinin Üretimi ve Kontrolü

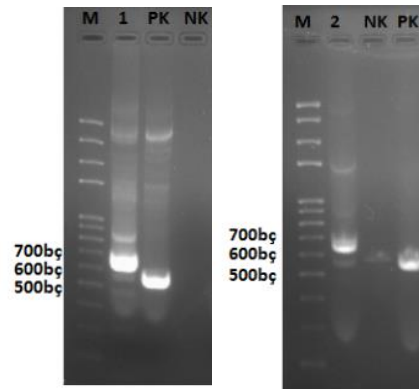
L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerinin rekürsif PCR yöntemi ile üretimi için orta kısmında 15 bç'lik bir bölgeden birbirini tamamlayan 88-87 bç uzunluğundaki 2 adet sentetik oligonükleotid kullanılmıştır. Rekürsif PCR ile birbirine birleşen oligonükleotidlerin amplifikasyonu sonucunda oluşan 160 bç uzunluğundaki PCR ürünleri, ticari saflaştırma kitiyle saflaştırıldıktan sonra saflaştırma ürünleri, %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jelde L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerine ait PCR ürünleri görüntülenmiş ve her ikisinin de 160 bç uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. rPCR ile elde edilen hedef gen bölgelerinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 1: L12-49-6His; 2: L12-22-6His

3.3. Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

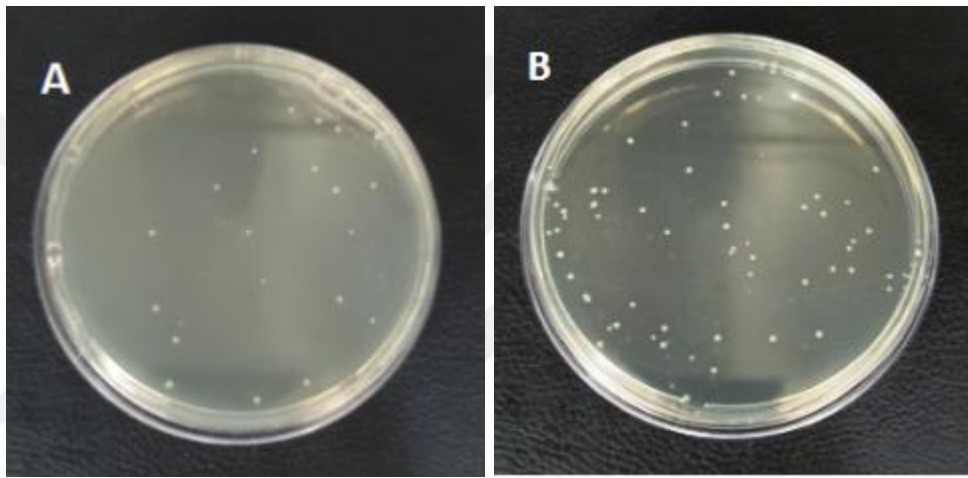
L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentleri ve pPICZαA vektörü, *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve yapışkan uçlar elde edilmiştir. Daha sonra hedef DNA fragmentleri pPICZαA vektörüne bağlanmıştır. L12-49 ve L12-22 peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerini içeren rekombinant plazmidler sırasıyla pPICZαA-L12-49-6His ve pPICZαA-L12-22-6His olarak adlandırılmıştır. Ligasyonun kontrolü, AOX (5'AOX1 ve 3'AOX1) primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizi ile yapılmış ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde yürütülmesiyle pPICZαA-L12-49-6His ve pPICZαA-L12-22-6His DNA'larına ait PCR ürünlerinin boyutunun 693 bp olduğu görülmüştür (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Ligasyonun kontrolü 1: pPICZαA-L12-49-6His plazmidinin AOX primerleri ile üretilen PCR ürünü, 2: pPICZαA- L12-22-6His plazmidinin AOX primerleri ile üretilen PCR ürünü, M: Marker, PK: Boş pPICZαA vektörü.

3.4. Rekombinant Plazmidlerin *E. coli* DH5 α Hücrelerinde Klonlanması

Rekombinant pPICZ α A-L12-49-6His ve pPICZ α A-L12-22-6His plazmidleri *E. coli* DH5 α kompetent hücrelerinde klonlanmıştır. pPICZ α A vektörü sayesinde zeosine direnç kazanan *E. coli* DH5 α klonlarının, zeosinli LB agar besiyerindeki gelişimleri mümkün olmuştur. Dolayısıyla pPICZ α A-L12-49-6His ve pPICZ α A-L12-22-6His rekombinant plazmidlerini içeren pozitif *E. coli* DH5 α klonlarının 200ul zeosinli LB agar besiyerinde geliştiği ve çok sayıda koloni oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 3.15).

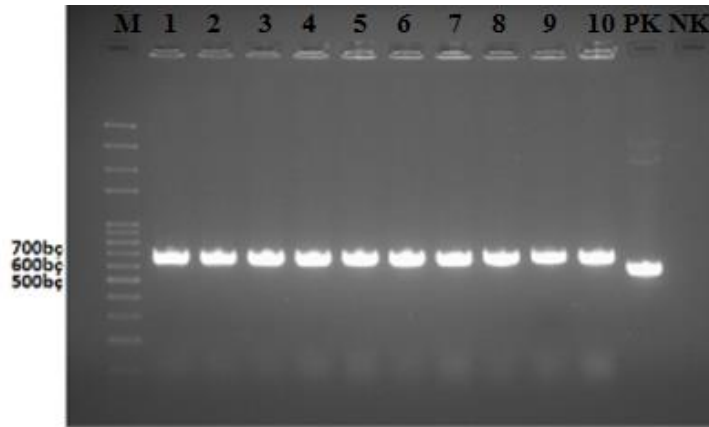


Şekil 3.15. Rekombinant plazmidleri içeren *E.coli* DH5 α klonları. A: pPICZ α A-L12-49-6His plazmidini içeren *E.coli* DH5 α klonları B: pPICZ α A-L12-22-6His plazmidini içeren *E.coli* DH5 α klonları

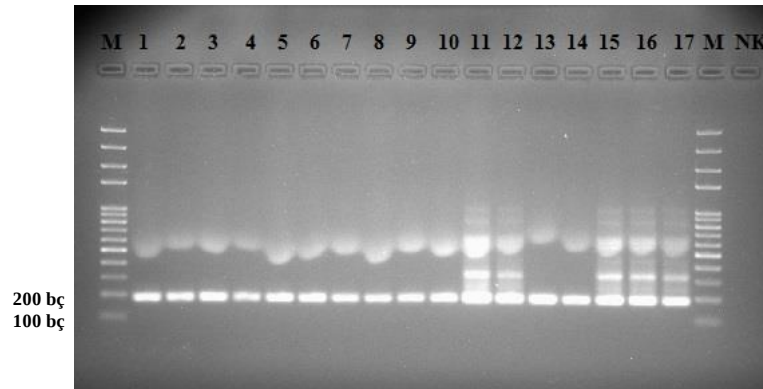
3.5. Pozitif *E. coli* DH5 α Klonlarının Doğrulanması

Zeosinli LB agar besiyerinde gelişen kolonilerin hedef DNA fragmentlerini içerip içermediklerini belirlemek için, rastgele 5'er adet koloni seçilmiş ve plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Pozitif *E. coli* DH5 α klonlarından izole edilen pPICZ α A-L12-49-6His ve pPICZ α A-L12-22-6His plazmid DNA'ları, AOX bölgesini hedef alan 5'AOX1/3'AOX1 primerler ile amplifiye edilmiştir. Her iki grup plazmid DNA'ya ait PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve 693 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri gözlenmiştir (Şekil 3.16). İçerisinde hedef DNA fragmentlerini taşımayan boş pPICZ α A vektörünün ise yaklaşık 538 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. Plazmid DNA'ların L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentlerini içerip

içermediğini kontrol etmek için de bu DNA fragmentlerini hedef alan GPF/GPR primerleri ile plazmid DNA'lar amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 186 bç uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri görüntülenmiştir (Şekil 3.17). Dolayısıyla analiz edilen *E. coli* DH5α klonlarının tamamının pPICZαA vektörünü ve vektöre bağlanmış hedef DNA fragmentlerini içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.16. *E. coli* DH5α klonlarından izole edilen plazmid DNA'ların 5'AOX1 /3'AOX1 primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri. M: Marker, 1-5: pPICZαA-L12-49-6His plazmidlerinin 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, 6-10: pPICZαA-L12-22-6His plazmidlerinin 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, PK: pPICZαA vektörünün 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünü, NK: Negatif kontrol.



Şekil 3.17. *E. coli* DH5α klonlarından izole edilen plazmid DNA'larının GPF/GPR primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri 1-9: pPICZαA-L12-49-6His plazmid

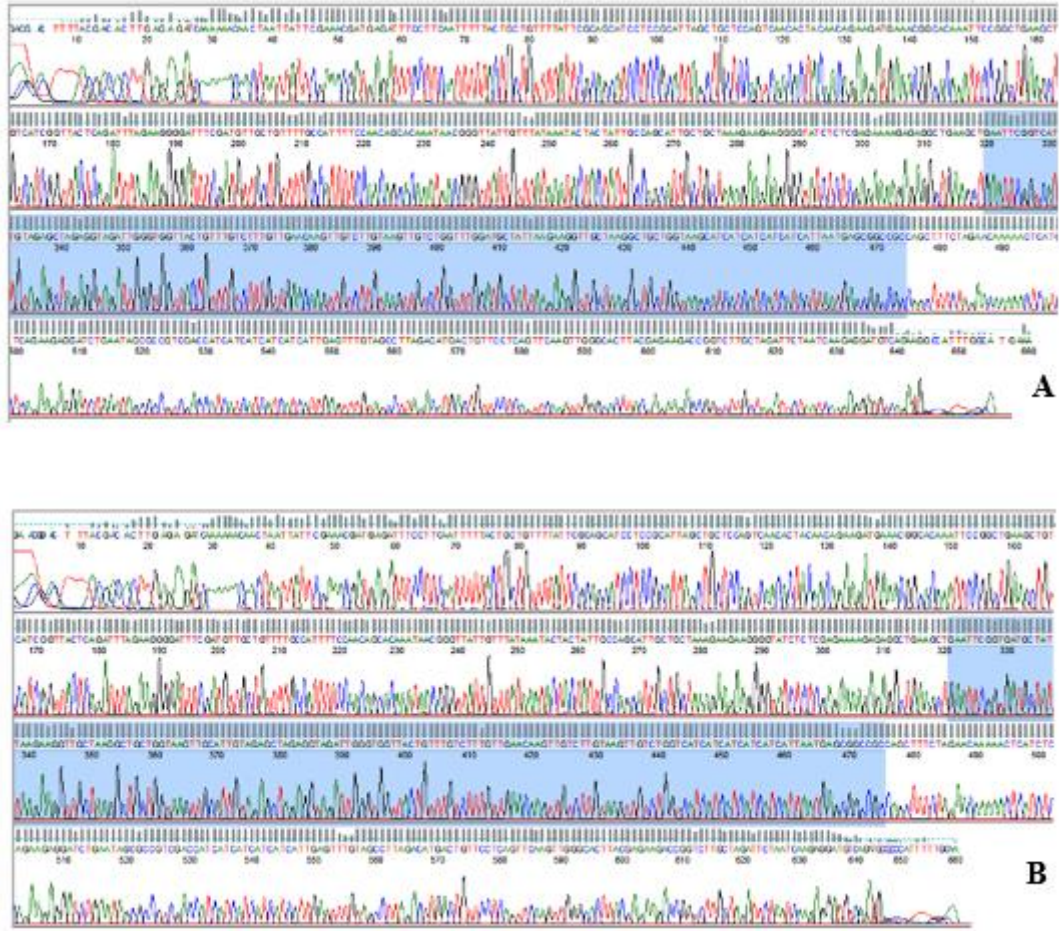
DNA'larının GPF/GPR primerleri ile elde edilen PCR ürünleri; 10-17: pPICZ α A-L12-22-6His plazmid DNA'larının GPF/GPR primerleri ile elde edilen PCR ürünleri; NK: Negatif kontrol. M: Marker.

Pozitif *E. coli* DH5 α klonlarından izole edilen plazmid DNA'ların 5'AOX1/3'AOX1 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünlerine dizi analizi yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları incelendiğinde, plazmid DNA'ların baz dizilerinin pPICZ α vektörünün AOX bölgesi ile eşleştiği ve çoklu klonlama bölgesinde L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerini içerdiği tespit edilmiştir (Tablo 3.4 ve Şekil 3.18).

Tablo 3.4. *E. coli* DH5 α klonlarının AOX bölgesi dizi analiz sonuçları

Plazmid	Hedef Gen Bölgelerini İçeren AOX1 Gen Dizisi
pPICZ α A- L12-49-6His	GACGACTTTTACGACACTTGAGAGATCAAAAAACAACATAATTATT CGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCA GCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGAT GAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGAT TTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCA CAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTG CTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAA GCTGAATTCGGTCATTGTAGAGCTAGAGGTAGATTGGGTGGTTAC TGTTTGTCTTTGTTGAACAAGTTGTCTTGTAAGTTGTCTGGTTTGG ATGCTATTAAGAAGGTTGCTAAGGCTGCTGGTAAGCATCATCATC ATCATCATTAATGAGCGGCCGCAGCTTTCTAGAACAACAACTCA TCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATC ATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGT TGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAG GATGTCAGAAGGCCATTTGGCATGAAA
pPICZ α A- L12-22-6His	GAACGGACTTTACGACACTTGAGAGATCAAAAAACAACATAATTA TTTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCG CAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAG ATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAG ATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAG CACAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCAT TGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTG AAGCTGAATTCGGTGATGCTATTAAGAAGGTTGCTAAGGCTGCTG GTAAGTTGCATTGTAGAGCTAGAGGTAGATTGGGTGGTTACTGTT TGTCTTTGTTGAACAAGTTGTCTTGTAAGTTGTCTGGTCATCATCA TCATCATCATTAATGAGCGGCCGCAGCTTTCTAGAACAACAACT CATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCA TCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAA GTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAG AGGATGTCAGATGCGCCATTTTGGCAA

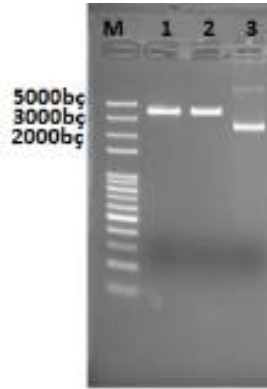
-Sarı ile işaretlenmiş bölgeler, L12-22-6His ve L12-49-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerini göstermektedir.



Şekil 3.18. *E. coli* DH5α klonlarından izole edilen pPICZαA-L12-22-6His ve pPICZαA-L12-49-6His plazmidlerinin AOX bölgesine ait dizi analiz sonuçları, A; pPICZαA-L12-49-6His plazmidinin AOX bölgesine ait dizi analiz sonuçları, B; pPICZαA-L12-22-6His plazmidlerinin AOX bölgesine ait dizi analiz sonuçları.

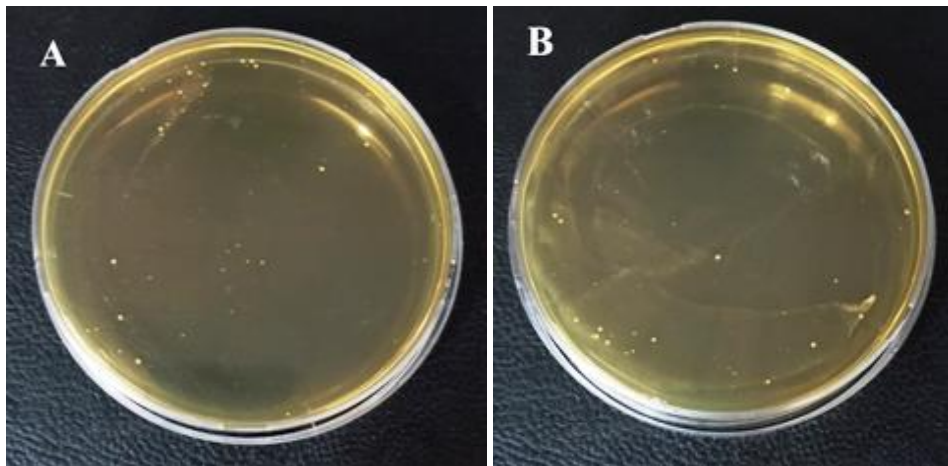
3.6. Rekombinant Plazmidlerin *P. pastoris* GS115 Hücrelerine Transformasyonu

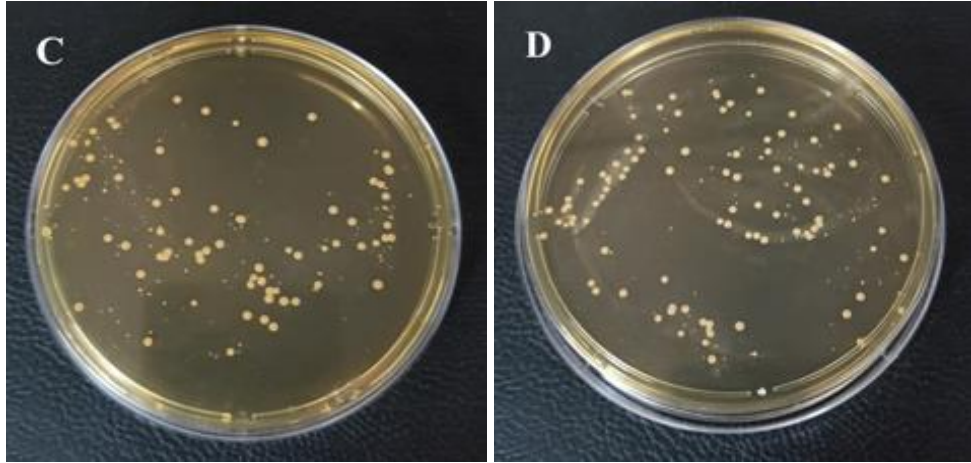
Pozitif *E. coli* DH5α klonlarından izole edilen pPICZαA-L12-49-6His ve pPICZαA-L12-22-6His plazmid DNA'ları, *SacI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak lineer hale getirilmiş ve kompetent *P. pastoris* GS115 hücrelerine transforme edilmiştir. Plazmidlerin lineerizasyonu, agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve yaklaşık 3700 bp uzunluğundaki plazmidin halkasal ve lineer formları farklı hızlarda yürüdüğüden birbirinden ayırt edilebilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. pPICZ α A-L12-22-6His ve pPICZ α A-L12-49-6His plazmidlerinin lineerizasyonuna ait jel görüntüsü. M; marker, 1; kesilmiş pPICZ α A-L12-49-6His plazmidi, 2; kesilmiş pPICZ α A-L12-22-6His plazmidi, 3; kesilmemiş pPICZ α A vektörü.

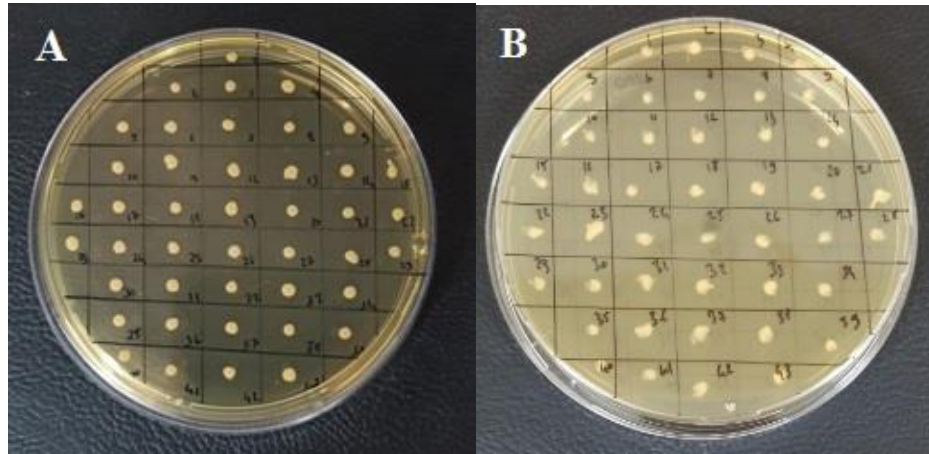
Lineerize edilmiş pPICZ α A-L12-49-6His ve pPICZ α A-L12-22-6His plazmidlerinin *P. pastoris* GS115 hücrelerine transformasyonunda elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. Elektroporasyondan sonra, *P. pastoris* GS115 hücreleri zeosinli YPDS agar plaklara ekilmiş ve 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zeosinli kültür ortamında gelişebilen pozitif transformantlardan; pPICZ α A-L12-49-6His plazmidini taşıyanlar *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-49-6His transformantı, pPICZ α A-L12-22-6His plazmidini taşıyanlar ise, *P. pastoris* GS115/ pPICZ α A-L12-22-6His transformantı olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.20).





Şekil 3.20. YPDS agarda gelişen *P. pastoris* GS115 transformantları. A,B; *P. pastoris* GS115/ pPICZαA-L12-49-6His transformantları, C, D; *P. pastoris* GS115/ pPICZαA-L12-22-6His transformantları.

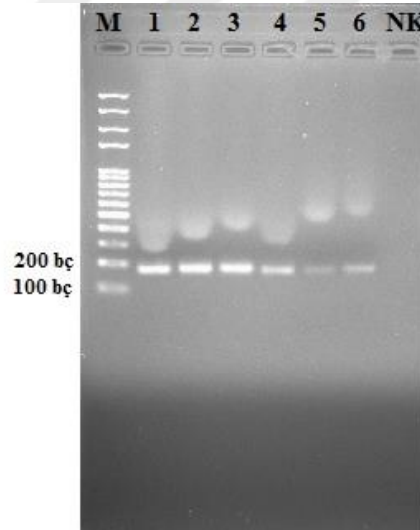
YPDS agarda gelişen *P. pastoris* GS115 transformantları, zeosin direnç seviyelerinin tespit edilebilmesi için, 1000 µg/ml'lik zeosinli YPD agar plakalara ekilmiştir (Şekil 3.21). İnkübasyon sonunda koloni çapları gözle değerlendirilmiş ve her iki transformant grubu için 5'er adet koloni seçilerek sonraki doğrulama ve kontrol aşamalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.21. 1000 µg/ml zeosinli YPD agarda gelişen *P. pastoris* GS115 transformantları. A; *P. pastoris* GS115/ pPICZαA-L12-49-6His transformantları, B; *P. pastoris* GS115/ pPICZαA-L12-22-6His transformantları.

3.7. Pozitif *P. pastoris* GS115 Transformantlarının Kontrolü ve Mut fenotipinin Belirlenmesi

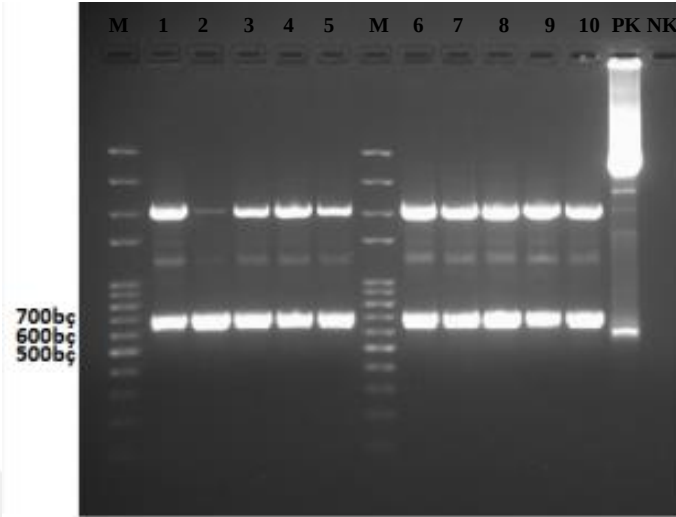
YPDS agarda geliştirilen *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His transformantlarından DNA izolasyonu yapıldıktan sonra L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA dizilerini içerip içermediği ve Mut fenotipi kontrol edilmiştir. Bu amaçla ilk önce L12-49-6His ve L12-22-6His peptidlerini kodlayan DNA fragmentleri, GPF/GPR primerleri kullanılarak amplifiye edilmiş ve sonuçta tüm transformantların 186 bp uzunluğundaki hedef bantları ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Pozitif *P. pastoris* GS115 transformantlarına ait DNA'ların GPF/GPR primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu. M: Marker; 1-3: *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-49-6His transformantlarına ait PCR ürünleri; 4-6: *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His transformantlarına ait PCR ürünleri; NK: negatif kontrol.

İkinci aşamada *P. pastoris* GS115 transformantlarından izole edilen DNA'lar, Mut (Mut⁺ veya Mut^s) fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla, AOX1 primerleri (5'AOX1/3'AOX1) kullanılarak amplifiye edilmiştir. Transforme edilmemiş *P. pastoris* GS115 suşları AOX1 genine ait ~2200 bp'lik, Mut^s fenotipleri 693 bp'lik tek bir bant üretirken, Mut⁺ fenotiplerinin 2200 bp ve 693 bp uzunluğunda iki ayrı bant üretmesi beklenmektedir. Dolayısıyla AOX bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri incelendiğinde,

pozitif *P. pastoris* GS115 transformantlarının tamamının Mut⁺ suşlar olduğu görülmüştür. (Şekil 3.23).

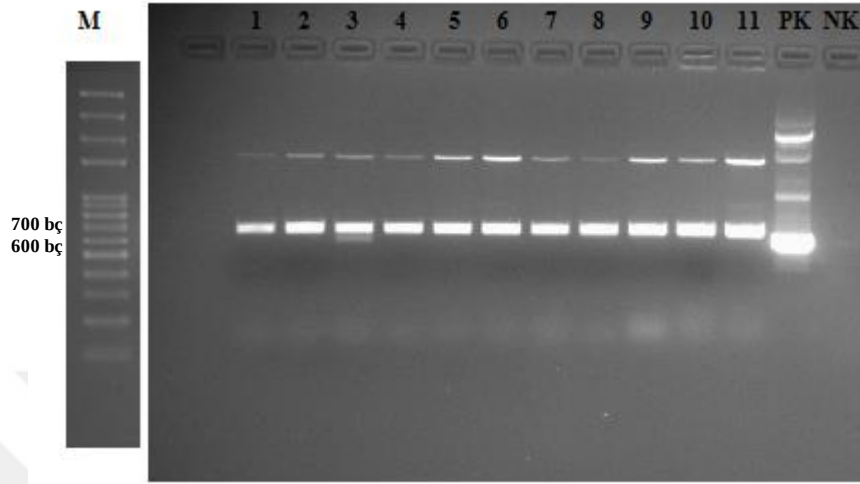


Şekil 3.23. *P. pastoris* GS115 transformantlarında Mut⁺ fenotipinin kontrolü. M: Marker; 1-5: L12-49-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarının 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri; 6-10: L12-22-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarının 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri; PK: pPICZαA vektörünün 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen PCR ürünü

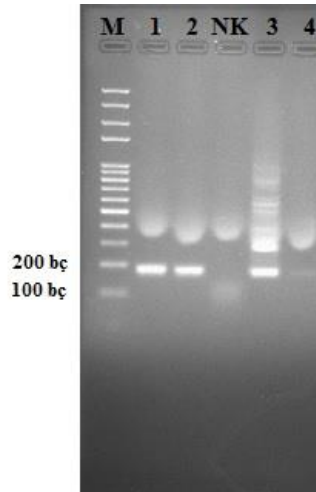
3.8. Pozitif *P. pastoris* GS115 Transformantlarında Transkripsiyonun Kontrolü

Hedef DNA dizilerini içerdiği tespit edilen pozitif *P. pastoris* GS115 transformantlarında transkripsiyonun kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla ilk önce pozitif transformantlardan RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA'lara hem AOX1 bölgesine spesifik 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ve hem de hedef DNA dizilerine spesifik GPF/GPR primerleri kullanılarak reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde kontrol edilen RT-PCR ürünlerine ait jel görüntüleri incelendiğinde, AOX1 bölgesine spesifik 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-22-6His transformantlarının 693 ve ~2200 bç uzunluğunda iki bant ürettiği gözlenmiştir (Şekil 3.24). Ayrıca *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZαA-L12-22-6His transformantlarının GPF/GPR primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait jel görüntüleri incelendiğinde 186 bç uzunluğunda bantlar oluştuğu

gözenmiş dolayısıyla hedef peptidleri kodlayan DNA fragmentlerin transkript olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.25).



Şekil 3.24. Pozitif *P. pastoris* GS115 transformantlarında transkripsiyonun kontrolü. M: Marker; 1-5: L12-49-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarına ait RNA'ların 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen RT-PCR ürünleri; 6-11: L12-22-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarına ait RNA'ların 5'AOX1/3'AOX1 primerleri ile elde edilen RT-PCR ürünleri; NK: Negatif kontrol.

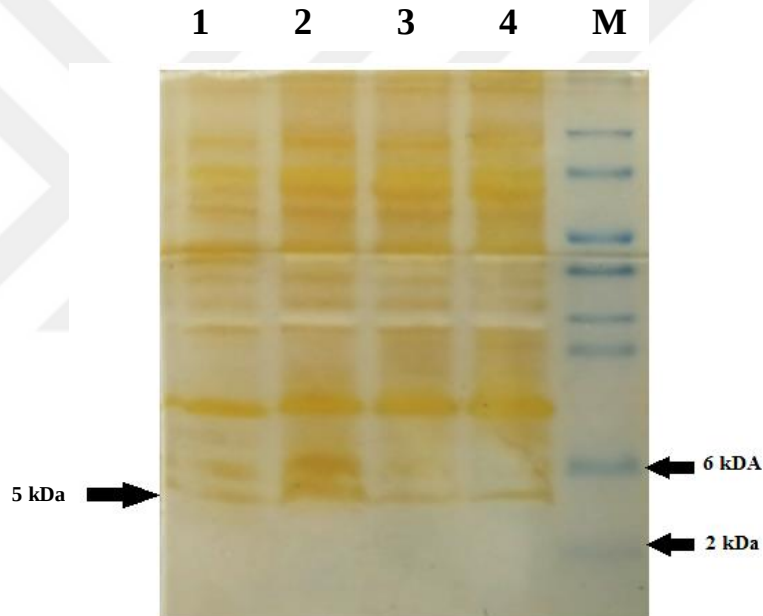


Şekil 3.25. Pozitif *P. pastoris* GS115 transformantlarında GPF/GPR primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonucu. M: Marker; 1-2: L12-49-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarına ait RNA'ların GPF/GPR primerleri ile elde edilen RT-PCR ürünleri; 3-4: L12-22-6His *P. pastoris* GS115 transformantlarına ait RNA'ların GPF/GPR primerleri ile elde edilen RT-PCR ürünleri; NK: negatif kontrol.

3.9. Rekombinant Peptidlerin Analizi

3.9.1. Rekombinant Peptidlerin SDS-PAGE Jel Elektroforezi Sonucu

P. pastoris GS115/pPICZ α A-L12-49-6His ve *P. pastoris* GS115/pPICZ α A-L12-22-6His transformatları BMMY kültür ortamında %1'lik metanol ile indüklenerek rekombinant peptidlerin üretimi gerçekleştirilmiş ve 96 saatin sonunda kültür ortamından örnekler alınarak Trisin-SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra gümüş boya ile boyanan poliakrilamid jelinde, rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerine ait yaklaşık 5 kDa (L12-49: 4880.7 g/mol, L12-22: 4880.7 g/mol) boyutundaki bantlar görüntülenmiştir (Şekil 3.26).

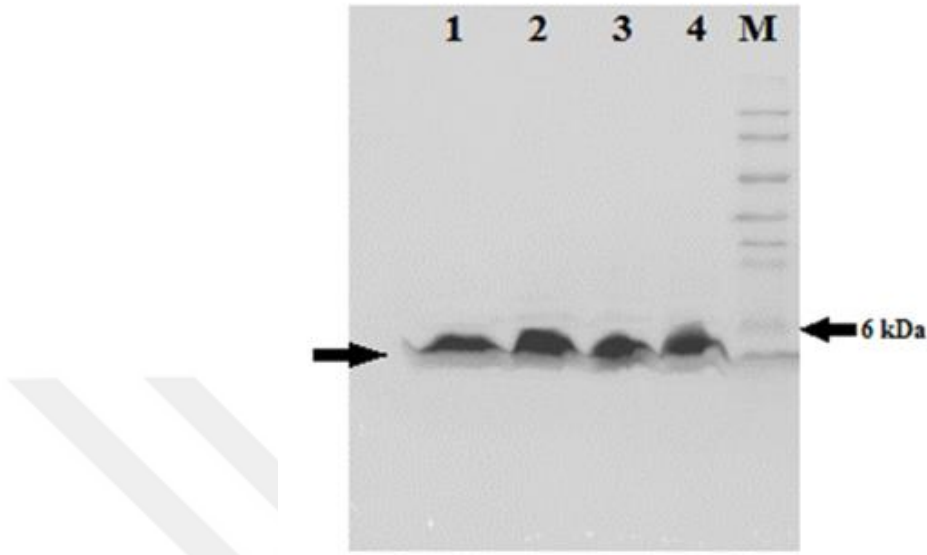


Şekil 3.26. Rekombinant peptidlerin SDS-PAGE analiz sonucu. 1-2; rL12-49-6His; 3-4; rL12-22-6His; M: Protein standardı.

3.9.2. Rekombinant Peptidlerin Western Blot Analizi

Rekombinant peptidler Trisin-SDS-PAGE jeline yürütüldükten sonra PVDF membrana aktarılarak western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası PVDF membran üzerine sabitlenmiş hedef peptidlerin işaretlenmesi için Anti-His (C-term)-HRP antikor kullanılmıştır. PVDF membrana aktarıldıktan sonra Anti-His (C-term)-HRP antikor ile 1 gece muamele edilerek işaretlenen peptidler, kemoluminesans cihazı ile

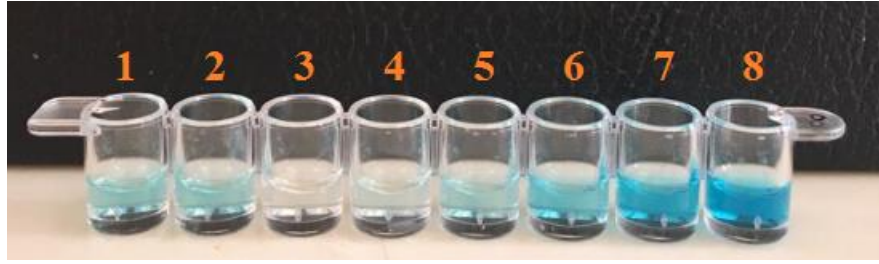
görüntülenmiştir. Sonuçta PVDF membranda her iki rekombinant peptide ait yaklaşık 5 kDa moleküler ağırlığındaki bantların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.27).



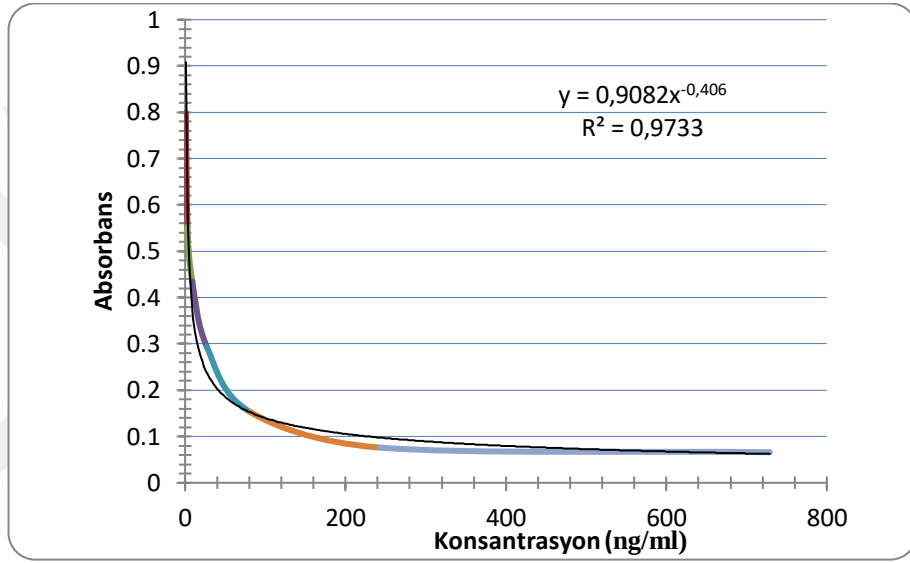
Şekil 3.27. Rekombinant peptidlerin western blot analiz sonuçları. 1,2: rL12-49-6His; 3,4: rL12-22-6His; M:western marker.

3.9.3.Rekombinant Peptidlerin ELISA Testi ile Miktar Tayini

BMMY ortamında 96 saatlik indüksiyonunun ardından kültür süpernatantı %60'lık amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve ardından pellet 0,1 M fosfat tamponu ile çözündürüldükten sonra sırasıyla 10 kDa ve 3 kDa'lık filtrelerden geçirilerek konsantre edilmiştir. C-terminalinde His-etiketi bulunan rekombinant peptidlerin kantitatif ölçümleri His-Tag ELISA kiti (GenScript, L00436, ABD) kullanılarak yarışmalı ELISA prensibine göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk önce farklı konsantrasyonlardaki standartlar (0-729ng/mL) kullanılarak regresyon eşitliği oluşturulmuş (Şekil 3.28 ve Şekil 3.29) daha sonra absorbans değerleri ölçülen peptid çözeltilerinin bu regresyon eşitliği kullanılarak konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 3.5).



Şekil 3.28. His-Tag ELISA kit ile rekombinant peptidlerin konsantrasyon tayini. 1: rL12-49-6His; 2: rL12-22-6His, 3-8: Farklı konsantrasyonlardaki standard protein çözeltileri.



Şekil 3.29. Farklı konsantrasyonlardaki standard protein çözeltileri ile çizilen standard eğri

Tablo 3.5. Rekombinant AMP'lerin konsantrasyonları

AMP	Konsantrasyon (µg/mL)
L12-49-6His	128±0,04
L12-22-6His	81±0,05

3.9.4. Rekombinant Peptidlerin Agar Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ve mayalara karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde, agar difüzyon metodu kullanılmıştır. Agar difüzyon testi için 32 µg/ml ve 64 µg/ml konsantrasyonlarda

peptidler kullanılmış ve rekombinant peptidlerin antimikrobiyal etkinlikleri petrilerdeki zon çaplarına göre yorumlanmıştır (Tablo 3.6).

Rekombinant peptidlerin, gram pozitiflerden *B. cereus* (ATCC 11778), *B. cereus* (ATCC 33019) ve *L. monocytogenes* (ATCC 7644)' e karşı belirgin bir inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin her ikisi de test edilen Gram-pozitif bakteriler içerisinde en yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes* (ATCC 7644)'e karşı göstermiş olup, çapı $19,66 \pm 0,48$ - $19,97 \pm 0,47$ mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturmuşlardır. rL12-49-6His peptidi *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* (ATCC 29213) ve MRSA (ATCC 43300)'a karşı çok küçük bir inhibisyon zonu oluştururken ($7,43 \pm 0,07$ - $9,21 \pm 0,15$), rL12-22-6His peptidinin aynı bakterilere karşı belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 3.30) (Tablo 3.6).

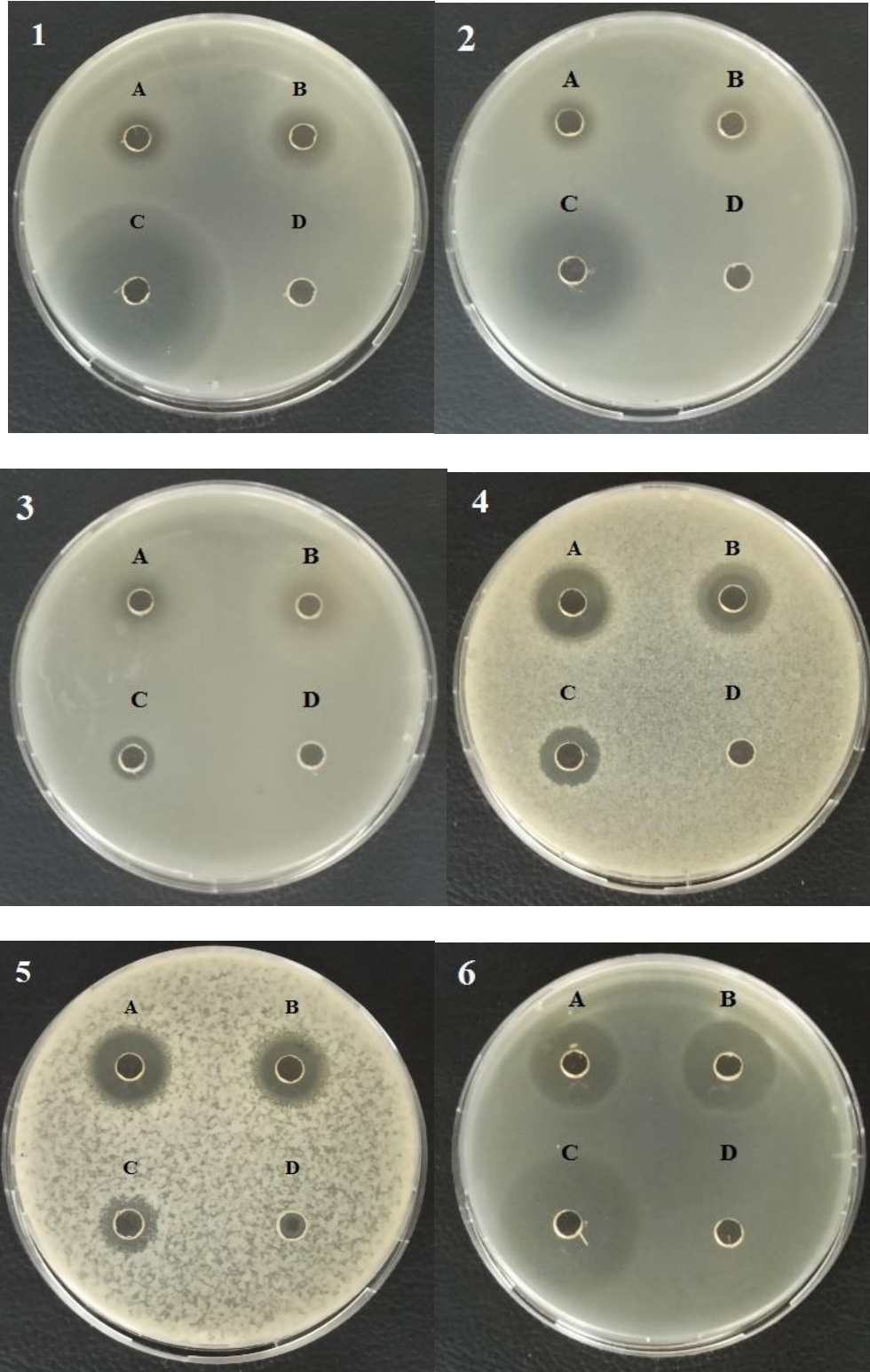
Tablo 3.6. Rekombinant peptidlerin agar difüzyon testi ile belirlenen zon çapları

Türler		Agar Difüzyon Zon Çapları (mm)		
Gram-pozitif	Suş Kodu	rL12-49-6His	rL12-22-6His	Ampisilin
<i>B. cereus</i>	ATCC 33019	$15,28 \pm 0,14^a$	$11,71 \pm 0,15^b$	$7,77 \pm 0,12^c$
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	$15,73 \pm 0,32^a$	$11,40 \pm 0,28^c$	$13,19 \pm 0,14^b$
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	$19,66 \pm 0,48^b$	$19,97 \pm 0,47^b$	$31,2 \pm 0,07^a$
MRSA	ATCC 43300	$8,13 \pm 0,04^b$	$6,9 \pm 0,03^c$	$9,19 \pm 0,12^a$
<i>S. aureus</i>	ATCC 25293	$9,21 \pm 0,15^b$	$8,53 \pm 0,18^b$	$38,12 \pm 0,12^a$
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	$7,43 \pm 0,07^b$	$7,72 \pm 0,11^b$	$22,88 \pm 0,11^a$
Gram-negatif	Suş Kodu	rL12-49-6His	rL12-22-6His	Ampisilin
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	$16,41 \pm 0,07^b$	$14,98 \pm 0,03^c$	$19,8 \pm 0,14^a$
<i>E. coli</i> (O157:H7)	ATCC 43894	$14,68 \pm 0,03^b$	$14,09 \pm 0,04^c$	$19,78 \pm 0,14^a$
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	$12,71 \pm 0,26^b$	$14,58 \pm 0,28^a$	-
<i>E. sakazakii</i>	kllinik izolat	$17,36 \pm 0,17^b$	$17,36 \pm 0,17^b$	$22,50 \pm 0,04^a$
<i>P. aeruginosa</i>	kllinik izolat	$14,2 \pm 0,04^a$	$14,24 \pm 0,06^a$	-
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 14028	$15,67 \pm 0,16^c$	$17,36 \pm 0,08^b$	$22,61 \pm 0,12^a$
<i>K. pneumoniae</i>	kllinik izolat	$13,62 \pm 0,21^a$	$13,62 \pm 0,21^a$	-
<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 27729	$21,82 \pm 0,08^a$	$21,82 \pm 0,08^a$	$17,1 \pm 0,28^b$
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	ATCC 911	$15,89 \pm 0,05^c$	$16,43 \pm 0,08^b$	$23,86 \pm 0,08^a$
<i>A. baumannii</i>	kllinik izolat	$14,38 \pm 0,04^b$	$15,7 \pm 0,04^a$	-
Mantar	Suş Kodu	rL12-49-6His	rL12-22-6His	Ampisilin
<i>C. albicans</i>	ATCC 10223	$10,62 \pm 0,08^b$	$14,42 \pm 0,25^a$	*
<i>C. albicans</i>	ATCC 90023	$10,03 \pm 0,18^b$	$11,31 \pm 0,08^a$	*
<i>C. galabrata</i>	kllinik izolat	$10,07 \pm 0,16^b$	$13,08 \pm 0,11^a$	*

-:inhibisyon zonu oluşmamıştır.

*: test edilmemiştir.

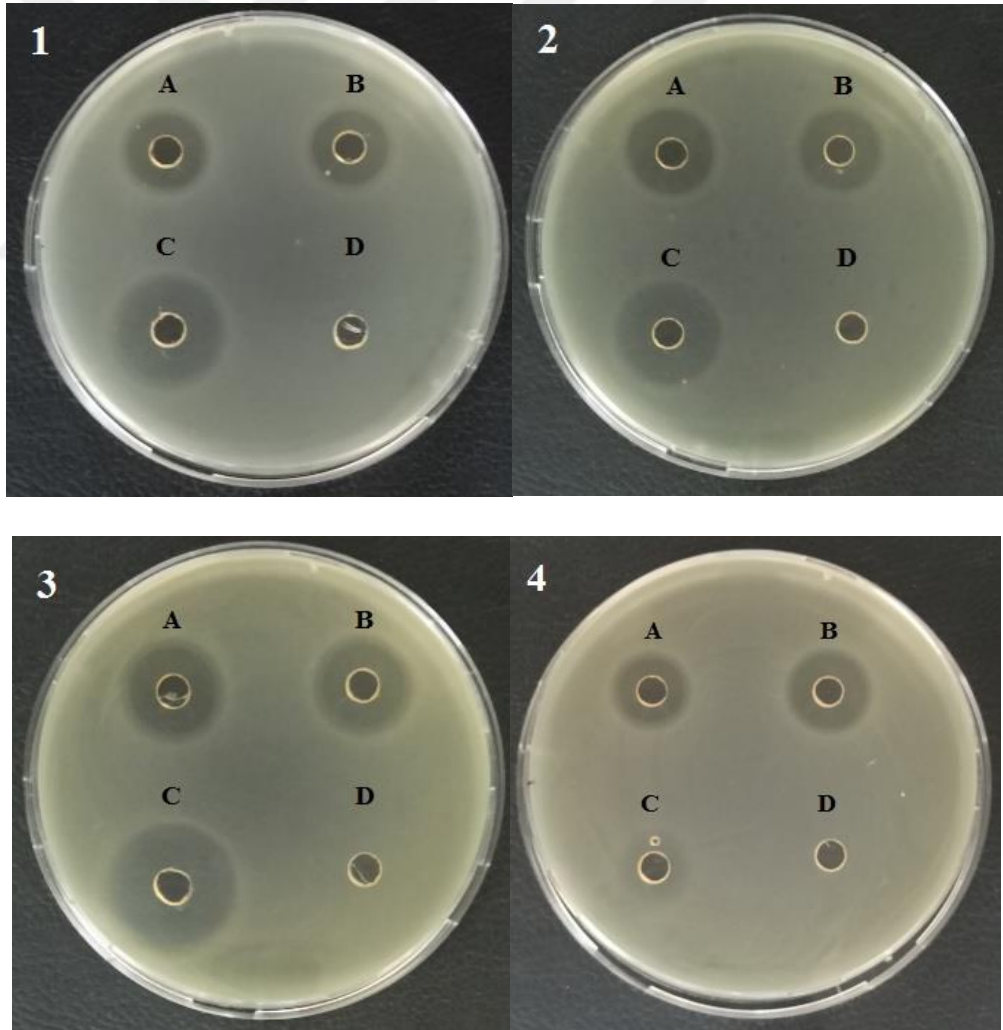
a-c: Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,01$).

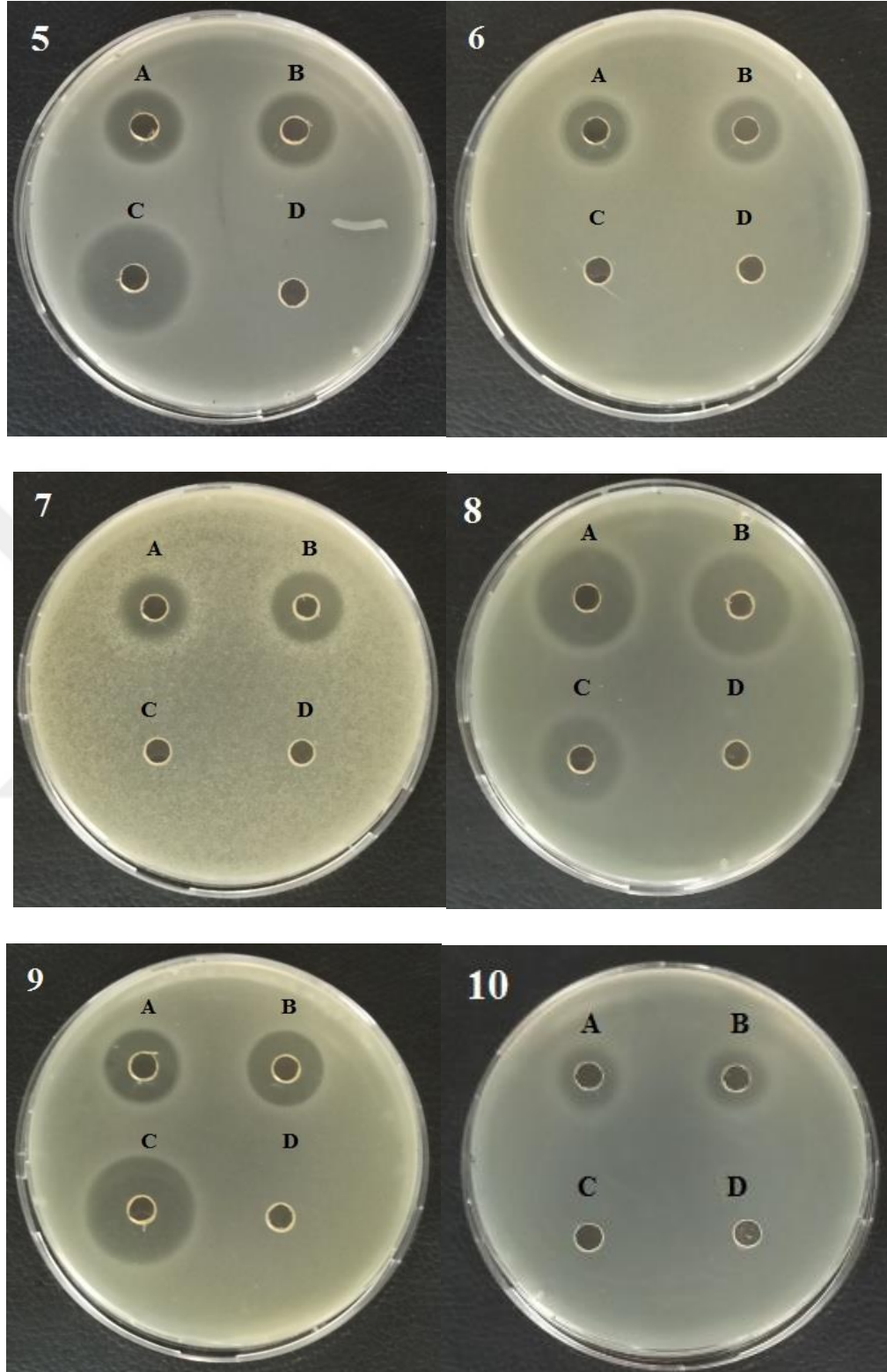


Şekil 3.30. Rekombinant peptidlerin Gram-pozitif bakterilerine karşı agar diffüzyon testi sonuçları. 1. *S. aureus* (ATCC 25293), 2. *S. aureus* (ATCC 29213), 3. MRSA (ATCC 43300), 4. *B. cereus* (ATCC 11778), 5. *B. cereus* (ATCC 33019), 6. *L. monocytogenes* (ATCC 7644), A; rL12-49-6His, B; rL12-22-6His, C; PK: Pozitif Kontrol (Ampisilin

konsantrasyonu 200 µg/mL olarak ayarlanmıştır), D; NK: Negatif Kontrol (0,1 M fosfat tamponu).

Rekombinant peptidlerin Gram-negatif bakterilerin *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), *E. sakazakii* (klinik izolat), *E. cloacae* (ATCC 13047), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *A. baumannii* (klinik izolat), *K. pneumoniae* (klinik izolat), *Y. enterocolitica* (ATCC 27729), *P. aeruginosa* (klinik izolat) ve *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911) suşlarına karşı belirgin bir inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin her ikisi de test edilen Gram-negatif bakteriler içerisinde en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Y. enterocolitica* (ATCC 27729)'ya karşı göstermiş olup, çapı $21,82 \pm 0,08$ mm olan inhibisyon zonları oluşturmuşlardır (Şekil 3.31) (Tablo 3.6).

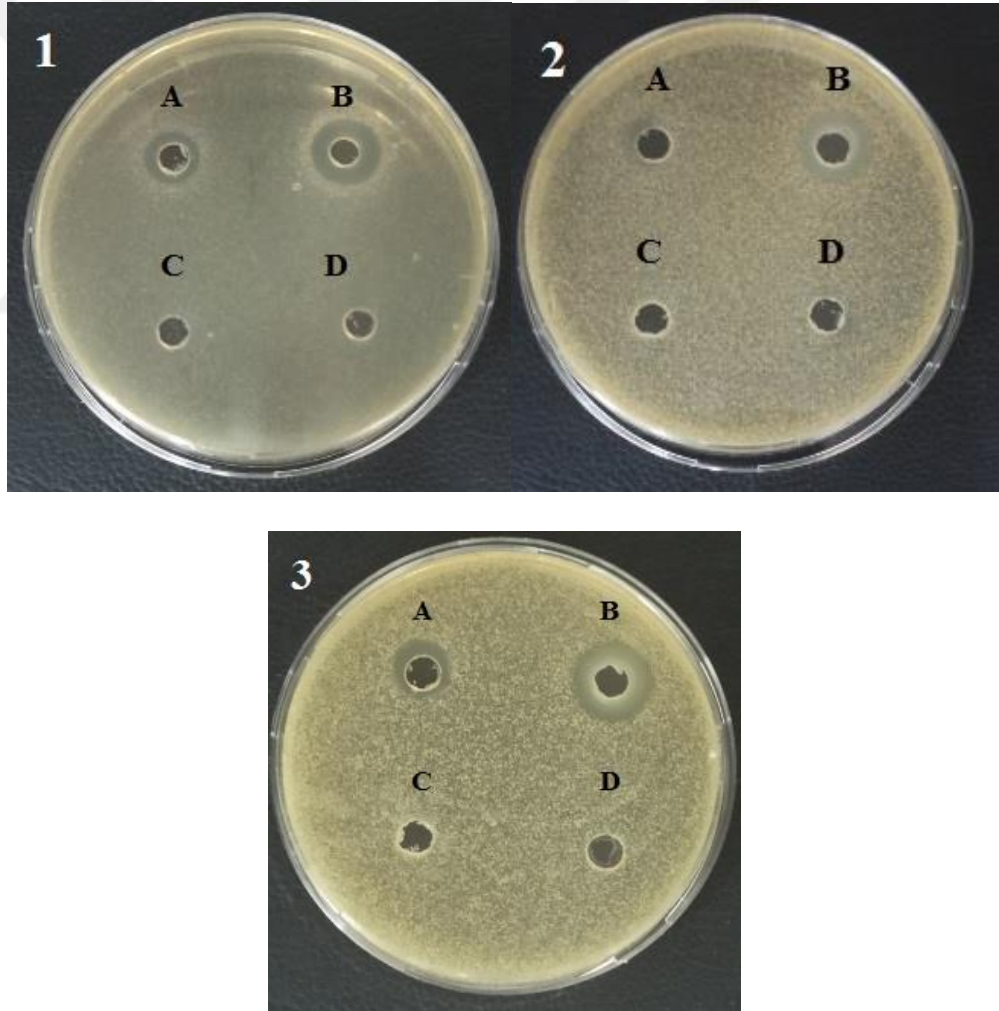




Şekil 3.31. Rekombinant peptidlerin Gram-negatif bakterilerine karşı agar diffüzyon testi sonuçları. 1: *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), 2: *E. coli* (ATCC 25922), 3: *E. sakazakii* (klinik izolat), 4: *E. cloacae* (ATCC 13047), 5: *S. Typhimurium* (ATCC 14028), 6: *K. Pneumoniae* (klinik izolat), 7: *A. baumannii* (klinik izolat), 8: *Y. enterocolitica* (ATCC

27729), 9: *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911), 10: *P. aeruginosa* (klinik izolat), A; rL12-49-6His, B; rL12-22-6His, C; PK: Pozitif Kontrol (Ampisilin konsantrasyonu 200 µg/mL olarak ayarlanmıştır), D; NK: Negatif Kontrol (0,1 M fosfat tamponu).

Rekombinant peptidlerinin *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* (klinik izolat) suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. rL12-49-6His peptidi test edilen maya suşlarına karşı $10,03 \pm 0,18$ - $10,62 \pm 0,08$ arasında değişen zonlar oluştururken; rL12-22-6His peptidinin oluşturduğu zon çaplarının $11,31 \pm 0,08$ - $14,42 \pm 0,25$ arasında değiştiği dolayısıyla rL12-22-6His'in maya suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliğinin rL12-49-6His peptidinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.32) (Tablo 3.6).



Şekil 3.32. Rekombinant peptidlerin patojenik maya suşlarına karşı agar difüzyon testi sonuçları. 1: *C. glabrata* (klinik izolat), 2: *C. albicans* (ATCC 90023), 3: *C. albicans* (ATCC 10223). A; rL12-49-6His, B; rL12-22-6His, C; PK: Pozitif Kontrol (Ampisilin

konsantrasyonu 200 µg/mL olarak ayarlanmıştır), D; NK: Negatif Kontrol (0,1 M fosfat tamponu).

3.9.5. Rekombinant Peptidlerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Analizi Sonucu

Bu tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerin test edilen bazı Gram-pozitif bakteri, Gram-negatif bakteri ve maya suşlarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle en az 3 paralel çalışılarak belirlenmiştir .

Rekombinant peptidlerin Gram-pozitif bakterilerden *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. cereus* ATCC 33019 suşlarına karşı MİK değerlerinin 2-16 µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir. Her iki peptid de en düşük MİK değerlerini *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı verirken *S. aureus* ATCC 25293, *S. aureus* ATCC 29213 ve MRSA suşlarına karşı MİK değerleri >128 µg/ml olarak tespit edilmiştir. (Tablo 3.7)

Gram-negatif bakterilere karşı rL12-22-6His peptidinin MİK değerlerinin 4-8 µg/ml, rL12-49-6His peptidinin MİK değerlerinin ise 8-64 µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir. En düşük MİK değerleri rL12-22-6His peptidinde *E. coli* ATCC 25922, *E. cloacae* ATCC 13047, *E. sakazakii* (klinik izolat), *S. Typhimurium* ATCC 1428, *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *A. baumannii* (klinik izolat) suşlarına karşı, rL12-49-6His peptidinde ise *S. Typhimurium* ATCC 1428 ve *Y. enterocolitica* ATCC 27729 suşlarına karşı belirlenmiştir. Test edilen Gram-negatif bakteriler arasında en yüksek MİK değerini rL12-49-6His peptidinin *E. coli* (O157-H7) ATCC 43894 karşı verdiği tespit edilmiştir.

Rekombinant peptidlerin *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. glabrata* (klinik izolat) suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için yapılan MİK analizinde, rL12-22-6His peptidinin 8-16 µg/ml, rL12-49-6His peptidinin ise 32-64 µg/ml arasında değişen MİK değerleri verdiği tespit edilmiştir. En düşük MİK değerini rL12-22-6His peptidi, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. glabrata* (klinik izolat) suşlarına karşı verirken, en yüksek MİK değerini rL12-49-6His peptidinin *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı verdiği tespit edilmiştir.

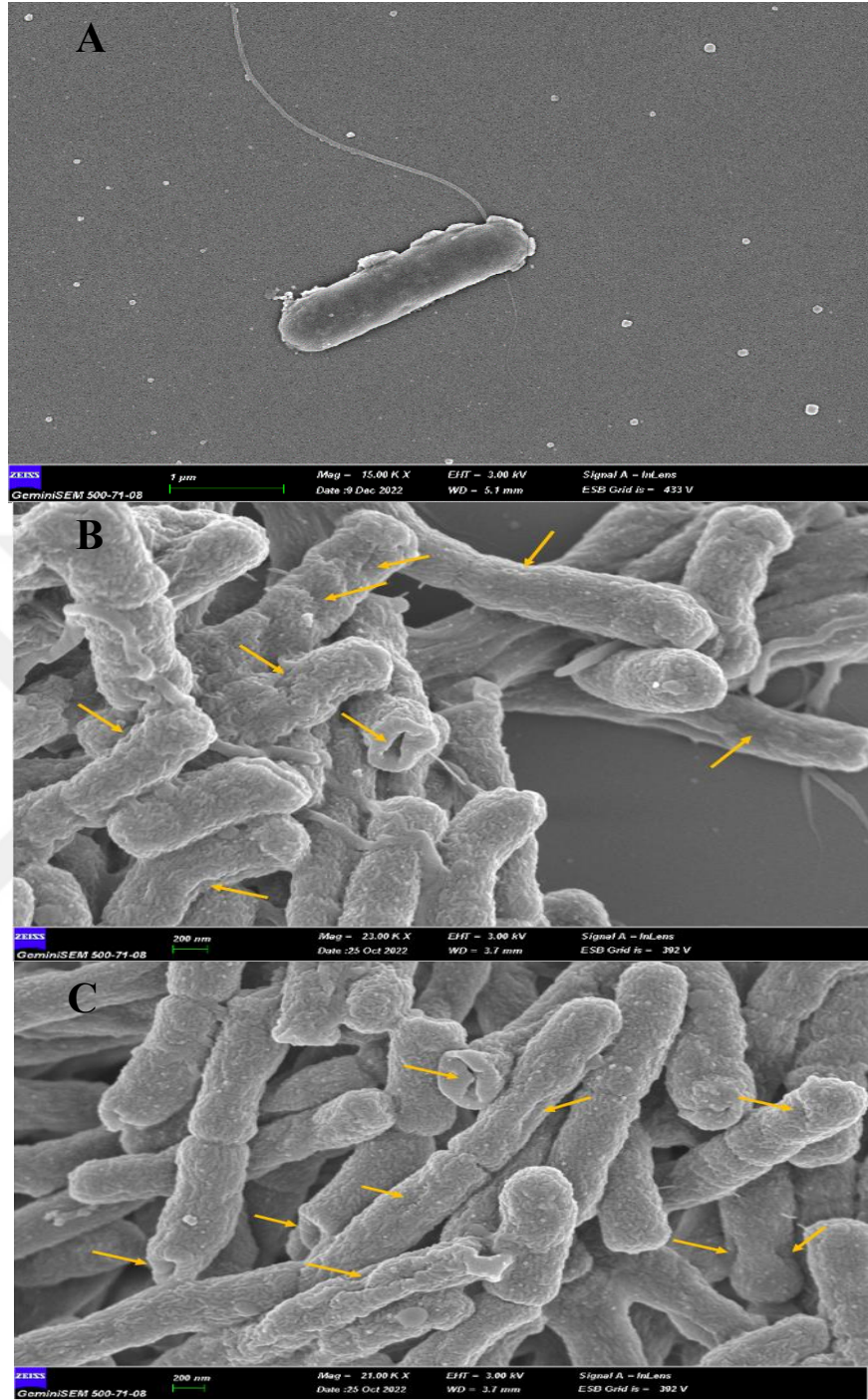
Tablo 3.7. Rekombinant peptidlerin MİK analiz sonuçları

Test Mikroorganizmaları		MİK değeri (µg/ml)	
		L12-49-6His	L12-22-6His
Gram-pozitif	Suş Kodu		
<i>B. cereus</i>	ATCC 33019	16	2
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	16	2
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	0,25	0,25
MRSA	ATCC 43300	>128	>128
<i>S. aureus</i>	ATCC 25293	>128	>128
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	>128	>128
Gram-negatif	Suş Kodu		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	16	4
<i>E. coli</i> (O157-H7)	ATCC 43894	64	8
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	16	4
<i>E. sakazakii</i>	klirik izolat	16	4
<i>P. aeruginosa</i>	klirik izolat	16	8
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 14028	8	4
<i>K. pneumoniae</i>	klirik izolat	16	8
<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 27729	8	4
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	ATCC 911	16	8
<i>A. baumannii</i>	klirik izolat	16	4
Maya	Suş Kodu		
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	32	8
<i>C. albicans</i>	ATCC 90023	64	16
<i>C. galabrata</i>	klirik izolat	32	8

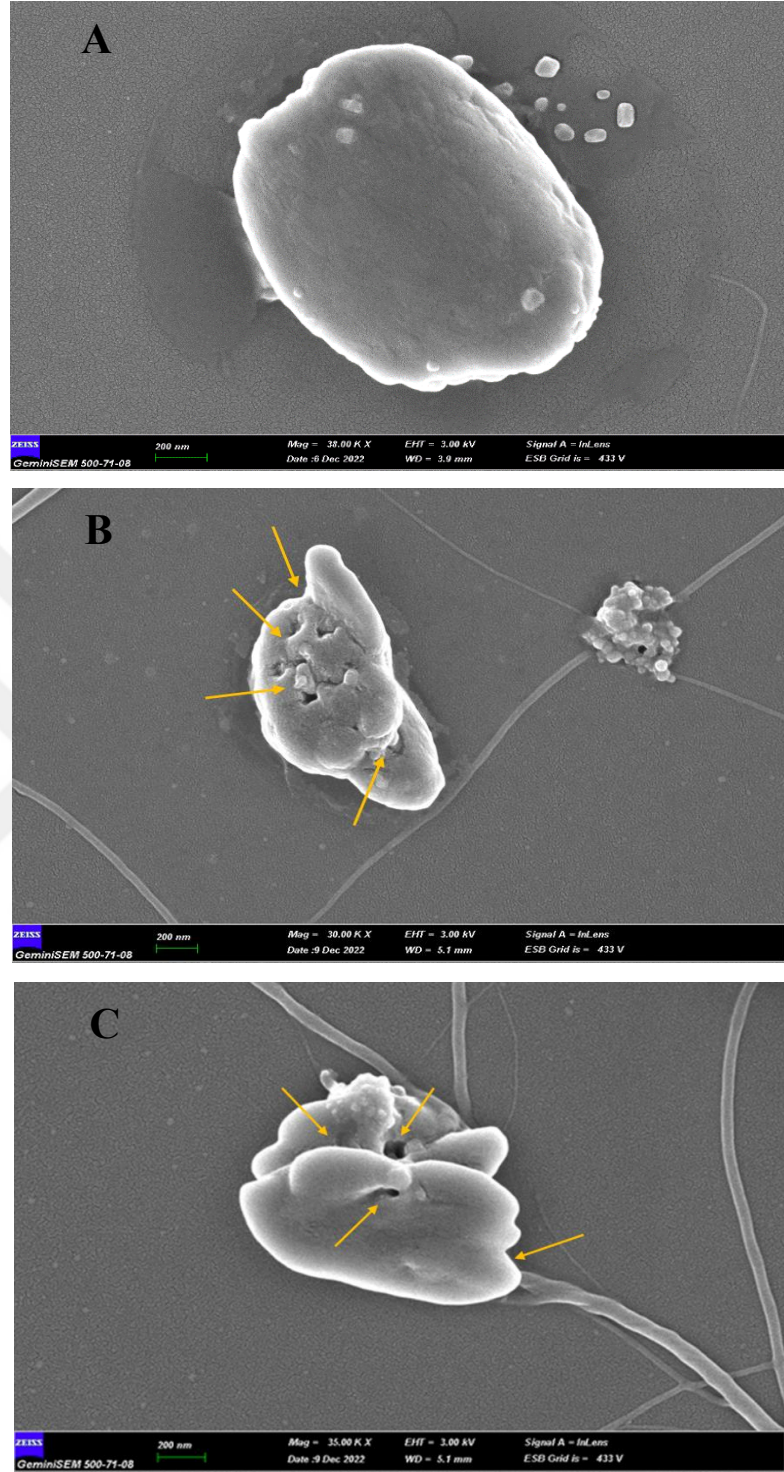
MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

3.9.6. Rekombinant Peptidlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı Elektron Mikroskop analizi ile rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin bakteri ve maya hücresi üzerindeki etkisi doğrudan gözlemlenmiştir. Bu amaçla test suşları olarak *E.coli* 0157:H7 (ATCC 43894 ve *C. albicans* (ATCC 10231) kullanılmıştır. SEM analiz görüntüleri incelendiğinde, 1xMİK seviyesindeki rekombinant peptidler ile 1 saat boyunca muamele edilen *E. coli* 0157:H7 (ATCC 43894) hücrelerinin yüzeylerinin pürüzlü hale geldiği ve deforme (yarıklar) olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.33). Rekombinant peptidler ile 1xMİK seviyesinde muamele edilen *C. albicans* (ATCC 10231) hücresinde ise hücre duvarında yarılmalar, hücre içinden dışarı sızmalar ve hücre enkaz yığınları gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan ve yalnızca PBS ile muamele edilen *E. coli* 0157:H7 (ATCC 43894) ve *C. albicans* (ATCC 10231) hücrelerinin ise dış yüzeylerinin düzgün görümlü ve pürüzsüz olduğu ve hücre yapısının korunduğu görülmüştür. (Şekil 3.34).



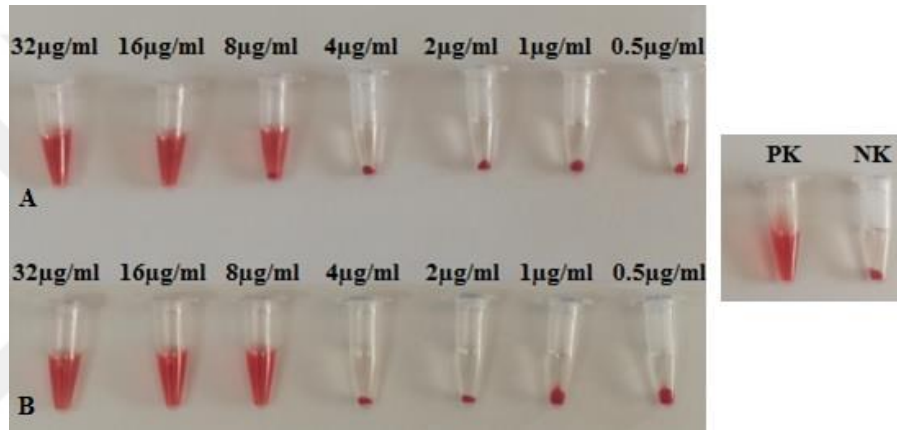
Şekil 3.33. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidleri ile muamale edilmiş *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894)'nin taramalı elektron mikroskopik mikrografları. (A) kontrol; (B) 1×MİK rL12-49-6His ile muamele edilmiş *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894) hücreleri (C) 1×MİK rL12-22-6His ile muamele edilmiş *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894) hücreleri. Hücre morfolojisindeki değişimler sarı ok ile gösterilmiştir.



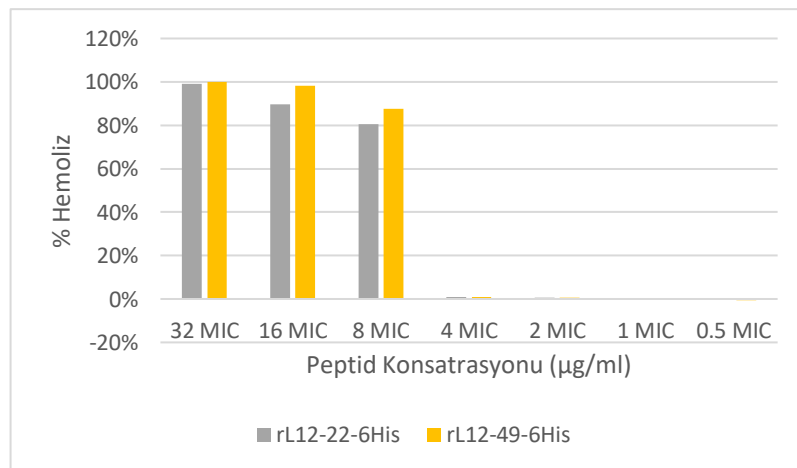
Şekil 3.34. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidi ile muamele edilmiş *C.albicans* (ATCC 10231)'nin taramalı elektron mikroskopik mikrografları. (A) kontrol; (B) 1×MİK rL12-49-6His ile muamele edilmiş *C.albicans* (ATCC 10231) hücreleri (C) 1×MİK rL12-22-6His ile muamele edilmiş *C.albicans* (ATCC 10231) hücreleri Hücre morfolojisindeki değişimler sarı ok ile gösterilmiştir.

3.9.7. Rekombinant Peptidlerin Hemolitik Aktivite Analizi

Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hemolitik aktivitesi fare eritrositine karşı test edilmiş ve hemoliz yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 3.35). Her iki peptid de 4µg/ml ve altındaki konsantrasyonlarında hemolitik aktivite göstermemişlerdir. Peptid konsantrasyonu arttıkça eritrosit lizizindeki artışa bağlı olarak %hemoliz değerinin de arttığı gözlenmiştir. rL12-49-6His peptidinin 8-32 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda %hemoliz değerleri >%88 iken, rL12-22-6His peptidinin için aynı konsantrasyonlardaki % hemoliz değerleri >%81 µg/ml olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.35. Rekombinant peptidler ile muamele edilen fare eritrositlerinin hemolitik aktivite testi sonuçları

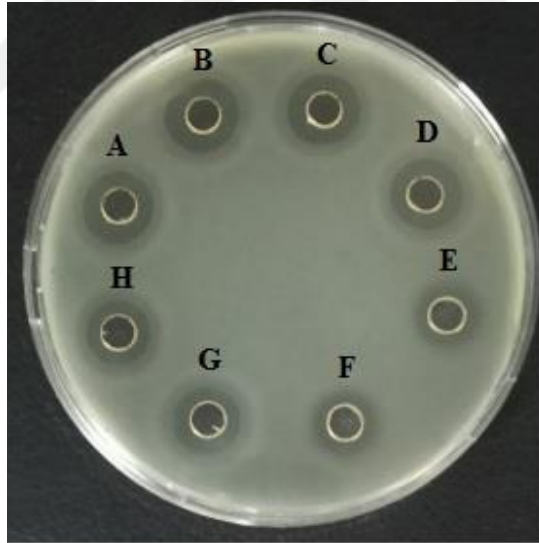


Şekil 3.36. Farklı konsantrasyonlarda rekombinant peptidlerle muamele edilen fare eritrositlerinin % hemoliz grafiği. NK: Negatif kontrol, PBS; PK: Pozitif kontrol, Triton X-100.

3.10. Rekombinant Peptidlerin Stabilite Testleri Sonucu

3.10.1. Rekombinant Peptidlerin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin ısıl stabilitelerini belirlemek amacıyla, peptidler 1 saat boyunca farklı sıcaklıklara (4°C, 24°C, 65°C ve 95°C) maruz bırakılmış ve ardından antimikrobiyal aktivitesindeki değişim agar difüzyon metodu ile değerlendirilmiştir. 4°C ve 24°C sıcaklık uygulanan rekombinant peptidlerin test bakterisi olarak kullanılan *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları incelendiğinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.01$). Diğer taraftan 65°C ve 95°C'ye maruz bırakılan rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin her ikisinin de 24°C'ye kıyasla zon çapında sırasıyla %6'lık ve %16'lık bir küçülme olurken aradaki farkın da istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$) Şekil 3.36) (Tablo 3.8).



Şekil 3.37. Rekombinant peptidlerin sıcaklık stabilite testi sonuçları. A: rL12-49-6His (24°C), B: rL12-22-6His (24°C), C: rL12-49-6His (4°C), D: rL12-22-6His (4°C), E: rL12-49-6His (95°C), F: rL12-22-6His (95°C), G: rL12-49-6His (65°C), H: rL12-22-6His (65°C).

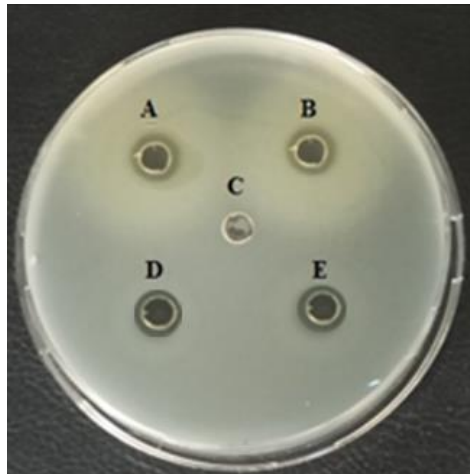
Tablo 3.8. Rekombinant peptidlerin farklı sıcaklıklarda muamele sonrası *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı oluşturdukları agar difüzyon zon çapları

Peptidler	Zon Çapı (mm)			
	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)			
	Sıcaklık			
	4 °C	24 °C	65 °C	95 °C
L12-49-6His	12,89±0,10 ^a	12,90±0,06 ^a	12,09±0,07 ^b	10,78±0,14 ^c
L12-22-6His	12,92±0,04 ^a	12,91±0,04 ^a	12,14±0,14 ^b	10,8±0,16 ^c

a-c: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0.01$).

3.10.2. Rekombinant Peptidlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Proteaz Enzimlerinin Etkisi

Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidleri proteaz enzimi ($\geq 2,4$ U/g) ile 37°C'de 4 saat muamele edildikten sonra *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı antimikrobiyal aktivitesindeki değişim agar difüzyon metodu ile belirlenerek proteaz stabiliteyi değerlendirilmiştir. Sonuçta rekombinant peptidlerin proteaz enzimleriyle muamelesi sonrasında *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı belirlenen inhibisyon zon çaplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 3.37) (Tablo 3.9).



Şekil 3.38. Rekombinant peptidlerin *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı agar difüzyon testi sonuçları. A: rL12-49-6His (proteaz enzimi ile muamele edilmiş), B: rL12-22-6His (proteaz enzimi ile muamele edilmiş), C: Negatif kontrol (PBS), D: rL12-49-6His (proteaz enzimi ile muamele edilmiş), E: rL12-22-6His (proteaz enzimi ile muamele edilmiş).

(yalnızca PBS ile muamele edilmiş), E: rL12-22-6His (yalnızca PBS ile muamele edilmiş).

Tablo 3.9. Rekombinant peptidlerin proteaz enzimi ile mumale sonrası agar difüzyon zon çapları

Peptidler	Zon Çapı (mm)	
	Kontrol	Enzim-Peptid Karışımı (1:1) Proteaz*
L12-49-6His	8,01 ± 0,26 ^a	7,91 ± 0,07 ^a
L12-22-6His	9,16 ± 0,03 ^a	9,18 ± 0,04 ^a

a: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemsizdir (p>0.05). *: 2,4 U/g

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında motif tabanlı bir antimikrobial peptid tasarım stratejisi geliştirilmiş ve bu strateji kullanılarak iki adet *de novo* peptid tasarlanmıştır. Tasarlanan bu peptid dizilerini kodlayan DNA fragmentleri pPICZαA ekspresyon vektörüne bağlanarak *E. coli* DH5α hücrelerinde klonlanmış ve rekombinant plazmidler elde edilmiştir. Daha sonra lineer hale getirilen rekombinant plazmidler elektroporasyon yöntemiyle *P. pastoris* GS115 suşunun genomuna entegre edilmiştir. Ardından rekombinant transformantlar, gliserol içeren BMGY kültür ortamına inoküle edilmiştir. Daha sonra santrifüj edilerek çöktürülen hücreler BMMY kültür ortamına alınarak 96 saat boyunca %1'lik metanol ile çalkalamalı kültür ortamında indüklenmiştir. Kültür süpernatantlarından örnek alınarak gerçekleştirilen Tris- SDS-PAGE ve Western blot analizi ile rekombinant protein üretimi doğrulanmış ve üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık 5 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sayede *de novo* tasarımı peptidlerin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretimi gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamındaki çalışmalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda 6 alt başlık altında tartışılmıştır.

4.1. *De novo* Tasarımlı Peptidlerin *P. pastoris* Ekspresyon Sisteminde Rekombinant Üretimi

Bu tez çalışması kapsamında, motif bazlı *de novo* tasarım stratejisi geliştirilmiş ve bu tasarım stratejisiyle elde edilen peptidlerin rekombinant yöntemle üretimi gerçekleştirilmiştir. AMP'lerin *de novo* tasarımında kullanılacak data setini oluşturmak için, veritabanı tarama stratejisi kullanılarak en kapsamlı AMP veri tabanlarından biri olan DBAASP veritabanından, peptid uzunluğu (<50 aa), peptid kompleksliği (monomer), hemolitik aktivite, peptid kaynağı (sentetik veya doğal) açısından belirlenen kriterlere uygun peptidler seçilmiştir. Ardından seçilen bu peptidler CAMP_{R3} (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) uygulaması kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerine göre sıralanmış ve aktivite skoru ≥0.5 olan toplam 135 adet peptid dizisi elde edilmiştir.

Daha sonra da benzerlik oranı $> \%80$ olan peptidler CD-HIT (<https://sites.google.com/view/cd-hit>) programı ile elenmiştir. Geriye kalan 88 adet peptid MEME Suite 5.5.0 (<https://meme-suite.org/meme/>) motif bulma aracı kullanılarak, en az 10 antimikrobiyal peptid ile eşleşme gösteren (Minimum sites: 10) 11, 12 ve 13 aminoasit uzunluğunda 3 motif sınıfı oluşturulmuştur. MEME Suite 5.5.0 motif bulma aracı ile belirlenen her bir motif sınıfındaki en düşük E değerine sahip 5'er adet motif seçilmiştir. Seçilen motifler kullanılarak *de novo* peptidlerin tasarlanabilmesi için bir başlangıç şablonu "GM1(X)M2(X)M3" oluşturulmuştur. Bu şablonun, N teminalinde aminopeptidazlara direnç kazandırılması amacıyla bir cap yani kapatma aminoasidi olarak G (glisin) kullanılmıştır. Ayrıca, AMP veritabanlarında bulunan peptidlerin aminoasit kompozisyonu incelendiğinde bazı aminoasitlerin daha fazla tekrar ettiği gözlenmektedir. Örneğin, toplam 2619 peptidin kayıtlı olduğu bir AMP veritabanı olan APD incelendiğinde, AMP'lerde en çok G, K ve L aminoasitlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca AMP'lerin *de novo* tasarımında R ve K, fizyolojik koşullar altında protonlandıkları ve güçlü antimikrobiyal aktiviteler gösterdikleri için bazik aminoasitler arasında oldukça popülerdir. Bunun dışında peptidlerin hem hidrofobik hem de polar yüz derinliklerini, G, L, I gibi alifatik yan zincirlerine sahip aminoasitlerin artırdığı bildirilmiştir (Khara vd., 2017). Bu nedenle X yani joker aminoasit olarak K, L, I, R aminoasitleri kullanılmıştır. Böylece 11 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 36, 12 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 39, 13 aminoasit uzunluğundaki motiflerden 42 aminoasit uzunluğundaki özgün diziler elde edilmiştir.

Başlangıç sekansı tasarlandıktan sonra, MEME Suite 5.5.0 aracı kullanılarak elde edilen motifler (M), GM1(X)M2(X)M3 başlangıç şablonundaki M1, M2 ve M3'e karşılık gelen pozisyonlara sırasıyla yerleştirilmiş ve motiflerin 3'lü kombinasyonlarını içeren peptid sekansları elde edilmiştir. Bu peptid kombinasyonlarındaki her bir (X) joker aminoasidi yerine K, I L ve R aminoasitlerinden yalnızca biri yerleştirildiğinde toplamda 720 adet peptid dizisi elde edilmiştir. 11 aminoasit uzunluğundaki motifler kullanılarak ve başlangıç şablonuna sadece L joker aminoasidi yerleştirilerek elde edilen peptid kombinasyonları "L11" peptid seti olarak adlandırılmıştır. Aynı işlem 12 aa ve 13 aa uzunluğundaki motifler ve diğer üç joker aminoasit (K, I ve R) için de tekrar edildiğinde toplamda 12 peptid seti ("L11" "K11", "I11" ve "R11"; "L12", "K12", "I12" ve "R12"; "L13", "K13", "I13" ve "R13") elde edilmiştir. Tasarlanan bu 12 peptid

içerisindeki toplam 720 adet peptidin biyoinformatik araçlar kullanılarak birçok fizikokimyasal özellikleri tahminlenmiştir.

Biyoinformatik araçlar kullanılarak *in silico* analiz edilen peptidlerden antimikrobiyal aktivite skoru ≥ 0.5 , hidrofobikliği %30-%50 ve net yükü +2-+9 arasında, izoelektrik noktası >9 olan toplam 50 adet peptid seçilmiştir. Bu peptidler önce ProtParam aracı ile tahminlenen stabilite değerlerine göre sıralanarak, stabilitesi en yüksek 24 peptid belirlenmiş ve bu peptidlerden en yüksek katyonik yüke sahip peptidler seçilmiştir. Buna göre en yüksek net yüke sahip peptidlerin M5, M6 ve M10 motifleri ve L joker aa kullanılarak elde edilen 6 farklı peptid kombinasyonuna ait olduğu görülmüştür. Motiflerin peptid dizisi içerisindeki konumlarının değişimi hidrofobiklik, net yük, izoelektrik nokta gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirmese de enerji skorları (sOPEP) ve docking skorlarını değiştirmiştir. Dolayısıyla 12 aa uzunluğundaki M6, M7 ve M10 motiflerinden oluşan tüm peptid kombinasyonları için önce sOPEP skorları ve daha sonra bu peptidlerin docking skorları belirlenmiştir. En düşük sOPEP skoruna sahip iki peptid L12-49 ve L12-22 rekombinant DNA yöntemiyle üretilmek üzere seçilmiştir.

De novo tasarlanmış L12-49 ve L12-22 peptidlerinin aminoasit dizilerinin, bu dizileri kodlayan DNA dizilerine çevrilmesinde, EMBOSS Backtranseq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) programı kullanılmıştır. Peptidlerin kodon optimizasyonu, *P. pastoris* kodon kullanım sıklığı tablosuna göre yapılmıştır. Ardından hedef peptidleri kodlayan DNA dizileri, rekürsif PCR tekniği ile üretilmiştir. Tez çalışmasında klonlama ve ekspresyon amacıyla bir shuttle vektör olan pPICZαA kullanılmıştır. Rekürsif PCR ürünleri *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra aynı enzimlerle kesilen pPICZαA ekspresyon vektörüne bağlanarak pPICZαA-L12-49-6His ve pPICZαA-L12-22-6His rekombinant plazmidleri elde edilmiştir. Ardından rekombinant pPICZαA plazmidler, *E.coli* DH5α hücrelerinde klonlandıktan sonra *P. pastoris* GS115 hücrelerine transforme edilmiştir. Rekombinant hücreler BMGY ortamında 1 gece geliştirildikten sonra BMMY besiyerine alınmış ve çalkalamalı kültür ortamında her 24 saatte bir %1'lik metanol ile indüklenerek 96 saat süresince rekombinant peptidlerin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

4.2. Rekombinant Peptidlerin Kantitatif Analizi

BMMY kültür ortamında metanol ile indüklenen hücreler 96 saat sonra santrifüj edilerek çöktürülmüş ve kültür süpernatantı % 60'lık amonyum sülfat ile çöktürülerek rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidleri konsantre edilmiştir. Ardından pellet 0,1 M fosfat tamponu ile çözündürüldükten sonra sırasıyla 10 kDa ve 3 kDa'lık filtrelerden geçirilmiştir. rL12-49 ve rL12-22 peptidlerinin konsantrasyonları ELISA yöntemi ile analiz edilmiş ve sırasıyla $128 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ ve $81 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Tespit edilen peptid konsantrasyonları, *P. pastoris* GS115 ekspresyon sisteminin kullanıldığı literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Buna göre; Huang vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. pastoris* GS115 konak hücresinde *Amaranthus caudatus*'un tohumlarından elde edilen Ac-AMP2 ve *Macadamia integrifolia*'dan elde edilen MiAMP1 peptidlerinin üretimi gerçekleştirilmiş ve maksimum üretim konsantrasyonları, Ac-AMP2 peptidi için 60 saatte 210 mg/L ve MiAMP1 peptidi için ise 96 saatte 220 mg/L olarak bulunmuştur. Meng vd. (2016) ise pPICZαA vektörünü kullanarak AOX promotörü kontrolü altında Mytichitin-A peptidinin *P. pastoris*'te ekstrasellüler olarak üretimini gerçekleştirmiş ve rMytichitin-A ekspresyonu için en uygun kültür koşulunda (28°C'de 96 saat, %1 metanol indüksiyonu) bile verimin ancak 45,5 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ulaşabildiği belirtilmiştir. Yine benzer bir çalışmada Meng vd. (2017), Meksika avokado meyvesinden izole ettikleri PaDef antimikrobiyal peptidinin *P. pastoris*'te heterolog ifadesi için pPICZα-A vektörünü kullanmış ve rPaDef peptidi için maksimum üretim konsantrasyonu 87,2 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Chen vd. (2016b), *P. pastoris* GS115 konak hücresini kullanarak, plektasinin indüklenebilir ve konstitütif ifadesinin verim üzerindeki etkisini araştırmış ve indüklenebilir pPICZαA vektörünün verimi 880 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir.

P. pastoris konak hücrelerinde rekombinant proteinlerin yüksek verimde üretimi için, kültür ortamı, oksijen seviyesi, pH, sıcaklık, metanol indüksiyonu, karbon kaynaklı besleme hızı, hedef gen kopya sayısı ve proteolitik parçalanma gibi parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir (Higgins ve Cregg, 1998). Biyoreaktör ortamında bu parametrelerin birçoğunun kontrolü sağlanabilse de, çalkalamalı kültür ortamında yüksek peptid üretimi için gerekli olan oksijen, yeteri kadar sağlanamamaktadır. Ayrıca kültür ortamına eklenen metanol, hem karbon kaynağı hem de rekombinant proteinlerin ekspresyonunun indükleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ancak metanolün fazla olduğu

durumlarda formaldehit, formik asit gibi metabolitler, *P. pastoris*'e karşı toksik etki göstermektedir (Meyer vd., 2008). Bu nedenle metanol konsantrasyonu, toksik sınırın altında ve transkripsiyonu başlatabilecek bir seviyede tutulmalıdır. Bu amaçla kesikli beslemeli sistemlerin kullanılması önerilmiştir (Macauley-Patrick vd., 2005). Bunun dışında, promotör baskılama gücü düşük bir karbon kaynağı kullanılarak da daha yüksek verimde üretim sağlanabildiği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Sreekrishna, 2013). *P. pastoris* ekspresyon sisteminde metanol indüksiyonundan önce hücre gelişimi aşamasında kullanılan karbon kaynakları gliserol ve sorbitoldür (Berrios vd., 2017). Karbon kaynağı olarak gliserolün tercih edilmesi, daha yüksek biyokütle verimiyle sonuçlansa da AOX promotörünü baskılayıcı etkisinden dolayı düşük seviyede rekombinant protein üretimine neden olmaktadır. Bu amaçla, gliserol yerine, promotör baskılayıcı olmayan sorbitol kullanılarak protein üretiminin artırılabilirdiği belirtilmiştir (Jungo vd., 2007; Ünver, 2014). Rekombinant peptidlerin üretimindeki bir diğer sorun da proteolitik bozunmaların neden olduğu kalıcı protein degradasyonlarıdır (Zhou ve Zhang, 2002). Proteaz eksikliği (protease deficient) olan suşların kullanımı ve proteaz inhibitörleri veya kazaminoasit eklenmesi yoluyla bu tarz proteolitik bozunmaların önlenebileceği belirtilmiştir (Goodrick vd., 2001; Kurokawa vd., 2002).

4.3. Antimikrobiyal Etki

Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin antimikrobiyal etkileri, 6 gram-pozitif bakteri (*B. cereus* (ATCC 11778), *B. cereus* (ATCC 33019), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* (ATCC 29213), Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (ATCC 43300)), 10 gram-negatif bakteri ((*E. cloacae* (ATCC 13047), *E. sakazakii* (klinik izolat), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *P. aeruginosa* (Klinik izolat), *K. pneumoniae* (klinik izolat), *Y. enterocolitica* (ATCC 27729), *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911), *A. baumannii* (klinik izolat)) ve 3 maya ((*C. albicans* (ATCC 10223), *C. albicans* (ATCC 90023), *C. glabrata* (klinik izolat)) suşu olmak üzere toplam 19 adet patojen mikroorganizma üzerinde, agar difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiştir.

rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin agar difüzyon testi sonucunda test edilen mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve Gram-pozitif

bakterilere karşı $11,40 \pm 0,28 - 19,97 \pm 0,47$ mm, Gram-negatif bakterilere karşı $12,71 \pm 0,26 - 21,82 \pm 0,08$ mm, mayalara karşı $10,03 \pm 0,18 - 14,42 \pm 0,25$ mm arasında değişen zonlar oluşturdukları gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilinin ($200\mu\text{g/ml}$) ise Gram-pozitif bakterilere karşı $7,77 \pm 0,12 - 38,12 \pm 0,12$ mm, Gram-negatif bakterilere karşı $17,1 \pm 0,28 - 23,86 \pm 0,08$ mm arasında değişen zonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Agar difüzyon test sonuçlarına göre, rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidleri, en büyük inhibisyon zon çapını *Y. enterocolitica* (ATCC 27729)'a karşı oluşturken, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25223 ve MRSA ATCC 43300 suşlarına karşı belirgin bir inhibisyon zonu oluşturamadıkları tespit edilmiştir.

Agar difüzyon testi sonuçlarına göre, rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin *E. sakazakii* (klinik izolat), *K. pneumoniae* (klinik izolat), *Y. enterocolitica* (ATCC 27729) suşları hariç test edilen diğer tüm mikroorganizmalara karşı oluşturdukları zon çapları arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). rL12-49-6His peptidinin *B. cereus* (ATCC 11778), *B. cereus* (ATCC 33019), Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922) ve *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894)'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları rL12-22-6His peptidine kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede ($p < 0.01$) daha büyük bulunurken, *E. cloacae* (ATCC 13047), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911), *A. baumannii* (klinik izolat) ve 3 mayaya (*C. albicans* ATCC 10223, *C. albicans* ATCC 90023, *C. galabrata* (klinik izolat)) karşı oluşturdukları zon çapları önemli derecede ($p < 0.01$) küçük bulunmuştur. Ampisilinin *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* (ATCC 29213), Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (ATCC 43300), *E. sakazakii* (klinik izolat), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911)'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları her iki peptidle kıyaslandığında daha büyük bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin agar difüzyon ve MİK testi sonuçları birçok bakteri suşunda paralellik gösterse de bazı suşlara karşı tespit edilen sonuçların tutarlı olmadığı gözlenmiştir. Örneğin her iki peptidin de *K. pneumoniae* (klinik izolat) ve *A. baumannii* (klinik izolat) suşlarına karşı oluşturdukları zon çapları hemen hemen aynı büyüklükte olduğu halde rL12-22-6His peptidinin bu bakterilere karşı verdiği MİK değerleri L12-49-6His peptidine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Dickert

vd. (1981) tarafından yapılan çalışmada antibiyotiklerin (Ampicillin, Mezlocilin, Azlocillin, Ticarcillin, Piperacillin, Cephalothin, Cefazolin, Cephalexin, Cefaclor, Cefamandole, Cefoxitin, Cefuroxime, Cefotaxime, Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin, Netilmicin, Amikacin) bazı test bakterilerine karşı oluşturdıkları zon çapları ve MİK değerleri eş zamanlı ölçülerek bu iki test arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Buna göre, korelasyon derecesinin hem antibiyotiğe hem de test edilen suşa bağlı olduğu ve disk difüzyon sonuçlarının %71 ila %90 arasında MİK değerleri ile tutarlı olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan Yan vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ince bağırsaktan tanımlanan NK-Lizin'den yeni bir antimikrobiyal peptid (NK-18) elde edilmiş ve bu peptidin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi test edilmiştir. Buna göre, peptid konsantrasyonundaki artışla beraber inhibisyon zon çapının da arttığı görülsede, 30 µg/ml'lik belirli bir konsantrasyonun üzerinde zon çaplarında belirgin bir büyüme gözlenmemiştir. Bu nedenle düşük peptid konsantrasyonlarında, inhibisyon zon çapı ve MİK arasında daha yüksek bir korelasyonun bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Agar diffüzyon testi sonuçlarına göre ampisilinin, *K. pneumoniae* (klinik izolat), *A. baumannii* (klinik izolat) ve *P. aeruginosa* (klinik izolat)'ya karşı inhibisyon zonu oluşturmadağı görülmüştür. Bu sonuçlar Khatoon vd. (2019), tarafından ampisilin (2-15 mM) ve gümüşün (2-10 mM) ikili kullanımlarına dayanan nanoformülasyonların, çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı etkisinin araştırıldığı çalışma ile benzer bulunmuştur. Buna karşılık rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin test edilen Gram-pozitif, Gram-negatif bakteri ve maya suşlarının tümünde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonları incelendiğinde, her iki peptidin de *S. aureus* ve MRSA suşlarına karşı verdiği MİK değerleri >128 µg/ml olarak bulunmuştur. Bunların dışındaki test edilen diğer Gram pozitif bakteri suşlarına karşı MİK değerlerinin rL12-49-6His peptidinde 0,25-16 µg/ml, rL12-22-6His peptidin de ise 0,25-2 µg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. rL12-49-6His peptidinin test edilen Gram negatif bakteri suşlarına karşı MİK değerleri 8-64 µg/ml arasında değişirken, rL12-22 peptidinin MİK değerleri 4-8 µg/ml arasında bulunmuştur. Yine test edilen maya suşlarına karşı rL12-49-6His peptidinin MİK değerlerinin 32-64 µg/ml, rL12-22-6His peptidinin ise 8-16 µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre her iki peptid de test edilen patojen mikroorganizmalar üzerindeki en yüksek inaktivasyon etkisini *L. monocytogenes* ATCC

7644 suşuna karşı göstermiştir. Bu sonuçlar rL12-22-6His peptidinin antimikrobiyal etkisinin rL12-49-6His peptidinden yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde AMP dizilerinin; doğal kaynaklı peptidlerden veya bu peptidlerin modifikasyonlarından elde edildiği veya da sıfırdan (*de novo*) tasarlandığı görülmektedir. Bu peptid dizilerinin modifikasyonu veya *de novo* peptid tasarımı amaç antimikrobiyal aktivite ve proteolitik degradasyona karşı direnci maksimuma çıkarırken konakçıya karşı toksisiteyi en aza indirmektir. Nitekim birçok çalışmada geliştirilen yeni tasarım stratejileri ile elde edilen çoğu peptidin yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin doğal peptidlerin modifikasyonu üzerine yapılan bir çalışmada bir kum kurdu (*Arenicola marina*) peptidi olan NZ17074 kullanılarak N2 peptidi tasarlanmıştır. Ardından *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretilen N2 peptidinin, mevcut doğal peptide kıyasla *E. coli* (CVCC 195)'ye karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Yang vd., 2016). Kim vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise yüksek seçicilik, aktivite ve stabiliteye sahip *de novo* peptidlerin tasarlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla 15 aa uzunluğunda, α -sarmal ve amfipatik yapıda, hidrofobikliği $<50\%$ olan, proteolitik kesim bölgelerinden arındırılmış toplam 7 adet (GNU_{1.7}) peptid tasarlanmıştır. Çalışma sonucunda, peptidlerin Gram pozitif bakterilerden *B. subtilis* KCTC 3038 ve *S. aureus* ATCC 15752 suşlarına, Gram negatif bakterilerden *E. coli* ATCC 27325, *S. Typhimurium* KCTC 2370 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına ve mayalardan *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı MİK değerlerinin 2 mg/L- ≥ 64 mg/L arasında değiştiği belirlenmiştir. Wiradharma vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada motif tabanlı bir tasarım yaklaşımı geliştirilmiş ve (XXYY)_n (X: hidrofobik kalıntı, Y: katyonik kalıntı ve n: tekrar birimlerinin sayısı) şablon dizisini esas alan α -sarmal peptidler tasarlanmıştır. Tasarlanan katyonik amfifilik peptidlerin MİK değerleri *B. subtilis* (ATCC 23857)'e karşı 10-500 mg/L; *C. albicans* (ATCC 10231)'a karşı ise 50-500 mg/L aralığında bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen α -sarmal KL12 peptidi, Wiradharma ve ark., (2013) tarafından yapılan bir başka çalışmada, şablon olarak kullanılmış ve nokta mutasyonu yaklaşımıyla 12 aa uzunluğunda idealize edilmiş yüz amfifilikliğine sahip peptid analogları elde edilmiştir. KL12 peptidi ve KK12a, KK12b, LK12 ve LL12a analoglarının MİK değerleri *S. aureus*'a karşı ≥ 500 mg/L; *P. aeruginosa*'a karşı 31-500 mg/L ve *E. coli*'ye karşı 125-500 mg/L; *C. albicans*'a karşı ise 63-500 mg/L aralığında bulunmuştur.

Literatürde AMP'lerin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretimine yönelik birçok çalışma yapılmış ve üretilen rekombinant AMP'lerin aktivitesi patojen mikroorganizmalara karşı test edilmiştir. Örneğin; Li vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *Plantarisin E* (PlnE) ve *Plantarisin F* (PlnF) bakteriyosinlerinin hibridizasyonu ile elde edilen *Plantarisin EF* (PlnEF) *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretilerek rekombinant EF-1 peptidi elde edilmiştir. Bu sayede esas olarak Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkili olan PlnE (33 aminoasit kalıntısı) ve PlnF'den (34 aminoasit kalıntısı) oluşan PlnEF'nin hem Gram-negatif bakterileri üzerindeki etkisini arttırmak hem de üretimini basitleştirmek amaçlanmıştır. Bunun için, sentezlenmiş PlnEF ile rekombinant EF-1 peptidi karşılaştırılmıştır. Rekombinant EF-1 (rEF-1) peptidinin sentezlenmiş PlnEF'ye kıyasla hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde daha güçlü bir antimikrobiyal aktivite ve bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir. rEF-1 peptidinin MİK değerleri *S. aureus* (CVCC 1882) ve *S. Typhimurium* (ATCC 14028)' ye karşı sırasıyla 12,5 µM ve 25 µM; *E. coli* (K88)' ye karşı ise 3,125 µM olarak bulunmuştur.

Zhan vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, LL37'nin merkez bölgesinde bulunan FD (FKRIVQRIKDFLR) dizisindeki D aminoasidinin yerine R aminoasidi kullanılarak FR (FKRIVQRIKRFLR) antimikrobiyal peptitidi elde edilmiş ve *P. pastoris* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretilerek Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. FD için MİK değerleri; *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 ve *S. Typhimurium* C 7731 suşlarına karşı 32 µg/ml olarak bulunurken *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı >32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Modifiye FR peptidinin ise FD peptidine kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve test edilen suşlara karşı MİK değerlerinin 7,11 ile 16 µg/ml arasında değiştiği bildirilmiştir. Meng vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *Venerupis philippinarum* midyesinden izole edilen VpDef peptidinin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. *P. pastoris* GS115 ekspresyon sisteminde ifade edilen rekombinant VpDef peptidinin MİK değerlerin, *E. coli* O157 (ATCC 35150)'ye karşı 50 µg/ml ve *E.coli* (ATCC 10305)'ye karşı 75 µg/ml; *L. monocytogenes* (ATCC 21633)'e karşı 75 µg/ml, *B. subtilis* (Lzz-133)'e karşı 95 µg/ml ve *S. aureus* (ATCC 25923)'a karşı 120 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tez çalışmasında kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin MİK değerleri; *B. cereus* ATCC 33019 ve *B. cereus* ATCC 11778 suşlarına karşı 2-16 µg/ml; *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894)' ye karşı 8-64 µg/ml; *E. coli* (ATCC 25922)' ye karşı 4-16 µg/ml; *P. aeruginosa* (klinik izolat)' ya karşı 8-16 µg/ml; *S. Typhimurium* (ATCC 14028)' karşı 4-8 µg/ml aralığında, *L. monocytogenes* (ATCC 7644)' e karşı ise 0,25 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu bulgular Meng vd. (2018) ve Zhan vd. (2021) tarafından yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin söz konusu çalışmalardaki peptidlerin aktivitelerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Meng vd. (2018), Li vd. (2020) ve Zhan vd. (2021) tarafından yapılan çalışmalarda, *S. aureus*' a karşı tespit edilen MİK değerleri, tez çalışmasında üretilen rekombinant peptidlerin *S. aureus* suşlarına karşı belirlenen MİK değerlerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin 2 farklı *C. albicans* suşuna karşı 8-64 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda inhibitör etkide bulunduğu tespit edilmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin *C. albicans* suşlarına karşı belirlenen MİK değerlerinin Wiradharma vd. (2013) tarafından tasarlanan KL12 peptidi ve analoglarının *C. albicans* suşlarına karşı tespit edilen MİK değerlerine kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur.

Rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *C. albicans* ATCC 10231 suşları üzerinde oluşturdukları hücresel hasarlar SEM görüntü analizi ile incelenmiştir. 1×MİK seviyesindeki rekombinat peptidlerle muamele edilen *E. coli* O157:H7 suşunun hücre morfolojisine ait görüntüler incelendiğinde hücre yüzeyde belirgin pürüzler ve oyuklar gözlenirken, *C. albicans* hücrelerinde de deformasyona bağlı hücresel sızıntılar, çentikler ve oyuklar belirlenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen peptidlerin bakteri ve maya morfolojisi üzerindeki etkisi literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Meng vd. (2019) *Benincasa hispida*'nın tohumlarında tanımladıkları Hispidalin'in *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretimini gerçekleştirmiş ve rHispadilin'in *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* O157 ATCC 35150 suşları üzerindeki morfolojik hasarını incelemişlerdir. SEM incelemesi sonucunda, 1XMİK (40 µg/ml) rHispadilin ile muamele edilen *E. coli* O157 (ATCC 35150) hücrelerinin yüzeyinde çentikler oluşurken, 4XMİK (160 µg/ml) seviyesinde bakteri morfolojisinde önemli deformasyonlar ve hücre duvarında çöküntüler görülmüştür. Bu

tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin *E. coli* O157 ATCC 35150 suşu üzerindeki 1xMİK seviyesindeki hücresel hasarlarının Meng vd. (2019)'nin çalışmasındaki 1xMİK ve 4XMİK seviyelerine kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Seyedjavadi vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Matricaria chamomilla* L. çiçeklerinden elde edilen MCh-AMP1'in *C. albicans* üzerindeki etkisi araştırılmış ve mantar hücrelerinin morfolojik hasarı, SEM elektron mikroskobu ile analiz edilmiştir. MCh-AMP1 (32 µg/ml) ile muamele edilmiş hücrelerde, hücre içi sızıntılar, derin kırışıklıklar ve şekil bozuklukları görülmüştür. Tez çalışmasında üretilen peptidlerin 1xMİK seviyesinde, *C. albicans* üzerindeki etkisi Seyedjavadi vd. (2020) tarafından yapılan çalışmayla kıyaslandığında benzer hücresel hasarların oluştuğu tespit edilmiştir.

4.4. Hemolitik Etki

Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hemolitik aktivitesi fare eritrositine karşı test edilmiş ve hemoliz yüzdeleri belirlenmiştir. Her iki peptidin de >32 µg/ml konsantrasyonlarında %100 hemolitik aktivite sergilediği, 4µg/ml ve altındaki konsantrasyonlarında ise hemolitik aktivite göstermediği bulunmuştur.

Literatürdeki benzer çalışmalarda, doğal ve modifiye AMP'lerin hemolitik aktiviteleri incelenmiş ve bazı modifikasyonların hemolitik aktiviteyi olumlu yönde etkileyebileceği bildirilmiştir. Zhan vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, dimerik LL37 varyantı olan (FR)₂ peptidi tasarlanmış ve *P. pastoris*'te heterolog ifadesi gerçekleştirilmiştir. (FR)₂ peptidi yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmakla birlikte 128 µM seviyesinde kan hücrelerinin yaklaşık %43'ünü parçaladığı bildirilmiştir. Bu nedenle (FR)₂ peptidine, proteinler arasındaki istenmeyen etkileşimleri engelleyen bir rijit bağlayıcı "GGGGS" dizisi eklenerek LG (FKRIVQRIKRFLRGGGGSFKRIVQRIKRFLR) peptidi elde edilmiştir. Yapılan modifikasyon sonrası rLG peptidinin en yüksek peptid konsantrasyonunda (128 uM), kan hücrelerinin yaklaşık %23'ünü parçaladığı dolayısıyla hemolitik aktivitede iyileşme sağlandığı gösterilmiştir. Kim vd. (2013) tarafından yüksek stabilite ve seçiciliğe sahip antimikrobiyal peptidlerin *de novo* tasarımı üzerine yapılan bir çalışmada 7 adet peptid (GNU₁₋₇) elde edilmiştir. Bu peptidlerden antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan GNU6 ve GNU7 peptidlerinin hemolitik aktiviteleri insan

eritrositlerine karşı test edilmiş ve en yüksek konsantrasyonda ($>64\text{mg/L}$) bile hemolitik etki göstermedikleri tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada motif tabanlı *de novo* tasarım yaklaşımı kullanılarak α -sarmal amfifilik peptidler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla bir $(XXYY)_n$ (X: hidrofobik kalıntı, Y: katyonik kalıntı ve n: tekrar birimlerinin sayısı) şablon dizisi kullanılmıştır. Peptidlerin insan kan hücrelerine karşı hemolitik aktivitesi test edilmiş ve şablon dizisinin 2 veya 3 kez tekrarlandığı peptidler 500 mg/L seviyesine kadar (test edilen en yüksek konsantrasyonlar) hemolitik bulunmazken, 4 kez tekrarlanan peptidlerin düşük konsantrasyonda (31 mg/L) bile yüksek hemolitik aktivite ($>60\%$ hemolitik) gösterdiği tespit edilmiştir (Wiradharma vd., 2011). Meng vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada da rekombinant yöntemle üretimi gerçekleştirilen midye kaynaklı bir defensin olan VpDef peptidinin tavşan eritrositlerine karşı hemolitik aktivitesi test edilmiş ve rVpDef peptidinin $115\text{ }\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda herhangi bir hemolitik aktivite göstermediği belirtilmiştir (Meng vd., 2018). Başka bir çalışmada da bir mantar defensini olan plectasin ve varyantı olan NZ2114'nin insan eritrositlerine karşı farklı konsantrasyonlardaki hemoliz oranları test edilmiş ve plectasinin $125\text{ }\mu\text{g/mL}$ seviyesindeki hemoliz oranı $\% 5,19$ olarak bulunmuşken; NZ2114'nin farklı konsantrasyonlardaki ($0-128\text{ }\mu\text{g/mL}$) hemoliz oranının $\% 0,1$ 'den daha düşük olduğu belirtilmiştir (Zhang vd., 2011; Zhang vd., 2014). Meng vd. (2019) *Benincasa hispida*'nın tohumlarında tanımladıkları Hispidalin'in *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretimini gerçekleştirmiş ve rHispidalin'in $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda bile $\%2$ 'den daha az bir hemolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hemoliz seviyesinin, Zhan vd. (2021), Kim vd. (2013) ve Wiradharma vd. (2011) tarafından yapılan çalışmadaki peptidler ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.5. Stabilite Testleri

4.5.1. Termal stabilite

Çalışma kapsamında üretilen peptidler farklı sıcaklıklara (4°C , 24°C , 65°C ve 95°C) maruz bırakılmış ve peptidlerin termal stabiliteleri, *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı gösterdiği antibakteriyel aktivitedeki değişime göre agar difüzyon metodu ile

değerlendirilmiştir. rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin 4°C ve 24°C'deki inhibisyon zon çapları incelendiğinde, istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p>0.01$) bulunmazken, 65°C ve 95°C'ye maruz bırakılan her iki peptidin de 24°C'ye kıyasla inhibisyon zon çapında sırasıyla %6'lık ve %16'lık bir küçülme olmuştur ($p<0.01$).

Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant peptidlerin termal stabilite değerleri literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Kraszewska vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada bitki kaynaklı dokuz defensin benzeri peptid ile insan defensini HBD3 peptidinin antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Peptidlerin termostabiliteleri 100°C'de 10 dakikalık ısı işlem sonrasında 25 °C'ye hızlıca soğutularak *Lactobacillus brevis* L1055'e karşı test edilmiştir. Bunun sonucunda, *Vicia faba*'dan izole edilen Fabatin-2 defensin benzeri peptid termotabil bulunurken, *Vigna unguiculata*'dan izole edilen defensin benzeri Cp-Thionin-2 peptidinin inhibisyon zon çapında yaklaşık % 18 oranında bir küçülme olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan insan defensini HBD3 peptidinin de ısı işleminden etkilendiği ve antimikrobiyal aktivitesinde %70'lik bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Mantar kaynaklı dokuz defensin benzeri peptidin karakterize edildiği bir çalışmada ise, en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip *Pyronema omphalodes* kaynaklı P2 peptidinin termal stabilitesi, farklı sıcaklıklarda (4, 20, 40, 60, 80 ve 100°C) yapılan muamelenin ardından çoklu ilaç dirençli (MDR) *S. aureus* (ATCC 43300)'a karşı gösterdiği antibakteriyel aktivitedeki değişime göre değerlendirilmiştir. Sonuçta 80 °C'ye kadar yapılan muameleler sonrasında peptidin antimikrobiyal aktivitesinde bir kayıp olmazken, 100 °C'deki ısı işleminden sonra aktivitesini ancak % 25 oranında koruyabildiği tespit edilmiştir (Yang vd., 2019a). Dong vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada ise, *Synicium turgens*'ten izole edilen Turgencin A peptidinin *P. pastoris*'te ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve rTurgencin A'nın termal stabilitesi 5 farklı sıcaklıkta (4, 25, 37, 65, 90 °C) *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı test edilmiştir. Sonuçta, rTurgencin A'nın 4, 25, 37°C'lik sıcaklık uygulamalarından sonra iyi bir stabilite gösterdiği, 90 °C'de 1 saat muameleden sonra ise, inhibisyon zon çapının, maksimum inhibisyon zon çapının %55'i kadar olduğu bulunmuştur. İnhibisyon zon çapındaki azalmaya rağmen yine de yüksek bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğinden rTurgencin A peptidin termotabil olduğu kabul edilmiştir. Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant peptidlerin termal stabiliteleri, Kraszewska vd. (2016) sonuçlarıyla tutarlılık gösterirken Yang vd. (2019a) ve Dong vd. (2023)'ın analiz ettiği peptidlerden daha yüksek bulunmuştur.

4.5.2. Proteaz Stabilitesi

Tez çalışmasında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin proteaz stabilitesi, *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı agar difüzyon metodu ile değerlendirilmiştir. Rekombinant peptidlerin proteaz enzimleriyle muamelesi sonrasında *E. coli* (ATCC 25922)'ye karşı belirlenen inhibisyon zon çaplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Dolayısıyla rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin proteaz enziminin 2,4 U/g seviyesine kadar stabilitesini koruduğu görülmüştür.

Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant peptidlerin proteaz stabiliteleri literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Meng vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *Benincasa hispida*'nın tohumlarından tanımlanan Hispidalin'in proteolitik stabilitesi, farklı proteolitik enzimlerle (papain, pepsin, tripsin, proteinaz K) 37 °C'de 2 saat boyunca muamele edilerek *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı test edilmiştir. rHispidalin, pepsin ve papaine enzimleriyle muamele edildiğinde inhibisyon zon çaplarında sırasıyla %60 ve %50 oranında bir azalma olurken; tripsin ve proteinaz K enzimleriyle muamele edildiğinde inhibisyon zon çaplarında kontrole kıyasla değişim olmamıştır. Buna göre rHispidalin, pepsin ve papaine enzimlerine karşı duyarlı, tripsin ve proteinaz K enzimlerine karşı ise dirençli bulunmuştur. Başka bir çalışmada *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretilen Plektasin, 37 °C'de 4 saat boyunca papain, pepsin ve tripsin enzimleriyle muamele edilerek inhibisyon zon çaplarındaki değişim *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı test edilmiştir. Sonuçlar rPlektasin'in pepsin ve papaine karşı oldukça dirençli, tripsine karşı ise duyarlı olduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2021). Meng vd. (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise rVpDef peptidin proteolitik stabilitesi 4 farklı enzim (tripsin, proteinaz K, pepsin ve papain) kullanılarak test edilmiştir. Enzimlerle muamele edilen peptidin (37 °C'de 2 saat) *L. monocytogens*'e karşı inhibisyon zon çapında belirgin bir değişim olmadığı dolayısıyla test edilen 4 farklı enzime karşı dirençli olduğu belirtilmiştir. Literdeki çalışmalara benzer olarak bu tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin de proteaz enzimine dirençli olduğu gözlenmiştir.

4.6. rL12-49-6His ve rL12-22-6His Peptidlerinin Karşılaştırılması

Tez çalışmasında Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etkili AMP'lerin tasarımı için motif tabanlı *de novo* peptid tasarım yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu amaçla DBAASP veritabanından yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler seçilmiştir. Seçilen bu peptidler CAMP_{RS} programı kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerine göre sıralanmış ve benzerlik oranı yüksek olanlar (%80) CD-HIT programı kullanılarak elenmiştir. Geriye kalan 88 adet peptid sekansındaki korunmuş motifler MEME Suite 5.5.0 motif bulma aracı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen 15 adet motif (M1,.....M15), GM1(X)M2(X)M3 başlangıç şablonundaki M1, M2 ve M3'e karşılık gelen pozisyonlara sırasıyla yerleştirilmiş ve motiflerin 3'lü kombinasyonlarını içeren peptid sekansları elde edilmiştir. Bu peptid kombinasyonlarındaki her bir (X) joker aminoasidi yerine K, I, L ve R aminoasitlerinden yalnızca biri yerleştirildiğinde toplamda 720 adet peptid dizisi elde edilmiştir. Daha sonra tasarlanan bu peptidlerin biyoinformatik araçlar kullanılarak fizikokimyasal özellikleri test edilmiş ve M6, M7 ve M10 motifleri ile L joker aminoasidinden oluşan 2 peptidin belirlenen kriterlere en uygun peptidler olduğu belirlenmiştir. Her iki peptidi oluşturan motifler ortak olsada, L12-49 peptidinde M6 motifi merkez konumda, M7 motifi C-terminalde ve M10 motifi N-terminalde konumlanmışken, L12-22 peptidinde M6 motifi C-terminalde, M7 motifi N-terminalde ve M10 motifi ise merkezde konumlanmıştır. Peptidlerin aynı aminoasit kompozisyonuna sahip olmaları, hidrofobiklik, net yük, izoelektrik nokta, GRAVY skoru, boman indeksi, alifatik indeks, suda çözünürlük ve hemolitiklik skorlarının aynı bulunmasına neden olurken, motiflerin konumsal farklılığı antimikrobiyal aktivite, ikincil yapı, hidrofobik moment, helisite, stabilite, transmembrane bölgeler, SOPEP skorları, doking skorları ve hidropati grafiklerinde farklılıklara neden olmuştur. Buna göre tez çalışmasında tasarlanan L12-49 ve L12-22 peptidlerinin hidrofobikliği %35.9, net yükü +7.9, izoelektrik noktası 10.71, GRAVY skoru -0.036, boman indeksi 1.19, alifatik indeksi 100.26, suda çözünürlüğü 0.763 ve hemolitik aktivitesi 0.48 olarak tahminlenmiştir. Rekombinant yöntemle üretimde peptidlerin C- terminaline 6XHis etiketi eklenmiştir. 6 His kalıntısı eklenmiş rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hidrofobikliği %31.1, net yükü +8.5, izoelektrik noktası 10.71, GRAVY skoru -0.458, boman indeksi 1.65, alifatik indeksi 86.89, suda çözünürlüğü 0.735 ve hemolitik aktivitesi 0.47 olarak tahminlenmiştir. Daha sonra her iki peptidin de *P. pastoris* ekspresyon sisteminde

rekombinant yöntem ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında üretilen rekombinant peptidlerde antimikrobiyal aktivite, hemolitik aktivite ve stabilite testleri yapılmıştır.

Tez çalışmasında motif temelli bir tasarım yaklaşımı geliştirilmiş ve bu amaçla MEME Suite 5.5.0 motif keşif aracı kullanılmıştır. MEME, hizalanmamış nükleotid ve protein dizilerindeki yinelenen ve sabit uzunluktaki motifleri keşfetmemize izin veren çevrimiçi bir araçtır. MEME motif bulma aracı kullanılarak motifler E-değerine (istatistiksel olarak en anlamlı) göre sıralanmış ve 11,12 ve 13 aa uzunluğundaki her bir motif sınıfından en düşük E-değerine sahip 5'er adet motif seçilmiştir. Bunlar arasından 12 aminoasit uzunluğundaki M6 ("SLLNKLSCKLSG"), M7 ("DAIKKVAKAAGK") ve M10 ("HCRARGRLGGYC") motifleri ve L joker aminoasidi kullanılarak elde edilen L12-49 ve L12-22 peptidlerinin test edilen fizyokimyasal parametrelere göre üretim için en uygun peptidler olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında *P. pastoris* konak hücrelerinde ifade edilen rL12-22-6His peptidinin *L. monocytogenes*, *S. aureus* suşları ve MRSA hariç test edilen diğer tüm bakteri ve maya suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin rL12-49-6His peptidine kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivitedeki bu artışın motiflerin konumsal değişikliğinden ileri geldiği sonucuna varılmıştır. Özellikle rL12-22-6His peptidinin C-terminalinde bulunan ve hidrofobikliği daha yüksek olan "SLLNKLSCKLSG" motifinin membranla etkileşim potansiyelinin, rL12-49 peptidinin C-terminalinde bulunan "DAIKKVAKAAGK" motifine kıyasla daha iyi olduğu düşünülmüştür. AMP'lerin N- ve C-terminal bölgelerinin hidrofobikliğinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Cho vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, 25 aminoasit uzunluğundaki Pleurocidinin N ve C-terminallerindeki hidrofobik kalıntıların silinmesinin peptidin test edilen bakteri suşlarına karşı MİK değerlerinin yükselmesine neden olduğu, dolayısıyla N- ve C-terminal bölgelerindeki hidrofobikliğinin Pleurocidinin antibakteriyel aktivitesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Literatürde aynı aminoasit kompozisyonuna sahip peptidler içindeki motiflerin konumsal değişiminin aktivite üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, aynı aminoasit kompozisyonundaki peptidlerin yapı-aktivite ilişkisi üzerine yapılan çalışmaların daha çok retro-inverso peptid tasarımları üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür. Bu tarz tasarımlarda asıl amaç doğal bir peptidi tersine

çevirerek elde edilen retro inverso analoglarının yapı ve işlevinin incelenmesidir. Örneğin; Neubauer vd. (2017) tarafından, doğal kaynaklı 6 farklı AMP (aurein 1.2, CAMEL, citropin 1.1, omiganan, pexiganan ve temporin A) ve retro analoglarının, fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, retro omiganan (r-omiganan) dışındaki tüm retro peptidlerin, ters çevrilmemiş doğal peptidlere kıyasla daha düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, peptidlerin aminoasit kompozisyonu değişmese bile, dizisi içindeki aminoasitlerin komunsal değişiminin antimikrobiyal aktiviteyi de değiştirebileceğini göstermiştir. Nitekim tez çalışmasında elde edilen peptidlerdeki motiflerin dizi içindeki farklı yerleşimleri antimikrobiyal aktivitelerinde farklılıklara neden olmuştur.

Yapılan çalışmalarda peptid dizilerinin pozitif yüklü N-terminal alanı ile birlikte hidrofobik C-terminal alanına da sahip olmasının, biyo-aktivite için oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (Nielsen vd., 2021). Peptidlerin hidrofobik bölgelerinin tahmininde kullanılan Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiğine göre, L12-22 peptidinde, pozitif yüklü aminoasitlerin N terminalde ve hidrofobik aminoasitlerin de C -terminalde yoğunlaştığı gözlenmiş ve bu durum L12-22 peptidin L12-49 peptidine kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesiyle ilişkilendirilmiştir. Her iki peptid dizisini oluşturan motifler aynı olsa da konumlarının farklı olması, hidrofobik bölgelerin peptid içerisinde farklı şekilde dağılmasına yol açmıştır. Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiğine göre; L12-49 peptidinde merkez konumda, L12-22 peptidinde ise C-terminalde gözlenen yüksek hidrofobikliğin “SLLNKLCKLSG” motifinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar brevinin kaynaklı bir motif olan “SLLNKLCKLSG” motifinin yeni antimikrobiyal peptidlerin tasarımında antimikrobiyal aktivite artırıcı motif olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Zhu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, antimikrobiyal peptidlerin yüksek verimde üretimi için *E. coli*'nin hemolizin A (HlyA) salgılama sistemine dayalı yeni bir üretim platformu geliştirmiş ve bu platformu kullanarak cecropin A (CeA) ve melittin (Mel) antimikrobiyal peptidlerini üretmişlerdir. rCeA peptidinin Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiği incelendiğinde, pozitif yüklü ve hidrofobik aminoasitlerin sırasıyla N ve C -terminalinde konumlandığı görülmüştür. Buna göre bu tez çalışmasında motiflerin peptid içerisindeki konumlarının peptidlerin amfipatik yapısı üzerinde belirleyici rol oynadığı ve dolayısıyla antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin transmembran bölgelerinin ve hücre zarına bağlanma potansiyellerinin tahminlenmesinde Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiği ve TMHMM 2.0 web aracı kullanılmıştır. Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiğinin oluşturulmasında kullanılan Expasy-ProtScale aracında pencere boyutu 9 seçilerek peptidlerin transmembran özellikleri incelenmiştir (Karnati vd., 2022). Buna göre; L12-49 peptidinde en yüksek iki pikin bulunduğu 15-20. aminoasitler arasındaki bölge, L12-22 peptidinde ise 25-35. aminoasitler arasında kalan bölge transmembran bölge olarak tanımlanmıştır. TMHMM 2.0 web aracına göre yapılan incelemede ise, L12-49 peptidinde 5-30. aminoasitler, L12-22 peptidinde ise 20-35. aminoasitler arasındaki bölgeler transmembran bölgeler olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla her iki peptid için de hem TMHMM ve hem de ExpASy-ProtScale aracı ile tahmin edilen transmembran bölgelerin büyük oranda paralellik gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca TMHMM web aracı ile N-terminal bölgenin membrana nüfuz etme olasılığı L12-49 peptidi için 0.58763, L12-22 peptidi için de 0.66541 olarak tahminlenmiştir. Dolayısıyla her iki peptidin de transmembran özellik gösterdiği ancak antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek bulunan L12-22 peptidinin membrana nüfuz etme olasılığının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Karnati vd. (2022) tarafından Bg_9562 antimikrobiyal peptidinin, pirinçte kabuk yanıklığına neden olan *Rhizoctonia solani*'ye karşı etkinliğinin araştırılmış ve Bg_9562'nin transmembran bölgeleri 9 aminoasitlik bir pencere boyutu kullanılarak Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiğine göre belirlenmiştir. Grafikteki tepe noktaları, proteindeki olası transmembran bölgeler olarak tanımlanmış ve TMHMM sunucusu kullanılarak 83-102. aminoasit pozisyonları arasında tahminlenen transmembran bölge ile de karşılaştırılmıştır. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da TMHMM ile tahmin edilen transmembran bölgelerin Kyte-Doolittle hidrofobisite grafiği ile tahmin edilen bölgeler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Hemolitik aktivite, peptidlerin ökaryotik hücrelere karşı toksisitesini değerlendirmede kullanılan önemli bir parametredir. İnsan, fare, tavşan, koyun gibi canlıların kırmızı kan hücrelerine karşı hemolitik aktivite analizi, AMP'lerin memeli hücrelerine karşı seçiciliğini belirlenmesinde yararlanan en yaygın yöntemdir (Huo vd., 2020). Tez çalışmasında tasarım aşamasında peptidlerin hemolitik aktiviteleri HemoPI programı kullanılarak *in silico* olarak tahminlenmiş ve L12-49 ve L12-22 peptidleri ile rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidleri arasında önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Bu

in silico olarak tahminlenen değerlere paralel olarak her iki peptidin de fare eritrositlerine karşı %hemoliz değerleri birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur. Literatürde peptid içerisindeki motiflerin konumsal değişiminin hemolitik aktivite üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Benzerlik göstermesi bakımından Gopal vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışma incelendiğinde, WK3 peptidi ve retro analogunun KW3 insan eritrositlerine karşı hemolitik aktiviteleri test edilmiş ve her iki peptidin benzer hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki peptid de 400 µM (384 µg/mL) gibi yüksek konsantrasyonlarda dahi hemolitik aktivite göstermediği ve peptidlerin ters çevrilmesinin hemolitik aktivite sonuçlarını etkilemediği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise, genel olarak retro analogların, doğal peptidlere (aurein 1.2, CAMEL, citropin 1.1, omiganan, pexiganan ve temporin A) kıyasla daha düşük hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Neubauer vd., 2017). Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar her ne kadar Gopal vd. (2011) tarafından yapılan çalışmayla tutarlı bulunsun da, Neubauer vd. (2017)'nin bulduğu sonuçlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Ancak retro peptidlerdeki peptid dizisinin ters çevrilmesinin hemolitik aktivite üzerine etkisinin motiflerin konumsal olarak yer değiştirdiği peptidlerden farklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Birçok araştırmacı, peptidlerin antimikrobiyal aktivitesinin genel aminoasit kompozisyonlarına (bazik, asidik, alifatik veya aromatik) ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğunu, bu nedenle de bu özelliklerdeki küçük değişikliklerin, peptidlerin antimikrobiyal aktivitesini önemli düzeyde etkileyebileceğini belirtmiştir (Hilper vd., 2006; Findlay vd., 2010). Tez çalışması kapsamında üretilen peptidler aynı aminoasit kompozisyonlarına sahip olduğundan çoğu fizikokimyasal özelliği de aynı bulunmuştur. Ancak motiflerin farklı pozisyonlardaki yerleşimi peptidlerin ikincil yapılarında, hidrofobik momentlerinde ve antimikrobiyal aktivitelerinde farklılıklara yol açmıştır.

AMP'ler genellikle yüksek hidrofobik moment sahiptir ve hidrofobikliğe kıyasla hidrofobik moment ile antimikrobiyal aktivite arasında daha doğrudan bir korelasyon gözlenir. Genellikle hidrofobik moment arttığında antimikrobiyal aktivite de artar (Lee vd., 2004; Almaaytah vd., 2012; la Salud Bea vd., 2015). Örneğin la Salud Bea vd. (2015)'nin *Buthus martensii* akrebinde tanımlanan BmKn1 peptidinin 5 analogunu tasarladıkları bir çalışmada daha yüksek hidrofobik momentlere sahip analog peptidlerin, antimikrobiyal aktivitenin yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Parente vd. (2018)

tarafından da benzer sonuçlar bulmuşlar ve hidrofobik momentleri 0,66 ve 0,72 olan iki peptid analogunun, hidrofobik momenti 0,57 olan doğal peptidden daha yüksek antimikrobiyal aktivite ve daha geniş bir aktivite spektrumu gösterdiğini bildirmişlerdir (Parente vd., 2018). Yine Wieprecht vd. (1997) hidrofobik momentin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini daha ayrıntılı çalışabilmek adına, hidrofobiklik, net yük, zincir uzunluğu ve hidrofilik ve hidrofobik sarmal yüzlerin kapsadığı açılar gibi birçok parametreyi sabit tutmuştur. Bu amaçla, antibakteriyel magainin 2 amidinin analogları ile yapılan çalışmalarda, birkaç konservatif aminoasit ikamesiyle artan hidrofobik momentin, antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır (Wieprecht vd., 1997). Tez çalışması kapsamında üretilen peptidlerin hidrofobik momentleri HeliQuest aracı kullanılarak belirlenmiş ve rL12-22-6His peptidinin hidrofobik momenti (0,264) rL12-49-6His peptidinden (0,161) daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar rL12-22-6His peptidinin antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olmasında, hidrofobik momentin de etkili olabileceğini göstermiştir.

L12-49 ve L12-22 peptidlerinin ikincil yapı tahminleri, SOPMA ve PSIPRED 4.0 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PSIPRED 4.0 programı kullanılarak elde edilen yapı tahmin grafikleri incelendiğinde de SOPMA ile heliks yapı tahmini yönünden benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar her iki peptidin de α -heliks yapısının >%60 olduğunu göstermiştir. Lyu vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada PAMP-36 peptidinden türetilen tamamen sarmal bir peptid olan RI18'in, patojen mayalar üzerinde PAMP-36'ya kıyasla daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada *Candida albicans* için MİK değeri PAMP-38 için 128 μ M olarak bildirilirken, RI18 için bu değer 16 μ M olarak bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, Khara vd. (2017) tarafından de novo olarak 9 adet AMP tasarlanmış ve en az antimikrobiyal etkiye sahip olan üç peptidin diğerlerine kıyasla en düşük α -sarmal yapıya sahip olanlar olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak;

Bu tez çalışmasında, motif tabanlı bir *de novo* peptid tasarım stratejisi geliştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak "GM1(X)M2(X)M3" (M: motif, X: joker aa, G: cap kalıntısı) şablon dizisi tasarlanmış ve başlangıç şablonunda motifler (M1,...M15) ve bir joker aminoasitler (L,K,R veya I) değiştirilerek peptid kombinasyonları oluşturulmuştur.

Burada “M” MEME motif bulma aracı kullanılarak elde edilen 11, 12 ve 13 aminoasit uzunluğundaki motifleri, X ise yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip aminoasitleri (K,L,R,I) temsil etmektedir. Oluşturulan motif kombinasyonları aktivitelerine göre *in silico* olara skorlanmış ve yüksek aktiviteye sahip olanlardan %80 benzerlik oranındakiler elenmiştir. Geriye kalan peptidlerin biyoinformatik araçlar kullanılarak fizikokimyasal özellikleri test edilmiş ve belirlenen kriterlerde 2 adet peptid seçilmiştir. Ardından M6, M7 ve M10 motifleri ile L joker aminoasidinden oluşan L12-49 ve L12-22 peptidlerinin *P. pastoris*’te ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin konsantrasyonu sırasıyla 128 ± 0.04 µg/ml ve 81 ± 0.05 µg/ml olup, literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında benzer bulgulara rastlanmıştır. Fakat yüksek verimli rekombinant AMP’lerin üretilebilmesi için, fermentasyon koşullarının optimizasyonu (pH, sıcaklık, O₂ miktarı, karbon kaynağı gibi), gen kopya sayısının artırılması için çok kopyalı hedef DNA dizilerini içeren ekspresyon vektörlerinin tasarlanması ya da daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulabileceği düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında üretilen rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin antimikrobiyal aktiviteleri 6 gram-pozitif bakteri, 10 gram-negatif bakteri ve 3 maya suşu olmak üzere toplam 19 mikroorganizma üzerinde test edilmiştir. Üretilen her iki peptid de test edilen gram-pozitif ve gram-negatif bakteri ve maya suşlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Her iki peptid de en yüksek etkiyi *L. monocytogenes* (ATCC 7644)’e, en düşük etkiyi ise *S. aureus* suşlarına ve MRSA’ya karşı göstermiştir. MİK analizi sonuçlarına göre rL12-22-6His peptidinin rL12-49-6His peptidine kıyasla daha yüksek bir antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur.

Rekombinant peptidlerin *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *C. albicans* ATCC 10231 suşlarının hücre morfolojisi üzerindeki etkisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi ile görüntülenmiştir. Rekombinat peptidlerin 1×MİK seviyeleri ile muamele edilen *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* hücrelerinin yüzeyinde delikler, pürüzler, göçükler ve oyuklar gibi belirgin deformasyonlar oluştuğu gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında GM1(X)M2(X)M3 şablon dizisi esas alınarak tasarlanan rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin hemolitik aktiviteleri fare eritrositine karşı test

edilmiştir. Her iki peptid de ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda % 98'e yakın hemolitik etki gösterirken; ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hemolitik etki göstermediği belirlenmiştir.

rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin sıcaklık stabilite testi sonucunda 4°C ve 24°C'de 1 saatlik muamaleden sonra *E. coli* ATCC suşuna karşı tespit edilen inhibisyon zon çaplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmazken ($p>0.01$), 65°C ve 95°C'de 1 saat ısıtılma maruz bırakılan peptidlerinin zon çapında 24°C'ye kıyasla sırasıyla %6'lık ve %16'lık bir küçülme olmuştur ($p<0.01$).

Rekombinant peptidlerin proteaz stabilitesini belirlemek için rL12-49-6His ve rL12-22-6His peptidlerinin 2,4 U/g seviyesinde proteaz enzimi ile muamale edildikten sonra *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı belirlenen inhibisyon zon çaplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip, termostabil ve proteaza karşı dirençli *de novo* peptidlerin tasarımı ve rekombinant yöntemle üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan özgün AMP'lerin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde üretilmesiyle aşağıdaki faydalar sağlanmıştır.

- Antimikrobiyal peptid üretiminde motif tabanlı bir yeni tasarım yaklaşımı geliştirilmiştir
- Doğal kaynaklardan elde edilen AMP'lere alternatif *de novo* peptidler tasarlanmıştır
- *De novo* tasarlanmış peptidlerin rekombinant yöntemle üretimi geliştirilmiştir
- Doğal peptid şablonları yerine, motif bazlı tasarımı mümkün kılan bir başlangıç sekansı (şablonu) tasarlanarak ve bu şablon üzerinde motiflerin konumlarının değiştirilmesiyle özgün peptidler elde edilmiştir.
- Geliştirilen yeni tasarım stratejisi sayesinde özgün AMP dizileri oluşturulmuş ve bu dizilerin başarısı *in silico* olarak test edilmiştir.
- Sonuçta bu tez çalışmasının sonuçlarının;

- AMP'lerin *de novo* tasarımı ve rekombinant yöntemle üretimi konusunda bilimsel bir alt yapı ve bilgi birikiminin oluşturulmasına
- *de novo* tasarım sayesinde AMP'lerin yaygın kullanımlarını sınırlandıran bir takım problemlerin (toksisite, stabilite ve bakteri direnci gibi) aşılmasına yönelik bilgi birikimi oluşturmaya
- Rekombinant üretim yöntemi sayesinde standart kalitede, düşük maliyetli ve yüksek verimli peptidlerin elde edilmesine
- Özgün ve ticari değeri olan AMP'lerin tasarım ve üretimini artırmak ve ilaç ve gıda sanayi gibi birçok alanda uygulama potansiyeline sahip endüstriyel ölçekte üretilebilecek ürünlerin elde edilmesine
- Özgün peptidlerin *in silico* analizinde kullanılan biyoinformatik araçlardan elde edilen tahmini değerler, deneysel verilerle kıyaslanarak bu araçların güvenilirliğinin test edilmesine
- Gıda, tarım ve hayvancılık gibi alanlarda kullanım potansiyeli olan, kimyasal koruyuculara alternatif AMP'lerin üretilmesini katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- 1.Abrunhosa, F., Faria, S., Gomes, P., Tomaz, I., Pessoa, JC., Andreu, D., et al., 2005. Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. **J Phys Chem B.**, **109**(36):17311–17319.
- 2.Ahmed, T.A., and Hammami, R., 2019. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. **Journal of food biochemistry**, **43**(1), e12546.
- 3.Ahmad, B., Hanif, Q., Xubiao, W., Lulu, Z., Shahid, M., Dayong, S., & Rijun, Z., 2019. Expression and purification of hybrid LL-37Tα1 peptide in pichia pastoris and evaluation of its immunomodulatory and anti-inflammatory activities by LPS neutralization. **Frontiers in Immunology**, **10**, 1365.
- 4.Almaaytah, A., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Walker, B., and Shaw, C., 2012. Antimicrobial/cytolytic Peptides from the Venom of the North African Scorpion, *Androctonus Amoreuxi*: Biochemical and Functional Characterization of Natural Peptides and a Single Site-Substituted Analog. **Peptides**, **35** (2): 291–299.
- 5.Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., Subra, G., 2006. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, **33**(3): 239-254.
- 6.Andreu, D., Merrifield, R.B., Steiner, H., & Boman, H.G., 1985. N-terminal analogs of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. **Biochemistry**, **24**(7), 1683-1688.
- 7.Báez, J., Olsen, D., Polarek, J. W., 2005. Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin. **Appl Microbiol Biotechnol**, **69**: 245–252.
- 8.Bahar, A.A., Ren, D., 2013. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, **6** (12): 1543-1575.
- 9.Balamurugan, V., Reddy, G.R., Suryanarayana, V.V.S., 2007. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. **Indian Journal of Biotechnology**, **6**:175-186.

10. Barashkova, A.S., Rogozhin, E.A., 2020. Isolation of antimicrobial peptides from different plant sources: Does a general extraction method exist?. **Plant Methods**, **16**(1): 1-10.
11. Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. 2010. Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. **Applied and environmental microbiology**, **76**(10), 3314-3324.
12. Barreto-Santamaría, A., Patarroyo, M. E., & Curtidor, H. 2019. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, **56**(6), 351-373.
13. Berrios, J., Flores, M.O., Díaz-Barrera, A., Altamirano, C., Martínez, I. and Cabrera, Z., 2017. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology March**, **44**(3), 407–411.
14. Bhadra, P., Yan, J., Li, J., Fong, S., & Siu, S.W., 2018. AmPEP: Sequence-based prediction of antimicrobial peptides using distribution patterns of amino acid properties and random forest. **Scientific reports**, **8**(1), 1697.
15. Blondelle, S. E., & Houghten, R. A., 1996. Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. **Trends in biotechnology**, **14**(2), 60-65.
16. Boman, HG., Nilsson-Faye, I., Paul, K., Rasmuson, T., Jr Insect immunity, I. 1974. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. **Infect Immun**, **10**:136–145.
17. Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A. & Toma, F., 1991. Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. **Science**, **254**, 1521–1523.

18. Brahmachary, M., Krishnan, S. P. T., Koh, J. L. Y., Khan, A. M., Seah, S. H., Tan, T. W., ... & Bajic, V.B., 2004. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. **Nucleic acids research**, 32(suppl_1), D586-D589.
19. Brierley R.A., 1998. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-1). **Methods Mol. Biol.**, 103:149–177.
20. Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, 3(3):238-250.
21. Buckholz, R.G., & Gleeson, M.A., 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology**, 9(11):1067-1072.
22. Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, 198(1): 169-184.
23. Bulet, P., Stocklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein Pept Lett.**, 12:3–11.
24. Cao, J., de la Fuente-Nunez, C., Ou R. W., Torres, M. D. T., Pande S. G., Sinskey A. J., et al. 2018. Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production. **ACS Synthet. Biol.**, 7:896–902.
25. Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., ... & Raghava, G. P., 2016. A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. **Scientific reports**, 6(1), 22843.
26. Chen, H.C., Brown, J.H., Morell, J.L., Huang, C.M., Rivier, J.E., Marshall, G.R. 1990. Peptides: Chemistry, Structure and Biology. **ESCOM Science Publishers, Leiden**, 122–123.
27. Chen, Z., Wang, D., Cong, Y., Wang, J., Zhu, J., Yang, J., Hu, Z., Hu, X., Tan, Y., Hu, F., Rao, X. 2011. Recombinant antimicrobial peptide hPAB- β expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 89(2): 281-291.

- 28.Chen, C., Yang, C., Chen, Y., Wang, F., Mu, Q., Zhang, J., ... & Lu, J. R. 2016a. Surface physical activity and hydrophobicity of designed helical peptide amphiphiles control their bioactivity and cell selectivity. **ACS applied materials & interfaces**, **8**(40), 26501-26510.
- 29.Chen, X., Hu, Y. H., Huang, Z. C., Li, Y., Luo, Y. W., Huang, Y. X., ... & Li, L., 2016b. Comparison of inducible versus constitutive expression of plectasin on yields and antimicrobial activities in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **118**, 70-76.
- 30.Cho, J., Choi, H., & Lee, D.G. 2012. Influence of the N-and C-terminal regions of antimicrobial peptide pleurocidin on antibacterial activity. **Journal of microbiology and biotechnology**, **22**(10), 1367-1374.
- 31.Chu, HL, Yu, HY, Yip, BS, Chih, YH, Liang, CW, Cheng, HT, Cheng, JW., 2013. Boosting salt resistance of short antimicrobial peptides. **Antimicrob Agents Chemother**, **57**: 4050–2.
- 32.Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smiley, B.L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., Thill, G.P. 1987. High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, **5**:479–485.
- 33.Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular biotechnology**, **16**:23-52.
- 34.Cereghino, J.L. & Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, **24**(1):45– 66.
- 35.Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., MCrege, J. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, **13**(4):329-332.

36. Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S., 2007. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. **BMC bioinformatics**, **8**, 1-17.
37. Cunha, S. A., Pintado, M. E. 2021. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**.
38. Cytryńska, M., and Zdybicka-Barabas, A. 2015. Defense peptides: recent developments. **BioMol Concepts**, **6**(4): 241.
39. daSilva Malheiros, P., Daroit, D.J., and Brandelli, A. 2010. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science & Technology** **21**(6): 284-292.
40. Dathe, M., Schümann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., ... & Bienert, M., 1996. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. **Biochemistry**, **35**(38), 12612-12622.
41. Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., ... & Bienert, M., 1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS letters**, **403**(2), 208-212.
42. Dathe, M., & Wieprecht, T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1462**(1-2):71-87.
43. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., 2001. Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Lett.**, **501**:146–150.
44. Davidson, D.J., Currie, A.J., Reid, G.S.D., Bowdish, D.M.E., MacDonald, K.L., Ma, R.C., et al., 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell

- differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. **J. Immunol.** **172**, 1146–1156.
- 45.de Jong, A., van Hijum, S. A., Bijlsma, J. J., Kok, J., & Kuipers, O. P. 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. **Nucleic acids research**, **34**(suppl_2), W273-W279.
- 46.de la Salud Bea, R., Ascuitto, M. R., and de Johnson, L. E. L., 2015. Synthesis of Analogs of Peptides from Buthus Martensii Scorpion Venom with Potential Antibiotic Activity. **Peptides** **68**, 228–232.
- 47.Debbab, A., Aly, AH., Lin, WH., Proksch, P. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. **Microb. Biotechnol.**, **3**(5):544–563.
- 48.Decker, A. P., Mechesso, A. F., & Wang, G. 2022. Expanding the Landscape of Amino Acid-Rich Antimicrobial Peptides: Definition, Deployment in Nature, Implications for Peptide Design and Therapeutic Potential. **International journal of molecular sciences**, **23**(21), 12874.
- 49.De Groot, N. S., Pallarés, I., Avilés, F. X., Vendrell, J., & Ventura, S., 2005. Prediction of " hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides. **BMC Structural Biology**, **5**, 1-15.
- 50.Deng, T., Ge, H., He, H., Liu, Y., Zhai, C., Feng, L., Yi, L. 2017. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. **Protein Expression and Purification**, **140**: 52-59.
- 51.Der Torossian Torres, M., Silva, A. F., Alves, F. L., Capurro, M. L., Miranda, A., & Oliveira Junior, V. X. 2014. The importance of ring size and position for the antiplasmodial activity of angiotensin II restricted analogs. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, **20**, 277-287.
- 52.Desriac, F., Jégou, C., Balnois, E., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y. 2013. Antimicrobial peptides from marine Proteobacteria. **Mar Drugs** **11**(10):3632–3660.

- 53.Deslouches, B., Phadke, S.M., Lazarevic, V., Cascio, M., Islam, K., Montelaro, R.C., Mietzner, T.A. 2005. De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **49** (1): 316-322.
- 54.Destoumieux-Garzón, D., Rosa, RD., Schmitt, P., Barreto, C., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G., Gueguen, Y.,Bachère, E. 2016. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease Philos Trans R Soc B.<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0300>.
- 55.Di Luca, M., Maccari, G., Maisetta, G., & Batoni, G. (2015). BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling*, 31(2), 193-199.
- 56.Dickert, H., Machka, K., & Braveny, I., 1981. The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. **Infection**, **9**(1), 18-24.
- 57.Dionisi, HM., Lozada, M., Olivera, NL. 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Rev Argent Microbiol** **44**(1):49–60.
- 58.Dong, C., Li, M., Zhang, R., Lu, W., Xu, L., Liu, J., & Chu, X. 2023. The Expression of Antibacterial Peptide Turgencin A in *Pichia pastoris* and an Analysis of Its Antibacterial Activity. **Molecules**, **28**(14), 5405.
- 59.Duan, H., Umar, S., Xiong, R., Chen, J., 2011. New strategy for expression of recombinant hydroxylated human-derived gelatin in *Pichia pastoris* KM71. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **59**,7127-7134.
- 40.Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, HG., Zeevaart, JR., Sathekge, MM. 2014. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed Res Int.**, 2014.
- 41.Edwards, I. A., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Zuegg, J., Blaskovich, M. A., & Cooper, M. A. 2016. Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. **ACS infectious diseases**, 2(6), 442-450.

- 42.Egan, S., Thomas, T., Kjelleberg, S., 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. **Curr Opin Microb.**
- 43.Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z., 2022. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of applied microbiology**, **132**(3):1573-1596.
- 44.Falanga, A., Nigro, E., De Biasi, MG. et al. 2017. Cyclic peptides as novel therapeutic microbicides: engineering of human defensin mimetics. **Molecules**. **22**: E1217.
- 45.Fan L, Sun J, Zhou M, Zhou J, Lao X, Zheng H, et al., 2016. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. **Sci Rep.**;6:24482.
- 46.Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, HG., Boman, IA., 1975. Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. **Infect Immun.**, **12**:1426–1438.
- 47.Fernández-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A. S., & White, S. H. 2007. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. **Journal of molecular biology**, **370**(3), 459-470.
- 48.Findlay, B., Zhanel, G.G., Schweizer, F., 2010. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. **Antimicrob. Agents Chemother.** **54** (10):4049–4058.
- 49.Fjell, C. D., Hancock, R. E., & Cherkasov, A., 2007. AMPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. **Bioinformatics**, **23**(9), 1148-1155.
- 50.Fjell, CD., Hiss, JA., Hancock, REW., Schneider, G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat. Rev. Drug Discov.**, **11**:37–51.
- 51.Frecker, V., Ho, B., Ding, JL. 2004. *De novo* design of potent antimicrobial peptides. **Antimicrob Agents Chemother.**, **48**: 3349–3357.

52. Fukuzawa, N., Tabayashi, N., Okinaka, Y., Furusawa, R., Furuta, K., Kagaya, U., Matsumura, T. 2010. Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **110**(2): 201-207
53. Fox, J.S., Li, J., Tan, Y.S.N., Nguyen, M., Pal, A., Ouaray, Z., Yadahalli, S., Kannan, S. 2016. The multifaceted roles of molecular dynamics simulations in drug discovery. **Curr. Pharm. Des.**, **22**:3585–3600.
54. Gagnon M.-C., Strandberg E., Grau-Campistany A., Wadhwani P., Reichert J., Bürck J., Rabanal F., Auger M., Paquin J.-F., 2017. Ulrich A.S. Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. **Biochemistry**. **56**:1680–1695.
55. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **Humana press**. (pp. 571-607).
56. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G., 2008. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, **24**(18), 2101-2102.
57. Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G., & Shai, Y. 1995. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. **Biochemistry**, **34**(36):11479-11488.
58. Gellison, G., Janowicz, Z.A., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A.W.M. and Hollenberg, C.P., 1992. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. **Biotechnology Advances**, **10**, 179– 89.
59. Geourjon, C., & Deleage, G., 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Bioinformatics**, **11**(6), 681-684.

60. Giangaspero, A., Sandri, L., Tossi, A. 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. **Eur J Biochem**, **268**, 5589–5600.
61. Giuliani, A., Rinaldi, A.C. 2011. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. **Cell Mol Life Sci.**, **68**: 2255 –66.
62. Glazyrina, J., Materne, E.M., Dreher, T., Storm, D., Junne, S., Adams, T., Greller, G. and Neubauer, P. 2010. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion type bioreactor. **Microbial Cell Factories**, **9**: 42.
63. Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H. and Wan, N.C., 2001. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, **74** (6), 492–497.
64. Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., et al. 1997. Human α -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. **Cell**, **88**: 553–60.
65. Gómez, E. A., Giraldo, P., & Orduz, S., 2017. InverPep: a database of invertebrate antimicrobial peptides. **J Glob Antimicrob Resist** **8**: 13–17.
66. Gong, H., Zhang, J., Hu, X., Li, Z., Fa, K., Liu, H., ... & Lu, J. R. 2019. Hydrophobic control of the bioactivity and cytotoxicity of de novo-designed antimicrobial peptides. **ACS applied materials & interfaces**, **11**(38):34609-34620.
67. Gopal, R., Kim, Y.J., Seo, C.H., Hahm, K.S., Park, Y. 2011. Reversed sequence enhances antimicrobial activity of a synthetic peptide. **J. Pept. Sci.**, **17**: 329-334.
68. Greber, K.E., Dawgul, M. 2017. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. **Curr. Top. Med. Chem.** **17**:620–628.
69. Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.G., Franck, V., ... & Evelyne, B., 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. **Molecular Immunology**, **46** (4): 516-522.

70. Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., ... & Shaw, C. 2013. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, **95**(9):1784-1794.
71. Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Raghava, G. P., 2013. *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PloS one**, **8**(9): e73957.
72. Hale, J.D., and Hancock, R.E. 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Rev Anti Infect Ther**. **5**(6):951–959.
73. Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., Fliss, I., 2007. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. **BMC Microbiol**; **7**: 89.
74. Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., Fliss, I., 2009. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Res**; **37**: D963-8.
75. Hammami, R., and Fliss, I. 2010. Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches. **Drug Discov. Today**, **15**, 540–546.
76. Han, J., Jyoti, M.A., Song, H.-Y., Jang, W.S. 2016. Antifungal Activity and Action Mechanism of Histatin 5-Halocidin Hybrid Peptides against *Candida ssp*. **PLoS ONE**. **11**:e0150196.
77. Hänchen, A., Rausch, S., Landmann, B., Toti, L., Nusser, A., Süßmuth, R.D. 2013. Alanine scan of the peptide antibiotic feglymycin: Assessment of amino acid side chains contributing to antimicrobial activity. **ChemBioChem**. **14**:625–632.
78. Hancock, R.E., and Sahl, H.G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol**, **24**: 1551–7.
79. Håversen, L., Ohlsson, B.G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L.Å., Mattsby-Baltzer, I., 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-κB. **Cell. Immunol**. **220**, 83–95.

80. Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J., 2017. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. **Bioinformatics**, **33**(19), 3098-3100.
81. Henriksen, J., Rowat, A. C., Brief, E., Hsueh, Y. W., Thewalt, J. L., Zuckermann, M. J., & Ipsen, J. H. 2006. Universal behavior of membranes with sterols. **Biophysical journal**, **90**(5): 1639-1649.
82. Higgins, D. R., & Cregg, J. M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. **Pichia protocols**, 1-15.
83. Hilpert, K., Elliott, M. R., Volkmer-Engert, R., Henklein, P., Donini, O., Zhou, Q., et al. 2006. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. **Chem. Biol.** **13**:1101–1107.
84. Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I., Oz, M. T. 2015. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. **Biotechnology Advances**, **33**(6): 1005-1023.
85. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. **Front Microbiol** **11**: 582779.
86. Huang, Y., Huang, J., Chen, Y. 2010. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: structure and function relationships. **Protein Cell**; **1**: 143–52.
87. Huang, Y., Gao, L., Lin, M., Yu, T. 2021. Recombinant expression of antimicrobial peptides in *Pichia pastoris*: A strategy to inhibit the *Penicillium expansum* in pears. **Postharvest Biology and Technology**, **171**:111298.
88. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, HG. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur J Biochem.** **106**:7–16.

- 89.Huo, S., Chen, C., Lyu, Z., Zhang, S., Wang, Y., Nie, B., Yue, B. 2020. Overcoming Planktonic and Intracellular *Staphylococcus aureus*-Associated Infection with a Cell-Penetrating Peptide-Conjugated Antimicrobial Peptide. **ACS Infect. Dis.**, **6**(12):3147-3162.
- 90.Imler, J.L., Bulet, P., 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. **Chem Immunol Allergy**. **86**:1–21.
- 91.Ingham, A. B., Moore, R. J., 2007. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, **47**(1): 1-9.
- 92.Islam, M., Mohamed, G., Polash, S. A., Hasan, M., Sultana, R., Saiara, N., Dong, W. 2021. Antimicrobial Peptides from Plants: A cDNA-Library Based Isolation, Purification, Characterization Approach and Elucidating Their Modes of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, **22**(16): 8712.
- 93.Jensen, K. J., 2013. Solid-phase peptide synthesis: an introduction. In Peptide Synthesis and Applications. **Humana Press, Totowa, NJ**, s. 1-21.
- 94.Jeong, J.H., Kim, J.S., Choi, S.S., Kim, Y., 2016. NMR structural studies of antimicrobial peptides: LPcin analogs. **Biophys. J.** **110**:423–430.
- 95.Jiang, Z., Vasil, A.I., Hale, J.D., Hancock, R.E., Vasil, M. L., & Hodges, R.S., 2008. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**, **90**(3):369-383.
- 96.Jiang, Y., Chen, Y., Song, Z., Tan, Z., Cheng, J., 2021. Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **170**: 261-280.
- 97.Jin, L., Bai, X., Luan, N., et al., 2016. Designed tryptophan- and lysine/arginine-rich antimicrobial peptide with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Candida albicans* vaginitis. **J Med Chem.** **59**:1791–1799.

98. Jhong, J. H., Chi, Y. H., Li, W. C., Lin, T. H., Huang, K. Y., & Lee, T. Y., 2019. dbAMP: an integrated resource for exploring antimicrobial peptides with functional activities and physicochemical properties on transcriptome and proteome data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D285-D297.
99. Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I. W. and von Stockar, U. , 2007. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, **131** (1), 57–66.
100. Kang, H.K., Seo, C.H., Park, Y., 2015. Marine peptides and their anti-infective activities. **Mar Drugs** **13**(1):618–654.
101. Kant, P., Liu, W.Z., & Pauls, K.P., 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. **Peptides**, **30**(9), 1593-1599.
102. Karnati, P., Gonuguntala, R., Barbadikar, K. M., Mishra, D., Jha, G., Prakasham, V., ... & Chinnaswami, K., 2022. Performance of Novel Antimicrobial Protein Bg_9562 and *In Silico* Predictions on Its Properties with Reference to Its Antimicrobial Efficiency against *Rhizoctonia solani*. **Antibiotics**, **11**(3):363.
103. Khan, I., and Oh, D.H., 2016. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, **34**, 376-384.
104. Khara, J. S., Obuobi, S., Wang, Y., Hamilton, M. S., Robertson, B. D., Newton, S. M., ... & Ee, P.L.R., 2017. Disruption of drug-resistant biofilms using *de novo* designed short α -helical antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. **Acta Biomaterialia**, **57**, 103-114.
105. Khatoon, N., Alam, H., Khan, A., Raza, K., & Sardar, M., 2019. Ampicillin silver nanoformulations against multidrug resistant bacteria. **Sci. Rep.** **9**, 6848.

106. Kim, H., Jang, J.H., Kim, S.C., & Cho, J.H. 2014. *De novo* generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **69**(1):121-132.
107. Kjeldsen, T., Pettersson, A. F., & Hach, M., 1999. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and applied biochemistry**, **29**(1):79-86.
108. Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., ... & Bagnicka, E., 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. **Molecular biology reports**, **39**(12):10957-10970.
109. Kraszewska, J., Beckett, M. C., James, T. C., & Bond, U. 2016. Comparative analysis of the antimicrobial activities of plant defensin-like and ultrashort peptides against food-spoiling bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **82**(14), 4288-4298.
110. Kuddus, M.R., Rumi, F., Tsutsumi, M., Takahashi, R., Yamano, M., Kamiya, M., Kikukawa, T., Demura, M., Aizawa, T., 2016. Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snak-in-1 in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification** **122**: 15-22.
111. Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N., Straus, S.K., 2018. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. **Biomolecules**, **8** (1): 4.
112. Kurokawa, T., Lee, C., Shiomi, N., Nakano A. and Katoh, S., 2002. Secretion of α -amylase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* and characterization of its C-terminus with anti-peptide antibody. **J. Chem. Eng. Jpn.**, **35**, 127-128.
113. Kwon, M. Y., Hong, S. Y., & Lee, K. H., 1998. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, **1387**(1-2), 239-248.

- 114.Lai, Y., Gallo, R.L. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends Immunol.**, **30**:131–141.
- 115.Lakin, S. M., Dean, C., Noyes, N. R., Dettenwanger, A., Ross, A. S., Doster, E., Boucher, C., et al., 2017. MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. **Nucleic acids research**, **45**(D1), D574-D580.
- 116.Lata, S., Mishra, N. K., Raghava, G. P., 2010. AntiBP2: improved version of antibacterial peptide prediction. **BMC bioinformatics**, **11**(1), 1-7.
- 117.Lear, S., & Cobb, S. L., 2016. Pep-Calc. com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. **Journal of computer-aided molecular design**, **30**, 271-277.
- 118.Lee, D. L., & Hodges, R. S. 2003. Structure–activity relationships of *de novo* designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. **Peptide Science**, **71**(1):28-48.
- 119.Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K.-S., and Kim, Y., 2004. Antibiotic Activity and Structural Analysis of the Scorpion-Derived Antimicrobial Peptide IsCT and its Analogs. **Biochem. biophysical Res. Commun.** **323** (2), 712–719.
- 120.Lee, S.B., Li, B., Jin, S., Daniell, H., 2011. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. **Plant Biotechnology Journal**, **9**: 100–15.
- 121.Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., ... & He, Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, **11**(7), 3919.
- 122.Leite, M.L., Sampaio, K.B., Costa, F.F., Franco, O.L., Dias, S.C. & Cunha, N.B. 2018. Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 91(suppl 1).

- 123.Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Applied biochemistry and biotechnology**, **142**(2): 105-124.
- 124.Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jørgensen, T. Ø., Stensvåg, K. 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Developmental & Comparative Immunology**, **32**(12): 1430-1440.
- 125.Li, Y., and Chen, Z., 2008. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. **FEMS Microbiol Lett** **289**(2): 126-9.
- 126.Li, Y. 2009. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. **Biotechnol Appl Biochem**, **54**:1-9.
- 127.Li, Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review, **Protein Expr Purif.**, **80**:260-7.
- 128.Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z., 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, **37** (2): 207-215.
- 129.Li, F.M., Wang, X.-Q. 2016. Identifying anticancer peptides by using improved hybrid compositions. **Sci. Rep.**, **6**, 33910.
- 130.Li, J., Ko, J. L., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, S, C., Roger W. Beuerman, R, W. 2017. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Frontiers in Neuroscience**, **11**:73.
- 131.Li, F. F., Brimble, M. A. 2019. Using chemical synthesis to optimise antimicrobial peptides in the fight against antimicrobial resistance. **Pure and Applied Chemistry**, **91**(2): 181-198.
- 132.Li, H., Ali, Z., Liu, X., Jiang, L., Tang, Y., Dai, J. 2019. Expression of recombinant tachyplesin I in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **157**: 50-56.

- 133.Li, Z., Cheng, Q., Guo, H., Zhang, R., Si, D., 2020. Expression of hybrid peptide EF-1 in *Pichia pastoris*, its purification, and antimicrobial characterization. **Molecules**, **25**(23), 5538.
- 134.Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., & Serrano, L., 2004. A comparative study of the relationship between protein structure and β -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. **Journal of molecular biology**, **342**(1), 345-353.
- 135.Liu, H., Tan, X., Russell, K.A., Veenhuis, M., Cregg, J.M., 1995. PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. **J. Biol. Chem.**, **270**:10940–10951.
- 136.Liu, Z., Zhu, M., Chen, X., Yang, G., Yang, T., Yu, L., Wang, X., 2018. Expression and antibacterial activity of hybrid antimicrobial peptide cecropinA-thanatol in *Pichia pastoris*. **Frontiers in Laboratory Medicine**, **2** (1): 23-29.
- 137.Loose, C., Jensen, K., Rigoutsos, I., and Stephanopoulos, G. 2006. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. **Nature**, **443**, 867–869.
- 138.Lohner, K., and Prossnigg, F., 2009. Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.** **1788**, 1656–1666.
- 139.Luz, C., Calpe, J., Saladino, F., Luciano, F.B., Fernandez-Franzón, M., Mañes, J., et al. 2018. Antimicrobial packaging based on ϵ -polylysine bioactive film for the control of mycotoxigenic fungi in vitro and in bread. **Journal of Food Processing and Preservation**, **42**(1): e13370.
- 140.Lyu, Y., Yang, Y., Lyu, X., Dong, N., Shan, A. 2016. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. **Scientific reports**, **6**(1): 1-12.

- 141.López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J.A., Loeza-Lara, P.D., 2011. Antimicrobial peptides: diversity and perspectives for their biomedical application. **Biomedical Engineering, Trends, Research and TechnoInc**, 275- 304.
- 142.Ma, W., Zhang, D., Li, G., Liu, J., He, G., Zhang, P., Yang, L., Zhu, H., Xu, N., Liang, S. 2017. Antibacterial mechanism of daptomycin antibiotic against *Staphylococcus aureus* based on a quantitative bacterial proteome analysis. **J. Proteomics**, **150**, 242-251.
- 143.Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. and Harvey, L. M. , 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, **22** (4), 249–270.
- 144.Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C., 2016. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, **6**: 194.
- 145.Maisetta,G., Di Luca, M., Esin, S., et al. 2008. Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. **Peptides**, **29**: 1 –6.
- 146.Malmsten, M., Kasetty, G., Pasupuleti, M., Alenfall, J., Schmidtchen, A., 2011. Highly selective end-tagged antimicrobial peptides derived from PRELP. **PLoS One** **6**: e16400.
- 147.Mao, R., Teng, D., Wang, X., Zhang, Y., Jiao, J., Cao, X., & Wang, J., 2015. Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. **BMC microbiology**, **15**, 1-12.
- 148.McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T., 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, **16**(4), 404-405.

- 149.Mehta, D., Anand, P., Kumar, V., Joshi, A., Mathur, D., Singh, S., ... & Raghava, G. P., 2014. ParaPep: a web resource for experimentally validated antiparasitic peptide sequences and their structures. **Database**, **2014**, bau051.
- 150.Meng, D. M., Dai, H. X., Gao, X. F., Zhao, J. F., Guo, Y. J., Ling, X., ... & Fan, Z. C., 2016. Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide Mytichitin-A in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **127**, 35-43.
- 151.Meng, D. M., Zhao, J. F., Ling, X., Dai, H. X., Guo, Y. J., Gao, X. F., Fan, Z. C. 2017. Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **130**:90-99.
- 152.Meng, D. M., Lv, Y. J., Zhao, J. F., Liu, Q. Y., Shi, L. Y., Wang, J. P., Fan, Z. C. 2018. Efficient production of a recombinant *Venerupis philippinarum* defensin (VpDef) in *Pichia pastoris* and characterization of its antibacterial activity and stability. **Protein Expression and Purification**, **147**: 78-84.
- 153.Meng, D. M., Li, W. J., Shi, L. Y., Lv, Y. J., Sun, X. Q., Hu, J. C., Fan, Z. C. 2019. Expression, purification and characterization of a recombinant antimicrobial peptide Hispidalin in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **160**: 19-27.
- 154.Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L., Mobashery, S. 2006. Three dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Proc Natl Acad Sci., U S A.** **103**(12):4404-9.
- 155.Meyer, H.P., Brass, J., Jungo, C., Kelin, J., Wenger, J. and Mommers, R., 2008. An emerging star for therapeutic and catalytic protein production. **BioProcess Int.**, **2**, 10–21.
- 156.Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., Darewicz, M., 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **J AOAC Int.**; **91**:965–80.

157. Miyasaki, K.T., & Lehrer, R.I., 1998. β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **9**(4), 269-280.
158. Mookherjee, N, Hancock, R.E. 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell Mol Life Sci.**, **64**: 922–33.
159. Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., Mirnejad, R. 2018. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. **Microbial Drug Resistance**, **24**(6): 747-767.
160. Moridi, K., Hemmaty, M., Eidgahi, M. R. A., Najafi, M. F., Zare, H., Ghazvini, K., Neshani, A., 2020. Construction, cloning, and expression of Melittin antimicrobial peptide using *Pichia pastoris* expression system. **Gene Reports**, **21**: 100900.
161. Münzker, L., Oddo, A., Hansen, P. R. 2017. Chemical synthesis of antimicrobial peptides. In Antimicrobial Peptides. **Humana Press, New York, NY**, s. 35-49.
162. Nan, Y.H., Park, K.H., Park, Y., Jeon, Y.J., Kim, Y., Park, I.S., Hahm, K.S., Shin, S.Y. 2009. Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. **FEMS Microbiol. Lett.**, **292**, 134-140.
163. Nan YH, Shin SY., 2011. Effect of disulphide bond position on salt resistance and LPS-neutralizing activity of α -helical homo-dimeric model antimicrobial peptides. **BMB Rep** **44**: 747–52.
164. Navon-Venezia, S., Feder, R., Gaidukov, L., et al. 2002. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity. **Antimicrob Agents Chemother**, **46**: 689–94.
165. Neubauer, D., Jaśkiewicz, M., Migoń, D., Bauer, M., Sikora, K., Sikorska, E., Kamysz, E., Kamysz, W., 2017. Retro analog concept: comparative study on physico-chemical and biological properties of selected antimicrobial peptides. **Amino Acids**, **49**(10):1755-1771.

- 166.Nielsen, JE., Bjørnstad, VA., Pipich, V., Jenssen, H, Lund, R., 2021. Beyond structural models for the mode of action: how natural antimicrobial peptides affect lipid transport. **J Colloid Interface Sci.**, **582**(Pt B):793–802.
- 167.Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol BiolRev.**, **67**(4):593-656.
- 168.Nissen-Meyer, J., & Nes, I. F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of microbiology**, **167**, 67-77.
- 169.Nizet, V. 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Curr. Issues Mol. Biol.**, **8**:11–26.
- 170.Nguyen, LT, Chau, JK, Perry, NA, de Boer, L, Zaat, SA, Vogel, HJ., 2010. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. **PLoS One** **5**: e12684
- 171.Nguyen, LT., Haney, EF., Vogel, HJ. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol.** **29**:464–472.
- 172.Novković, M., Simunić, J., Bojović, V., Tossi, A., & Juretić, D., 2012. DADP: the database of anuran defense peptides. **Bioinformatics**, **28**(10), 1406-1407.
- 173.Ohmori, N., Niidome, T., Hatakeyama, T., Mihara, H., & Aoyagi, H., 1998. Interaction of α -helical peptides with phospholipid membrane: effects of chain length and hydrophobicity of peptides. **The Journal of peptide research**, **51**(2), 103-109.
- 174.Omardien, S., Drijfhout, J.W., Vaz, F.M., Wenzel, M., Hamoen, L.W., Zaat, S.A.J., Brul, S. 2018. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. **Biochim.Biophys. Acta Biomembr.**, **1860**(11), 2404-2415.

- 175.Ong, Z.Y.,Gao, S.J., Yang, Y.Y. 2013. Short synthetic β -sheet forming peptide amphiphilesas broad spectrum antimicrobials with antibiofilm and endotoxin neutralizing capabilities. **Adv. Funct. Mater.**, **23**,3682–3692.
- 176.Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. 2014. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Advanced drug delivery reviews**, **78**, 28-45.
- 177.Oren, Z., & Shai, Y. 1996. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. **European Journal of Biochemistry**, **237**(1), 303-310.
- 178.Oren, Z., and Shai, Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Pept. Sci.****47**, 451–463.
- 179.Otero-González, AJ., Magalhães, BS., Garcia-Villarino, M., LópezAbarategui, C., Sousa, DA., Campos Dias, S., Franco, OL. 2010. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **FASEB J** **24**:1320–1334.
- 180.Pace, C. N., & Scholtz, J. M. 1998. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. **Biophysical journal**, **75**(1), 422-427.
- 181.Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H. G., & Shai, Y. 2002. The consequence of sequence alteration of an amphipathic α -helical antimicrobial peptide and its diastereomers. **Journal of Biological Chemistry**, **277**(37), 33913-33921.
- 182.Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., Franco, O. L. 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, **38**(2): 446-456
- 183.Parchebafi, A., Tamanaee, F., Ehteram, H., Ahmad, E., Nikzad, H., & Haddad Kashani, H. 2022. The dual interaction of antimicrobial peptides on bacteria and cancer cells; mechanism of action and therapeutic strategies of nanostructures. **Microbial Cell Factories**, **21**(1), 118.

184. Parente, A., Daniele-Silva, A., Furtado, A., Melo, M., Lacerda, A., Queiroz, M., et al., 2018. Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. **Toxins**, **10** (4), 161.
185. Park, Y., Hahm, K.S., 2005. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. **J Biochem Mol Biol**, **38**(5):507-16.
186. Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., Chalupka, L., Ringstad, L., Malmsten, M., 2009. End-tagging of ultra-short antimicrobial peptides by W/F stretches to facilitate bacterial killing. **PLoS One** **4**: e5285.
187. Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., Malmsten, M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit Rev Biotechnol.**, **32**:143–171.
188. Pereira, H.A. 2006. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. **Curr Pharm Biotechnol.**, **7**:229–34.
189. Perron, G.G., Zasloff, M., Bell, G. 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. **Proc. R. Soc. B** **273**, 251–256.
190. Phoenix, D. A., Dennison, S. R., Harris, F. 2013. Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. **Antimicrobial Peptides**, **Wiley**, 1–37.
191. Piotto, S. P., Sessa, L., Concilio, S., & Iannelli, P., 2012. YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides. **International journal of antimicrobial agents**, **39**(4), 346-351.
192. Pirtskhalava, M., Gabrielian, A., Cruz, P., Griggs, H. L., Squires, R. B., Hurt, D. E., ... & Tartakovsky, M., 2016. DBAASP v. 2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. **Nucleic acids research**, **44**(D1), D1104-D1112.
193. Popa, C., Shi, X., Ruiz, T., Ferrer, P., & Coca, M. 2019. Biotechnological production of the cell penetrating antifungal PAF102 peptide in *Pichia pastoris*. **Frontiers in microbiology**, **10**, 1472.

- 194.Porto, W. F., Silva, O. N., and Franco, O. L. 2012. “Prediction and rational design of antimicrobial peptides,”in Protein Structure. **ed. E. Faraggi (London: InTech)**, 377–396.
- 195.Porto, W. F., Fensterseifer, I. C., Ribeiro, S. M., and Franco, O. L. 2018. Joker: an algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects**, **1862**, 2043–2052.
- 196.Puertas, J. M., Caminal, G., González, G. 2011. Expression of metallocarboxypeptidase inhibitors in *Escherichia coli*: effect of cysteine content and protein size in the secretory production of disulfide-bridged proteins. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **38**(9): 1553-1560.
- 197.Reffuveille, F., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S., Hancock, R. E. W. 2014. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** **58**:5363–5371.
- 198.Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., and Kövics, G. 2016. Antimicrobial peptides as natural bio preservative to enhance the shelf-life of food. **Journal of Food Science and Technology**, **53**(9):3381-3394.
- 199.Ramos-Martín, F., AnnaVal, T., Buchoux, S., Sarazin, C., & D’amelio, N., 2019. ADAPTABLE: A comprehensive web platform of antimicrobial peptides tailored to the user’s research. **Life science alliance**, **2**(6).
- 200.Rigoutsos, I., Floratos, A. 1998. Combinatorial pattern discovery in biological sequences: The TEIRESIAS algorithm. **Bioinformatics (Oxford, England)**, **14**(1):55-67.
- 201.Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, **8**(6):423-488.
- 202.Ruiz, N., Kahne, D., Silhavy, T.J. 2006. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. **Nat Rev Microbiol.**, **4**(1):57-6.

- 203.Sang, M., Wei, H., Zhang, J., Wei, Z., Wu, X., Chen, Y., Zhuge, Q. 2017. Expression and characterization of the antimicrobial peptide ABP-dHC-cecropin A in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, **140**: 44-51.
- 204.Santos, J.C.P., Sousa, R.C.S., Otoni, C.G., Moraes, A.R.F., Souza, V.G.L., Medeiros, E.A.A., et al. 2018. Nisin and other antimicrobial peptides: production, mechanisms of action, and application in active food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** **48**, 179-194.
- 205.Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., et al., 2007. Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res****35**: D265-8.
- 206.Semreen, MH., El-Gamal, MI., Abdin, S., Alkhazraji, H., Kamal, L., Hammad, S., El-Awady, F., Waleed, D., Kourbaj, L. 2018. Recent updates of marine antimicrobial peptides. **Saudi Pharm J** **26**(3):396–409.
- 207.Seshadri Sundararajan, V., Gabere, M. N., Pretorius, A., Adam, S., Christoffels, A., Lehv  slaiho, M., ... & Bajic, V. B., 2012. DAMPD: a manually curated antimicrobial peptide database. **Nucleic acids research**, **40**(D1), D1108-D1112.
- 208.Settanni, L., & Corsetti, A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International journal of food microbiology**, **121**(2):123-138.
- 209.Seyedjavadi, S. S., Khani, S., Eslamifar, A., Ajdary, S., Goudarzi, M., Halabian, R., ... & Razzaghi-Abyaneh, M., 2020. The antifungal peptide MCh-AMP1 derived from *Matricaria chamomilla* inhibits *Candida albicans* growth via inducing ROS generation and altering fungal cell membrane permeability. **Frontiers in microbiology**, **10**, 3150.
- 210.Scott, R. W., DeGrado, W. F., Tew, G. N. 2008. *De novo* designed synthetic mimics of antimicrobial peptides. **Current opinion in biotechnology**, **19**(6):620-627.

211. Schiffer, M., and Edmundson, A.B. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysical Journal**, 7, 121-135.
212. Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P., 2014. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. **Journal of chemical theory and computation**, 10(10), 4745-4758.
213. Silva, JP., Appelberg, R., Gama, FM. 2016. Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. **Biotechnol Adv.** 34(5):924–940.
214. Singh, S., Chaudhary, K., Dhanda, S.K., Bhalla, S., Usmani, S.S., Gautam, A., et al., 2016. SATPdb: a database of structurally annotated therapeutic peptides. **Nucleic Acids Res.** 44:1119-26.
215. Singh, J., Mumtaz, S., Joshi, S., & Mukhopadhyay, K. 2020. *In vitro* and *ex vivo* efficacy of novel Trp-Arg rich analogue of α -MSH against *Staphylococcus aureus*. **ACS omega**, 5(7), 3258-3270.
216. Singh, T., Choudhary, P., & Singh, S., 2022. Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action. **Insights Antimicrob. Pept**, 23, 1417.
217. Son, M., Lee, Y., Hwang, H., et al., 2013. Disruption of interactions between hydrophobic residues on nonpolar faces is a key determinant in decreasing hemolysis and increasing antimicrobial activities of alpha-helical amphipathic peptides. **ChemMedChem.** 8:1638–1642.
218. Sperstad, SV., Haug, T., Blencke, H., Styrvold, OB., Li, C., Stensvag, K. 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. **Biotechnol Adv** 29:519–530.
219. Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G., ... & Pál, C. 2019. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. **Nature communications**, 10(1), 4538.

- 220.Sreekrishna, K., 2013. Gene expression in pichia and other methylotroph yeast. In: Flickinger MC, editor. **Upstream Industrial Biotechnology**, 205.
- 221.Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, HG. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, **292**:246–248.
- 222.Stromstedt, A.A., Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., et al. 2009. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. **Antimicrob Agents Chemother**, **53**: 593–602.
- 223.Sultana, A., Luo, H., Ramakrishna, S. 2021. Harvesting of Antimicrobial Peptides from Insect (*Hermetia illucens*) and Its Applications in the Food Packaging. **Applied Sciences**, **11**(15): 6991.
- 224.Svenson, J., Vergote, V., Karstad, R. et al. 2010. Metabolic fate of lactoferricin-based antimicrobial peptides: effect of truncation and incorporation of amino acid analogs on the in vitro metabolic stability. **J Pharmacol Exp Therap**. **332**:1032–1039.
- 225.Takahashi, D., Shukla, SK., Prakash, O., Zhang, G., 2011. Corrigendum to “Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity” **Biochimie. Volume 92 (2010) 3**:631.
- 226.Tally, F.P., DeBruin, M.F., 2000. Development of daptomycin for gram-positive infections. **J Antimicrob Chemother**. **46**(4):523-6.
- 227.Tan, P., Fu, H.,Ma, X., 2021. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, **39**: 101229.
- 228.Tang, T., Liu, J., Li, S., Li, H., Liu, F., 2020. Recombinant expression of an oriental river prawn anti-lipopolysaccharide factor gene in *Pichia pastoris* and its characteristic analysis. **Fish & Shellfish Immunology**, **98**: 414-419.

229. Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., & Hammami, R., 2014. MilkAMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. **Dairy Science & Technology**, **94**, 181-193
230. Torrent, M., Di Tommaso, P., Pulido, D., Nogués, M.V., Notredame, C., Boix, E., Andreu, D., 2012. AMPA: An Automated Web Server for Prediction of Protein Antimicrobial Regions. **Bioinformatics**. **28**:130–131.
231. Torres, M.D.T., Pedron, C.N., Higashikuni, Y., Kramer, R.M., Cardoso, M.H., Oshiro, K.G.N., Franco, O.L., Silva Junior, P.I., Silva, F.D., Oliveira Junior, V.X., Lu, T.K., de la Fuente-Nunez, C. 2018. Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. **Commun. Biol.** **1**, 221.
232. Torres, M.D., Sothiselvam, S., Lu, T.K., & de la Fuente-Nunez, C., 2019. Peptide design principles for antimicrobial applications. **Journal of molecular biology**, **431**(18), 3547-3567.
233. Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A., 2000. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolym. Pept. Sci.**, **55**, 4–30.
234. Tyagi, A., Tuknait, A., Anand, P., Gupta, S., Sharma, M., Mathur, D, et al., 2015. CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins. **Nucleic Acids Res**, **43**: D837-43
235. Uematsu, N., and Matsuzaki, K., 2000. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. **Biophysical Journal**. **79**(4):2075–2083.
236. Ueno, S., Minaba, M., Nishiuchi, Y., et al., 2011. Generation of novel cationic antimicrobial peptides from natural non-antimicrobial sequences by acid-amide substitution. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** **10**:11.

- 237.Usmani, SS., Bedi, G, Samuel, JS, Singh, S, Kalra, S, Kumar, P., et al., 2017. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. **PLoS ONE**. **12**:e0181748.
- 238.Ünver, Y., 2014. İnsan Paraoksonaz 1 (Pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 239.Xie, D., Yao, C., Wang, L. et al. 2010. An albumin-conjugated peptide exhibits potent anti-HIV activity and long in vivo half-life. **Antimicrob Agents Chemother**. **54**:191–196.
- 240.Xing, L.W., Tian, S.X., Gao, W., Yang, N., Qu, P., Liu, D., ... & Feng, X. J. 2016. Recombinant expression and biological characterization of the antimicrobial peptide fowlicidin-2 in *Pichia pastoris*. **Experimental and therapeutic medicine**, **12**(4), 2324-2330.
- 241.Vagner, J., Qu, H., & Hruby, V.J., 2008. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. **Current opinion in chemical biology**, **12**(3), 292-296.
- 242.Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W. & Schoofs, L. 2012 A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. **Cellular Immunology**, **280**, 22–35.
- 243.van der Does, A.M., Bogaards, S.J., Ravensbergen, B., Beekhuizen, H., van Dissel, J.T., Nibbering, P.H., 2010. Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother**. **54**, 811–816.
- 244.Vilcinskas, A. 2013. Evolutionary plasticity of insect immunity. **J. Insect. Physiol.**, **59**:123–129.
- 245.Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., Managadze, G., ... & Pirtskhalava, M. 2018. Predictive model of linear antimicrobial

- peptides active against gram-negative bacteria. **Journal of chemical information and modeling**, **58**(5), 1141-1151.
246. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M., 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Disc. Today** **15**, 40–56.
247. Wang, Y., Nowak, G., Culley, D., Hadwiger, L. A., Fristensky, B. 1999. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **12**(5): 410-418.
248. Wang, C.K., Kaas, Q., Chiche, L., & Craik, D.J. 2007. CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. **Nucleic acids research**, **36**(suppl_1), D206-D210.
249. Wang, G., Li, X., & Wang, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic acids research**, **37**(suppl_1), D933-D937.
250. Wang, P, Nan, YH., Yang, ST, Kang, SW, Kim, Y., Park, I.S., Hahm, K.S., Shin, S.Y., 2010. Cell selectivity and anti-inflammatory activity of Leu/Lys-rich α -helical model antimicrobial peptide and its diastereometric peptides. **Peptides**, **31**: 1251–61.
251. Wang, G. 2015a. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Computational peptidology**, 43-66.
252. Wang, G., Li, X., Wang, Z. 2015b. APD3: the Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. **Nucleic Acids Res.**, **44**, D1087–D1093.
253. Wang, K., Jia, F., Dang, W., Zhao, Y., Zhu, R., Sun, M., Qiu, S., An, X., Ma, Z., Zhu, Y., Yan, J., Kong, Z., Yan, W., Wang, R., 2015c. Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. **J. Pept. Sci.**, **22**: 28- 35.

254. Wang, Y., Chen, C.H., Hu, D., Ulmschneider, M.B., Ulmschneider, J.P. 2016, Spontaneous Formation of Structurally Diverse Membrane Channel Architectures from a Single Antimicrobial Peptide. **Nat. Commun.** 7, 13535.
255. Wang, G. L., Wang, M. C., Liu, Y. L., Zhang, Q., Li, C. F., Liu, P. T., Xie, H. X. 2018. Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio*. **Fish & Shellfish Immunology**, 73: 11-21.
256. Wang, C., Hong, T., Cui, P., Wang, J., Xia, J. 2021a. Antimicrobial peptides towards clinical application: delivery and formulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 175: 113818.
257. Wang, L., Wang, Y. L., Lv, Z. L., Zhang, E. P., Guo, A. Z. 2021b. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 534: 822-829.
258. Waghu, FH, Barai, RS, Gurung, P, Idicula-Thomas, S., 2016. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res.** 44:D1094-7.
259. Wibowo, D., Zhao, C. X. 2019. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103(2): 659-671.
260. Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M., 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochemistry**, 36(20), 6124-6132.
261. Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C.A., Seow, S.V., Zhang, S., Yang, Y.Y., 2011. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. **Biomaterials**, 32, 2204–2212.

262. Wiradharma, N., Sng, M. Y., Khan, M., Ong, Z. Y., & Yang, Y. Y., 2013. Rationally designed α -helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. **Macromolecular rapid communications**, **34**(1), 74-80.
263. Whitmore, L., & Wallace, B., 2004. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. **Nucleic Acids Research**, **32** (suppl_1), D593-D594.
264. Yan, J., Wang, K., Dang, W., Chen, R., Xie, J., Zhang, B., ... & Wang, R., 2013. Two hits are better than one: membrane-active and DNA binding-related double-action mechanism of NK-18, a novel antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **57**(1), 220-228.
265. Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S. Y., 2020. The HDock server for integrated protein-protein docking. **Nature protocols**, **15**(5), 1829-1852.
266. Yang, A. S., & Honig, B., 1995. Free energy determinants of secondary structure formation: I. α -helices. **Journal of molecular biology**, **252**(3), 351-365.
267. Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. & Huang, H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, **81**, 1475-1485.
268. Yang, N., Liu, X., Teng, D., Li, Z., Wang, X., Mao, R., ... & Wang, J., 2017. Antibacterial and detoxifying activity of NZ17074 analogues with multi-layers of selective antimicrobial actions against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Scientific Reports**, **7**(1), 3392.
269. Yang, N., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Wang, X., Wang, Z., ... & Wang, J., 2019a. A recombinant fungal defensin-like peptide-P2 combats multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and biofilms. **Applied microbiology and biotechnology**, **103**, 5193-5213.

270. Yang, Z. Y., Yang, Z. J., Dong, J., Wang, L. L., Zhang, L. X., Ding, J. J., ... & Cao, D. S., 2019b. Structural analysis and identification of colloidal aggregators in drug discovery. **Journal of chemical information and modeling**, 59(9), 3714-3726.
271. Yazdi, F. T., Tanhaeian, A., Azghandi, M., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Mortazavi, S. A., Roshanak, S. 2019. Heterologous expression of thrombocidin-1 in *Pichia pastoris*: evaluation of its antibacterial and antioxidant activity. **Microbial Pathogenesis**, 127: 91-96.
272. Yeaman, M.R., Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55.
273. Yeung, A.T., Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W. 2011. Multifunctional cationic host defense peptides and their clinical applications. **Cell Mol Life Sci.**, 68, 2161-76.
274. Yi, H.Y., Chowdhury, M., Huang, Y.D., & Yu, X.Q. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, 5807-5822.
275. Yi, T., Sun, S., Huang, Y., Chen, Y. 2015. Prokaryotic expression and mechanism of action of α -helical antimicrobial peptide A20L using fusion tags. **BMC biotechnology**, 15(1): 1-10.
276. Yu, HY., Tu, CH., Yip, BS., Chen, HL., Cheng, HT., Huang, KC, Lo, HJ., Cheng, JW., 2011. Easy strategy to increase salt resistance of antimicrobial peptides. **Antimicrob Agents Chemother** 55: 4913–21.
277. Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 84, 5449–5453.
278. Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, 415: 389-395.

- 279.Zhan, N., Zhang, L., Yang, H., Zheng, Y., Wei, X., Wang, J., & Shan, A., 2021. Design and heterologous expression of a novel dimeric LL37 variant in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, **20**, 1-13.
- 280.Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, **9**, 1-8.
- 281.Zhang, LJ., and Gallo RL. 2016. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, **26**, R15.
- 282.Zhang, D., He, Y., Ye, Y., Ma, Y., Zhang, P., Zhu, H., ... & Liang, S. 2019. Little antimicrobial peptides with big therapeutic roles. **Protein and peptide letters**, **26**(8), 564-578.
- 283.Zhao, P., Cao, G., 2012. Production of bioactive sheep beta-defensin-1 in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, **39**:11–7.
- 284.Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G., & Huang, Q., 2013. LAMP: a database linking antimicrobial peptides. **PloS one**, **8**(6), e66557.
- 285.Zhou, X. S. and Zhang, Y. X., 2002. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. **Biotechnology Letters**, **24** (17), 1449–1453.
- 286.Zhou, P., Jin, B., Li, H., & Huang, S. Y., 2018. HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. **Nucleic acids research**, **46**(W1), W443-W450.
- 287.Zhu, S., Gao, B., Tytgat J., 2005. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS α β superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **62**, 2257–2269.
- 288.Zhu, W., Hu, L., Wang, Y., Lv, L., Wang, H., Shi, W., ... & Lu, H., 2021. A hemolysin secretion pathway-based novel secretory expression platform for efficient manufacturing of tag peptides and anti-microbial peptides in *Escherichia coli*. **Bioresources and Bioprocessing**, **8**(1), 1-14.

289. Zeitler, B., Bernhard, A., Meyer, H., Sattler, M., Koop, H. U., Lindermayr, C. 2013. Production of a *de-novo* designed antimicrobial peptide in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Molecular Biology**, **81**(3): 259-272.
290. Zelezetsky, I.; Pacor, S.; Pag, U.; Papo, N.; Shai, Y.; Sahl, H.G.; Tossi, A., 2005. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: Effect on mode of action and cell specificity. **Biochem. J.** **390**, 177–188
291. Zelezetsky, I., and Tossi, A. 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.**, **1758**, 1436–1449.

EKLER

EK- 1

Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

Tris: (Sigma-Aldrich, T1503, ABD)

Tris-HCl: (Sigma-Aldrich, T5941, ABD)

Asetik asit: (Sigma-Aldrich, 27225, ABD)

Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄): (Merck, 101217, ABD)

EDTA: (Sigma-Aldrich, E5134, ABD)

Kalsiyum Klorür (CaCl₂): (Merck, 102382, ABD)

Gliserol: (Merck, 104093, ABD)

Sodyum Asetat (C₂H₃NaO₂): (Merck, 106268, ABD)

Sodyum Klorür (NaCl): (Merck, 106404, ABD)

Triton X-100: (Sigma-Aldrich, T8787, ABD)

CTAB: (Bio Basic, 57-09-0, Kanada)

Metanol: (Merck, 106009, ABD)

K₂HPO₄: (Merck, 105101, ABD)

KH₂PO₄: (Merck, 105101, ABD)

Akrilamid: (Merck, 800830, ABD)

Bisakrilamid: (Merck, M7279, ABD)

HCl:	(Merck, 100317, ABD)
Potasyum Hidroksit (KOH):	(Merck, 105012, ABD)
Fosforik asit :	(Merck, 100573, ABD)
SDS:	(Sigma-Aldrich, L3771, ABD)
Trisin:	(Bio-Rad, 1610713, ABD)
APS (Amonyum persulfat):	(Sigma- Aldrich, A9164, ABD)
Sodyum tiyosülfat:	(Merck, 106512, ABD)
Gümüş nitrat:	(Merck, 7761-88-8, ABD)
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃):	(Merck, 106392, ABD)
Formaldehit:	(Merck, 104003, ABD)
Agaroz:	(TransGen, GS201-01, Çin)
Yeast nitrogen base (YNB):	(Sigma-Aldrich, Y0626, ABD)
Biyotin:	(Sigma-Aldrich, B4501,ABD)
Sorbitol:	(Sigma-Aldrich, S1846, ABD)
MRD:	(Merck, 112535,ABD)
Agar-agar:	(Liofilchem, 61101, İtalya)
LB:	(Neogen-7279A,ABD)
YPD:	(VWR, J903, ABD)
Yeast Ekstract (Maya Ekstraktı):	(Oxoid, LP0021, İngiltere)

Pepton:

(Oxoid, LP0037, İngiltere)

EK 2.

Tampon ve Stok Çözeltiler

50X TAE (Tris Asetik asit EDTA) Stok Çözeltisi:

242g Tris, 57,1 ml asetik asit, 0.5M (186.1 g) EDTA) ultra saf su ile çözündürülüp son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve pH 8'e ayarlanmıştır. Çözelti otoklavda 121 oC'de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında (25 oC) muhafaza edilmiştir.

CaCl₂ (Kalsiyum Klorür) Çözeltisi (100mM):

1.47 g CaCl₂ tartılıp 100 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti 121°C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra +4oC muhafaza edilmiştir.

Gliserol + CaCl₂ Çözeltisi

1.5 g CaCl₂ tartılıp 85 ml su içerisinde çözündürülmüş, üzerine 15 ml gliserol eklenerek karıştırılmış, 121°C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra +4°C muhafaza edilmiştir. C₂H₃NaO₂ (Sodyum Asetat) Çözeltisi (3M):

24.6 g sodyum asetat tartılıp 100 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti 121°C'de 15 dk otoklavlanarak oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

STET Tamponu (pH 8)

50 mM EDTA (4.65 g), 150 mM NaCl (2.19g), 50 mM (1.51 g) Tris ve %5 Triton X-100 50 ml saf su ile çözündürüldükten sonra son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş, çözelti oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

Proteinaz K

20 mg proteinaz K tartıldıktan sonra 500 µl steril su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

CTAB Stok Tamponu

100 ml 1M Tris (pH: 8), 280 ml 5M NaCl, 40 ml 0.5 M EDTA (pH: 8), 20 gr CTAB (hexadecyltrimethylammoniumbromide) karıştırılarak çözündürülür son hacim 1000 ml’ye tamamlanır. Çözelti 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş, çözelti oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

%10’luk CTAB-0,7 M NaCl Çözeltisi:

100 ml’lik çözelti için 10 g CTAB ve 4.09 g NaCl tartılarak 70 ml saf suda çözündürülmüş hacim saf su ile hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır. Çözelti otoklavda 121 °C’de 15 dk süre ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

TE Tamponu:

0.24 g Tris-HCl ve 0.074 g EDTA 100 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim saf su ile 200 ml’ye tamamlanmıştır. Çözelti pH’sı 8’e ayarlandıktan sonra 121 °C’de 15 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

10X YNB (%13.4 Yeast Nitrogen Base):

Amonyum sülfat içeren ve aminoasit içermeyen yeast nitrogen base (YNB)’den 13,4 g tartılıp 100 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 4°C’de depolanmıştır.

500X B (0.02% Biotin):

20 mg biotin 100 ml saf suda çözündürüldükten sonra çözelti 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve 4°C’de muhafaza edilmiştir.

10X M (5% Metanol)

5 ml metanol 95 ml saf su ile karıştırılmış, karışım 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş, sonrasında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

10X GY (10% Gliserol):

10 ml gliserol 90 ml saf su ile karıştırılmıştır. Çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş, Hazırlanan karışım oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

1 M Potasyum Fosfat Buffer, (pH 6.0)

1 M K_2HPO_4 çözeltisi için; 174 g K_2HPO_4 750 ml saf suda çözündürüldükten sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

1 M KH_2PO_4 çözeltisi için; 136 g KH_2PO_4 750 ml saf suda çözündürüldükten sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

1 M potasyum tamponu oluşturmak için; 868 ml 1 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 132 ml 1 M K_2HPO_4 çözeltisi karıştırılmıştır. Çözelti, KOH ya da fosforik asit kullanılarak pH'ı 6.0 ± 0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözelti 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

AB-6 Tamponu (49.5% T, 6% C)

46.5 g akrilamid ve 3 g bisakrilamid tartılıp 30 ml ultra saf su ile çözündürüldükten sonra son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti +7 °C derecede muhafaza edilmiştir.

3X Jel Tamponu (pH 8.45)

36.3 g Tris, 0.3 g SDS, 4.5 ml HCl önce 20 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüş sonrasında son hacim ultra saf su ile 100 ml tamamlanmıştır. Çözeltinin son pH'sı 8.45'e ayarlandıktan sonra çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

APS(%10 Amonyum persulfat)

0.025 g APS tartılıp 250 µl ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. APS kullanılacağı zaman günlük hazırlanmış, artan çözelti tekrardan kullanılmamıştır.

Anot Tamponu (pH 8. 9)

12.1 gr tris, 1 ml HCl 100 ml ultra saf su içerisinde çözündüldükten sonra son hacim ultra saf su 1 litreye tamamlanmıştır. Çözelti son hacmi pH 8.25'e ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

Katot Tamponu (pH 8.25)

12.1 g tris, 17. 9 g trisin, 1 g SDS tartılarak 100 ml ultra saf su içerisinde çözündürüldükten sonra son hacim ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Çözelti son hacmi pH 8.25'e ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmiştir.

Sabitleme Solüsyonu

Sabitleme solüsyonu 50 ml metanol, 5 ml asetik asit ve 45 ml ultra saf su karıştırılarak elde edilmiştir. Solüsyon +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sodyum Tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Çözeltisi

20 mg sodyum tiyosülfat tartılarak 100 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Gümüş Nitrat (AgNO_3) Çözeltisi

0.1 g gümüş nitrat tartılarak 100 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Geliştirici Çözelti

2 g sodyum karbonat 50 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüş üzerine %0.036'lık formaldehitten 40 µl eklendikten sonra son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sonlandırma Çözeltisi

5 ml asetik asit, 95 ml ultra saf su ile karıştırılmıştır. Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

MRD (Maximum Recovery Diluent : Maksimum Geri Kazanım Seyreltici)

0.98 g MRD tartılarak 100 ml saf su içerisinde çözündürülmüş, 4.5 ml cam tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir.

***E. coli* ve *P. pastoris* Kültür Ortamları**

LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri:

2.5 g LB sıvı besiyeri tartılmış 100 ml saf suda çözündürülmüştür. Besiyeri 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir.

LB agar:

LB sıvı besiyeri otoklav edilmeden önce 15 g/L oranında agar agar eklenmiş ve iyice çözünmesi sağlanmıştır. Besiyeri 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiş, sonrasında 10 cm'lik petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Zeosinli LB agar hazırlamak için; besiyeri ~50°C'ye soğutulmuş sonrasında üzerine 50 µg/ml oranında zeosin (ThermoFisher, R25001, ABD,) eklenmiş ve petrilere dağıtılmıştır. Petriler ekim yapılana kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Sıvı Besiyeri:

5 g YPD broth 100 ml saf suda çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dk otoklav uygulaması ile steril edilmiştir.

YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol) Agar

5 g YPD broth, 1,5 g sorbitol ve 1,5 g agar agar tartılarak 100 ml saf suda çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere çökülerek katılaşması beklenmiştir.

Zeosinli YPDS agar için; otoklav sonrası besiyeri sıcaklığı ~50°C'ye soğutulmuş sonrasında 100-1000 µg/ml oranında zeosin eklenmiş ve petrilere yayılmıştır.

YPD Agar:

YPD sıvı besiyeri otoklav edilmeden önce 15 g/L oranında agar agar eklenmiş ve çözündürülmüştür. Besiyeri 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere dökülmüş sonrasında katılaşması beklenmiştir. Zeosinli YPD agar hazırlamak için; besiyeri ~50°C'ye soğutulduktan sonra üzerine 100-1000 µg/ml oranında zeosin eklenerek karıştırılmış sonrasında petrilere dökülmüştür. Petriler ekim yapılncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium):

10 g maya ekstraktı ve 20 g pepton 700 ml saf su içinde çözündürüldükten sonra, 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan karışımın üzerine,

- 100 ml 1 M potasyum fosfat buffer
- 100 ml 10X YNB
- 2 ml 500X B
- 100 ml 10X GY eklenerek BMGY hazırlanmıştır.

BMMY (Buffered Methanol-complex Medium):

10 g maya ekstraktı ve 20 g pepton 700 ml saf su içinde çözündürüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilen karışımın üzerine,

- 100 ml 1 M potasyum fosfat buffer
- 100 ml 10X YNB
- 2 ml 500X B
- 100 ml 10X M eklenerek BMMY hazırlanmıştır.



EK 3.



Tarih: 01.06.2022

Toplantı Sayısı: 06



Karar No:22/110

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 01.06.2022 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞ A	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Selma BÜYÜKKILIÇ BEYZİ	Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Ali İleriş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTA
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Filiz ASAN	Avukat	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği'nden Prof.Dr.Zühal KESMEN tarafından sunulan "Rekombinant Antimikrobiyal Peptid Üretimi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 01.06.2022

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :

<i>Antimikrobiyal Peptid</i>	<i>Kaynak</i>	<i>Peptid Sekansı</i>	<i>Antimikrobiyal Aktivite</i>
<i>Antimicrobial peptide 2, AMP2</i>	<i>Amaranthus caudatus</i>	VGECVRGRCPSGMCCSQFGYCGKGPKYCGR	0,929
<i>Tracheal antimicrobial peptide, TAP</i>	<i>Bos taurus</i>	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCR KK	0,866
<i>Rugosin-A</i>	<i>Rana rugosa</i>	GLLNTFKDWAISIAKGAGKGVLTTLSCKLDKSC	0,963
<i>Rugosin-B</i>	<i>Rana rugosa</i>	SLFSLIKAGAKFLGKNLLKQGAQYAACKVSKEC	0,894
<i>Neutrophil antibiotic peptide NP-4, RatNP-4, Neutrophil defensin 4</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	ACYCRIGACVSGERLTGACGLNGRIYRLCCR	0,983
<i>Esculentin-2A</i>	<i>Rana esculenta</i>	GILSLVKGVAKLAKGLAKEGGKFGLELIACKIAKQ C	0,992
<i>Esculentin-1V protein</i>	<i>Rana versabilis</i>	GIFSKFAGKGIKDLIIKGVKGIAKEAGMDVIRTGIDIA GCKIKGEC	0,998
<i>Chicken heterophil peptide CHP1</i>	<i>Gallus gallus</i>	GRKSDCFRKSFGCAFLKCPSLTLISGKCSRFYLCCKR IR	0,983
<i>Turkey heterophil peptide THP1</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	GKREKCLRRNGFCAFLKCPTLSVISGTCSRFQVCC	0,986
<i>Turkey heterophil peptide THP2</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	LFCKRGTCHFGRCPSHLIKVGSCFGFRSCCKWPWD A	0,921
<i>Leucocin A (DelC7)</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLA	0,731
<i>Pleurain-M1 antimicrobial peptide</i>	<i>Rana pleuraden</i>	GLLDSVKEGLKKVAGQLDLTKCKISGCTPA	0,915

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Myticin-B</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HPHVCTSYCYCSKFCGTAGCTRYGCRNLHRGKLCFC LHCSR	0,983
<i>Spheniscin-2</i>	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	SFGLCRLRRGFCARGRCRFPSIPIGRCSRFBVQCCRRV W	0,992
<i>Hedyotide B1</i>	<i>Hedyotis biflora</i>	GTRCGETCFVLPCWSAKFGCYCQKGFCYRN	0,953
<i>Cathelicidin-BF</i>	<i>Bungarus fasciatus</i>	KFFRKLKKS VKKRAKEFFKKPRVIGVSIPF	0,94
<i>Cathelin-related peptide SC5, Antibacterial peptide SMAP-29, Myeloid antibacterial peptide MAP-29 Cathelicidin WAM2</i>	<i>Ovis aries</i>	RGLRRLGRKIAHG VKKYGPTVLRIRIAG	0,985
	<i>Macropus eugenii</i>	KRGLWESLKRKATKLGDDIRNTLRNFKIKFPVPRQG	0,797
<i>Cathelicidin-2, Fowlicidin-2</i>	<i>Gallus gallus</i>	LVQRGRFGRFLRKIRRFPRKVTITIQGSARFG	0,974
<i>Channel catfish beta-defensin, ccBD</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	VSFPWSCAALSGVCRQGACLPSELYFGPLGCGKGSL CCVSYFL	0,96
<i>mCRAMP, Cathelin-related antimicrobial peptide</i>	<i>Mus musculus</i>	ISRLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQP EQ	0,82
<i>Ostricacin-2</i>	<i>Struthio camelus</i>	APGNKAECEREKGYCGFLKCSFPFVVS GKCSRFFFC CKNIW	0,921
<i>Ostricacin-1</i>	<i>Struthio camelus</i>	LFCRKGTCHFGGCPAHLVKVGSCFGFRACCKWPW DV	0,923
<i>Ostricacin-3</i>	<i>Struthio camelus</i>	IPRPLDPCIAQNGRCFTGICRYPYFWIGTCRNGKSCC RRR	0,922

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Ostricacin-4</i>	<i>Struthio camelus</i>	LPVNEAQCQRQVGGYCGLRICNFPSRFLGLCTRNHPC CSRWW	0,821
<i>Aedes Cecropin-A</i>	<i>Aedes aegypti</i>	GGLKKLGKKLEGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKAL	0,978
<i>Moricin-like peptide A</i>	<i>Galleria mellonella</i>	KVNVNAIKKGGKAIGKGFKVISAASTAHDVYEHK NRRH	0,917
<i>Moricin-1</i>	<i>Hyblaea puera</i>	AKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKP KKRKH	0,933
<i>Buforin-1</i>	<i>Bufo gargarizans</i>	AGRQKQGGKVRKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRL RKNY	0,962
<i>Caerulein precursor-related fragment, CPRF-Eb</i>	<i>Rana esculenta</i>	GLGSFLKNAIKIAGKVGSTIGKVADAINKE	0,959
<i>DEF1, AgDef1, Def-AAA, Defensin</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	ATCDLASGFGVGSSLCAAHCIARRYRGGYCNSKAV CVCN	0,983
<i>Defensin-1, PHD1</i>	<i>Papio hamadryas</i>	RRICRCRIGRCLGLEVYFGVCFLHGRLARRCCR	1
<i>Defensin-1, American oyster defensin, AOD</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	GFGCPWNRQYQCHSHCRSIGRLGGYCAGSLRLTCTC YRS	0,966
<i>Paneth cell-specific alpha-defensin 1, DEFA1</i>	<i>Equus caballus</i>	SCTCRRRAWICRWGERHSGKCIDQKGSTYRLCCRR	0,863

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Avian beta-defensin 2, AvBD2, Gallinacin-2</i>	<i>Gallus gallus</i>	LFCKGGSCHFGGCPSHLIKVGSCFGFRSCCKWPWN A	0,971
<i>Neutrophil defensin 2, HANP-2</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	CFCKRPVCDSETQIGYCRLGNTFYRLCCRQ	0,832
<i>Beta-defensin 14, BD-14, mBD-14</i>	<i>Mus musculus</i>	FLPKTLRKFFCRIRGGRCVLNCLGKEEQIGRCSNS GRKCCRKKK	0,917
<i>Neutrophil defensin 3, HNP-3</i>	<i>Homo sapiens</i>	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWLAFCC	0,975
<i>Defensin-3, PHD3</i>	<i>Papio hamadryas</i>	RTCRCLGRCSRRESYSGSCNINRIYSLCCR	0,969
<i>Channel catfish beta-defensin, ccBD</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	VSPWSCAALSGVCRQGACLPSELYFGPLGCGKGS CCVSYFL	0,96
<i>Theta defensin 3, RTD-3</i>	<i>Macaca mulatta</i>	GFCRCICTRGFCRCICTR	0,995
<i>Rattusin, Defensin alpha-related sequence 1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	LRVRRTLQCSCRRVCRNTCSCIRLSRSTYAS	0,825
<i>Male-specific defensin, HIMS-Defensin</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	DFGCARGMIFVCMRRARMYPGSTGYCQGFRMC DTHPIRRPPFIMG	0,523
<i>Defensin 1, AlDef-1</i>	<i>Acalolepta luxuriosa</i>	FTCDVLSVEAKGVKLNHAACGIHCLFRRRTGGYCN KKRVCICR	0,964
<i>Hemocyte defensin Defh2, Cg-Defh2</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	GFGCPGDQYECNRHCRSIGCRAGYCDVTLWLRCT CTGCSGKK	0,976

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Brevinin-2-OA3</i>	<i>Odorrana andersonii</i>	GLLDTFKNMAINAAHGAGVSVLNALSCKLKKTC	0,933
<i>Brevinin-2-OA7</i>	<i>Odorrana andersonii</i>	GVLGTVKDLLIGAGKSAAQSTLKTLSCKISNDC	0,942
<i>Brevinin-2PTb</i>	<i>Rana picturata</i>	GFKGAFKNVMFGIAKSAGKSALNALACKIDKSC	0,987
<i>Brevinin-2Ei</i>	<i>Rana esculenta</i>	GILSTIKDFAIKAGKGAAGLLEMASCKLSGQC	0,967
<i>Brevinin-2GHb, AMP-2</i>	<i>Rana guentheri</i>	GVITDALKGAAKTVAEELLRKAHCKLTNSC	0,842
<i>Brevinin-1Pb</i>	<i>Rana pipiens</i>	FLPIIAGIAAKVF PKIFCAISKKC	0,978
<i>Brevinin-2-OR3</i>	<i>Odorrana rotodora</i>	GLIDTIKNMALNAAKSAGVSVLNTLSCKLSKTC	0,942
<i>Brevinin-20a</i>	<i>Rana ornativentris</i>	GLFNVFKGALKTAGKHVAGSLLNQLCKKVSGGC	0,987
<i>Caltrin, Calcium transport inhibitor, Peptide YY-2, Seminalplasmin, SPLN</i>	<i>Bos taurus</i>	SDEKASPDKHHRFSLSR YAKLANRLANPKLLETFLS KWIGDRGNRSVK	0,519
<i>Palustrin-2Isa</i>	<i>Amolops granulosus</i>	GFMDTAKNVAKNVAVTLLDKLKCKITGGC	0,911

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Palustrin-2ISb</i>	<i>Odorrana ishikawae</i>	GLWNSIKIAGKKLFVNVLDKIRCKVAGGCKTSPDV E	0,936
<i>Ranatuerin-2PRg</i>	<i>Rana pretiosa</i>	GILSSFKDVAKGVAKNVAAQLLDKLKCKITGC	0,974
<i>Cecropin-P4</i>	<i>Ascaris suum</i>	SWLSKTYKKLENSAKKRISSEGVAIAILGGLR	0,903
<i>Cecropin-A SI</i>	<i>Spodoptera litura</i>	RWKVFKKIEKVGRNVRDGIKAGPAIGVLGQAKAL G	0,986
<i>Sapecin-B</i>	<i>Sarcophaga peregrina</i>	LTCEIDRSLCLLHCRLKGYLRAYCSQQKVCRCVQ	0,842
<i>M-oxotoxin-Ot2a, M-OXTX-Ot2a, Oxi2a, Oxyopinin-2a</i>	<i>Oxyopes takobius</i>	GKFVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDL DKN Q	0,926
<i>AAEL000598-PA, Aedesin</i>	<i>Aedes aegypti</i>	GGLKKLGKKLEGAGKRVFKASEKALPVVVGIIKAIG K	0,995
<i>Mytilin-B</i>	<i>Mytilus edulis</i>	SCASRCKGHCRARRCGYYVSVLYRGRCYCKCLRC	0,992
<i>PR-39</i>	<i>Sus scrofa</i>	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP	1
<i>SI moricin</i>	<i>Spodoptera litura</i>	GKIPVKAIAKAGAAIGKGLRAINIASTAHDVYSFFKP KHKKK	0,94
<i>WB Piscidin 5</i>	<i>Morone chrysops x Morone saxatilis</i>	LIGSLFRGAKAIFRGARQGWRSHKAVSRYRARYVR RPVIYYHRVYP	0,912

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Piscidin 3</i>	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	FIHHIFRGIVHAGRSIGRFLTG	0,905
<i>Hepcidin</i>	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF	0,999
<i>Dermaseptin DRG3</i>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	ALWKTIKAGAGKMIGSLAKNLLGSQAQPES	0,905
<i>Drosocin, Drosocin-1</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	GKPRPYSPRPTSHPRPIRV	0,968
<i>Androctonin</i>	<i>Androctonus australis</i>	RSVCRQIKICRRRGGCYYKCTNRPY	0,877
<i>Antimicrobial peptide PGQ, Preproprotein pGQ</i>	<i>Xenopus laevis</i>	GVLSNVIGYLKKLGTGALNAVLKQ	0,979
<i>Bacteriocin plantaricin A, PlnA</i>	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>	YSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW	0,837
<i>Astacidin PcAst-2</i>	<i>Procambarus clarkii</i>	FYPRPYRPPYLPDPRPFPRPLPAFGHEFRRH	0,764
<i>Thanatin</i>	<i>Polisse maculiventris</i>	GSKKPVPIIYCNRRGTGKCQRM	0,842
<i>Maximin 5</i>	<i>Bombina maxima</i>	SIGAKILGGVKTFFKGALKELASTYLQ	0,842
<i>Apidaecin-2</i>	<i>Apis mellifera</i>	GNNRPIYIPQRPHPRL	0,858
<i>Citropin-1.1.3</i>	<i>Litoria citropa</i>	GLFDVIKKVASVIGLASP	0,933

Antimikrobiyal Peptid	Kaynak	Peptid Sekansı	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Spinigerin</i>	<i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	HVDKKVADKVLLLKQLRIMRLTRL	0,897
<i>Japonicin-2</i>	<i>Rana japonica</i>	FGLPMLSILPKALCILLKRKC	0,948
<i>Clavanin A acid</i>	<i>Styela clava</i>	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHF	0,907
<i>Lycotoxin-2, M-lycotoxin-Hc2a</i>	<i>Hogna carolinensis</i>	KIKWFKTMKSIKFIKQMKKHLGGE	0,892
<i>Ponericin-G1</i>	<i>Pachycondyla goeldii</i>	GWKDWAKKAGGWLKKKGPGMAKAALKAAMQ	0,996
<i>Hymenochirin-5Pa</i>	<i>Pseudhymenochirus merlini</i>	ITIPPIVKDTLKKFFKGGIAGVMGKSQ	0,946
<i>VP6 protein, EpVP6</i>	<i>Eumenes pomiformis</i>	FGPVIGLLSGILKSLL	0,974
<i>Maculatin 1.1 acid</i>	<i>Litoria genimaculata</i>	GLFGVLAKVAAHVVPAAIEHF	0,808
<i>Abaecin</i>	<i>Apis cerana cerana</i>	YVPLPNVPQGRRPFTFPGQGPFNPKIKWPQGY	0,5

EK 5.

11 aminoasit uzunluğundaki peptid setleri

Peptid kodu	X:K aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
K11-1	GLLDKLSCKISGKGLLDTIKNVAKKCPSGERYSGYC	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-2	GLLDKLSCKISGKGLLDTIKNVAKKFGFRSCCKWPW	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-3	GLLDKLSCKISGKGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNF	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-4	GLLDKLSCKISGKCPSGERYSGYCKGLLDTIKNVAK	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-5	GLLDKLSCKISGKCPSGERYSGYCKFGFRSCCKWPW	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-6	GLLDKLSCKISGKCPSGERYSGYCKIASVGNDIYNF	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-7	GLLDKLSCKISGKFGFRSCCKWPWKGLLDTIKNVAK	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-8	GLLDKLSCKISGKFGFRSCCKWPWKCPSGERYSGYC	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-9	GLLDKLSCKISGKFGFRSCCKWPWKIASVGNDIYNF	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-10	GLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNFKGLLDTIKNVAK	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-11	GLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNFKCPSGERYSGYC	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-12	GLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNFKFGFRSCCKWPW	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-13	GGLLDTIKNVAKKLLDKLSCKISGKCPSGERYSGYC	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-14	GGLLDTIKNVAKKLLDKLSCKISGKFGFRSCCKWPW	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-15	GGLLDTIKNVAKKLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNF	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-16	GGLLDTIKNVAKKCPSGERYSGYCKLLDKLSCKISG	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-17	GGLLDTIKNVAKKCPSGERYSGYCKFGFRSCCKWPW	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T
K11-18	GGLLDTIKNVAKKCPSGERYSGYCKIASVGNDIYNF	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-19	GGLLDTIKNVAKKFGFRSCCKWPWKLLDKLSCKISG	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-20	GGLLDTIKNVAKKFGFRSCCKWPWKCPSGERYSGYC	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T
K11-21	GGLLDTIKNVAKKFGFRSCCKWPWKIASVGNDIYNF	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-22	GGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNFKLLDKLSCKISG	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-23	GGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNFKCPSGERYSGYC	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-24	GGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNFKFGFRSCCKWPW	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-25	GCPSGERYSGYCKLLDKLSCKISGKGLLDTIKNVAK	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-26	GCPSGERYSGYCKLLDKLSCKISGKFGFRSCCKWPW	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-27	GCPSGERYSGYCKLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNF	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-28	GCPSGERYSGYCKGLLDTIKNVAKKLLDKLSCKISG	0.875	9.45	3.8	Ç	27.78	0.54	NT
K11-29	GCPSGERYSGYCKGLLDTIKNVAKKFGFRSCCKWPW	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T
K11-30	GCPSGERYSGYCKGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNF	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-31	GCPSGERYSGYCKFGFRSCCKWPWKLLDKLSCKISG	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-32	GCPSGERYSGYCKFGFRSCCKWPWKGLLDTIKNVAK	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T
K11-33	GCPSGERYSGYCKFGFRSCCKWPWKIASVGNDIYNF	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T
K11-34	GCPSGERYSGYCKIASVGNDIYNFKLLDKLSCKISG	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-35	GCPSGERYSGYCKIASVGNDIYNFKGLLDTIKNVAK	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-36	GCPSGERYSGYCKIASVGNDIYNFKFGFRSCCKWPW	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T
K11-37	GFGFRSCCKWPWKLLDKLSCKISGKGLLDTIKNVAK	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-38	GFGFRSCCKWPWKLLDKLSCKISGKCPSGERYSGYC	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-39	GFGFRSCCKWPWKLLDKLSCKISGKIASVGNDIYNF	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-40	GFGFRSCCKWPWKGLLDTIKNVAKKLLDKLSCKISG	0.977	10.3	5.8	Ç	38.89	0.57	NT
K11-41	GFGFRSCCKWPWKGLLDTIKNVAKKCPSGERYSGYC	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T
K11-42	GFGFRSCCKWPWKGLLDTIKNVAKKIASVGNDIYNF	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-43	GFGFRSCCKWPWKCPSGERYSGYCKLLDKLSCKISG	0.933	9.07	4.7	Ç	27.78	0.41	T
K11-44	GFGFRSCCKWPWKCPSGERYSGYCKGLLDTIKNVAK	0.912	9.5	4.7	Ç	30.56	0.27	T

K11-45	GFGFRSCCKWPW K CPSGERYSGYC K IASVGNDIYNF	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T
K11-46	GFGFRSCCKWPW K IASVGNDIYNF K LLDKLSCKISG	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-47	GFGFRSCCKWPW K ASVGNDIYNF K GLLDTIKNVAK	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-48	GFGFRSCCKWPW K IASVGNDIYNF K CPSGERYSGYC	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T
K11-49	GIASVGNDIYNF K LLDKLSCKISG K GLLDTIKNVAK	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-50	GIASVGNDIYNF K LLDKLSCKISG K CPSGERYSGYC	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-51	GIASVGNDIYNF K LLDKLSCKISG K FGRSCCKWPW	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-52	GIASVGNDIYNF K GLLDTIKNVAK K LLDKLSCKISG	0.968	9.93	2.9	Ç	38.89	0.50	NT
K11-53	GIASVGNDIYNF K GLLDTIKNVAK K CPSGERYSGYC	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-54	GIASVGNDIYNF K GLLDTIKNVAK K FGRSCCKWPW	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-55	GIASVGNDIYNF K CPSGERYSGYC K LLDKLSCKISG	0.858	8.36	1.8	Ç	27.78	0.43	NT
K11-56	GIASVGNDIYNF K CPSGERYSGYC K GLLDTIKNVAK	0.806	8.81	1.9	Ç	30.56	0.37	NT
K11-57	GIASVGNDIYNF K CPSGERYSGYC K FGRSCCKWPW	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T
K11-58	GIASVGNDIYNF K FGRSCCKWPW K LLDKLSCKISG	0.942	9.58	3.8	Ç	38.89	0.48	NT
K11-59	GIASVGNDIYNF K FGRSCCKWPW K GLLDTIKNVAK	0.930	9.99	3.9	N	41.67	0.39	NT
K11-60	GIASVGNDIYNF K FGRSCCKWPW K CPSGERYSGYC	0.844	8.52	2.7	N	30.56	0.35	T

Peptid kodu	X: R aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
R11-1	GLLDKLSCKISG R GLLDTIKNVAK R CPSGERYSGYC	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-2	GLLDKLSCKISG R GLLDTIKNVAK R FGRSCCKWPW	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-3	GLLDKLSCKISG R GLLDTIKNVAK R IASVGNDIYNF	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-4	GLLDKLSCKISG R CPSGERYSGYC R GLLDTIKNVAK	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-5	GLLDKLSCKISG R CPSGERYSGYC R FGRSCCKWPW	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-6	GLLDKLSCKISG R CPSGERYSGYC R IASVGNDIYNF	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-7	GLLDKLSCKISG R FGRSCCKWPW R GLLDTIKNVAK	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-8	GLLDKLSCKISG R FGRSCCKWPW R CPSGERYSGYC	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-9	GLLDKLSCKISG R FGRSCCKWPW R IASVGNDIYNF	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-10	GLLDKLSCKISG R IASVGNDIYNF R GLLDTIKNVAK	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-11	GLLDKLSCKISG R IASVGNDIYNF R CPSGERYSGYC	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-12	GLLDKLSCKISG R IASVGNDIYNF R FGRSCCKWPW	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-13	GGLDTIKNVAK R LLDKLSCKISG R CPSGERYSGYC	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-14	GGLDTIKNVAK R LLDKLSCKISG R FGRSCCKWPW	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-15	GGLDTIKNVAK R LLDKLSCKISG R IASVGNDIYNF	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-16	GGLDTIKNVAK R CPSGERYSGYC R LLDKLSCKISG	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-17	GGLDTIKNVAK R CPSGERYSGYC R FGRSCCKWPW	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-18	GGLDTIKNVAK R CPSGERYSGYC R IASVGNDIYNF	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT
R11-19	GGLDTIKNVAK R FGRSCCKWPW R LLDKLSCKISG	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-20	GGLDTIKNVAK R FGRSCCKWPW R CPSGERYSGYC	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-21	GGLDTIKNVAK R FGRSCCKWPW R IASVGNDIYNF	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-22	GGLDTIKNVAK R IASVGNDIYNF R LLDKLSCKISG	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-23	GGLDTIKNVAK R IASVGNDIYNF R CPSGERYSGYC	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT
R11-24	GGLDTIKNVAK R IASVGNDIYNF R FGRSCCKWPW	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-25	GCPGERYSGYC R LLDKLSCKISG R GLLDTIKNVAK	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-26	GCPGERYSGYC R LLDKLSCKISG R FGRSCCKWPW	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-27	GCPGERYSGYC R LLDKLSCKISG R IASVGNDIYNF	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-28	GCPGERYSGYC R GLLDTIKNVAK R LLDKLSCKISG	0.753	9.5	3.8	Ç	28.27	0.48	NT
R11-29	GCPGERYSGYC R GLLDTIKNVAK R FGRSCCKWPW	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-30	GCPGERYSGYC R GLLDTIKNVAK R IASVGNDIYNF	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT

R11-31	GCPSGERYSGYCRFGFRSCCKWPWRLLDKLSCKISG	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-32	GCPSGERYSGYCRFGFRSCCKWPWRGLLDTIKNVAK	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-33	GCPSGERYSGYCRFGFRSCCKWPWRIASVGNDIYNF	0.719	8.53	2.7	N	30.56	0.42	NT
R11-34	GCPSGERYSGYCRIASVGNDIYNFRLLDKLSCKISG	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-35	GCPSGERYSGYCRIASVGNDIYNFRGLLDTIKNVAK	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT
R11-36	GCPSGERYSGYCRIASVGNDIYNFRFGFRSCCKWPW	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-37	GFGFRSCCKWPWRLLDKLSCKISGRGLLDTIKNVAK	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-38	GFGFRSCCKWPWRLLDKLSCKISGRCPSGERYSGYC	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-39	GFGFRSCCKWPWRLLDKLSCKISGRIASVGNDIYNF	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-40	GFGFRSCCKWPWRGLLDTIKNVAKRLLDKLSCKISG	0.955	10.5	5.8	Ç	38.89	0.50	NT
R11-41	GFGFRSCCKWPWRGLLDTIKNVAKRCPSGERYSGYC	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-42	GFGFRSCCKWPWRGLLDTIKNVAKRIASVGNDIYNF	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-43	GFGFRSCCKWPWRCPSGERYSGYCRLLDKLSCKISG	0.890	9.09	4.7	Ç	27.78	0.43	NT
R11-44	GFGFRSCCKWPWRCPSGERYSGYCRGLLDTIKNVAK	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-45	GFGFRSCCKWPWRCPSGERYSGYCRIASVGNDIYNF	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-46	GFGFRSCCKWPWRIASVGNDIYNFRLLDKLSCKISG	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-47	GFGFRSCCKWPWRASVGNDIYNFRGLLDTIKNVAK	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-48	GFGFRSCCKWPWRIASVGNDIYNFRCPSGERYSGYC	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-49	GIASVGNDIYNFRLLDKLSCKISGRGLLDTIKNVAK	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-50	GIASVGNDIYNFRLLDKLSCKISGRCPSGERYSGYC	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-51	GIASVGNDIYNFRLLDKLSCKISGRFGFRSCCKWPW	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-52	GIASVGNDIYNFRGLLDTIKNVAKRLLDKLSCKISG	0.913	10.5	2.9	Ç	38.89	0.46	NT
R11-53	GIASVGNDIYNFRGLLDTIKNVAKRCPSGERYSGYC	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT
R11-54	GIASVGNDIYNFRGLLDTIKNVAKRFGFRSCCKWPW	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-55	GIASVGNDIYNFRCPSGERYSGYCRLLDKLSCKISG	0.716	8.36	1.8	Ç	27.78	0.42	NT
R11-56	GIASVGNDIYNFRCPSGERYSGYCRGLLDTIKNVAK	0.632	8.83	1.9	Ç	30.56	0.36	NT
R11-57	GIASVGNDIYNFRCPSGERYSGYCRFGFRSCCKWPW	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T
R11-58	GIASVGNDIYNFRFGFRSCCKWPWRLLDKLSCKISG	0.876	9.66	3.8	N	38.96	0.36	NT
R11-59	GIASVGNDIYNFRFGFRSCCKWPWRGLLDTIKNVAK	0.842	10.1	3.9	N	41.67	0.30	NT
R11-60	GIASVGNDIYNFRFGFRSCCKWPWRCPSGERYSGYC	0.845	9.55	4.7	Ç	30.56	0.29	T

Peptid kodu	X:I aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
I11-1	GLLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYC	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT
I11-2	GLLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPW	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-3	GLLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNF	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-4	GLLDKLSCKISGICPSGERYSGYCIGLLDTIKNVAK	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT
I11-5	GLLDKLSCKISGICPSGERYSGYCIFGFRSCCKWPW	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-6	GLLDKLSCKISGICPSGERYSGYCIIASVGNDIYNF	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-7	GLLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAK	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-8	GLLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYC	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-9	GLLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNF	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-10	GLLDKLSCKISGIIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAK	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-11	GLLDKLSCKISGIIASVGNDIYNFIGPSGERYSGYC	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-12	GLLDKLSCKISGIIASVGNDIYNFIGFRSCCKWPW	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-13	GGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISGICPSGERYSGYC	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT
I11-14	GGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPW	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-15	GGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISGIIASVGNDIYNF	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-16	GGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYCILLDKLSCKISG	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT

I11-17	GGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYCIGFRSCCKWPW	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-18	GGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYCIIASVGNDIYNF	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-19	GGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISG	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-20	GGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYC	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-21	GGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNF	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-22	GGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNFILLDKLSCKISG	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-23	GGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNFICPSGERYSGYC	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-24	GGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNFIFGFRSCCKWPW	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-25	GCPSGERYSGYCIILLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAK	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT
I11-26	GCPSGERYSGYCIILLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPW	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-27	GCPSGERYSGYCIILLDKLSCKISGIIASVGNDIYNF	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-28	GCPSGERYSGYCIIGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISG	0.919	8.37	1.8	N	33.33	0.49	NT
I11-29	GCPSGERYSGYCIIGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPW	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-30	GCPSGERYSGYCIIGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNF	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-31	GCPSGERYSGYCIIFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISG	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-32	GCPSGERYSGYCIIFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAK	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-33	GCPSGERYSGYCIIFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNF	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T
I11-34	GCPSGERYSGYCIIASVGNDIYNFILLDKLSCKISG	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-35	GCPSGERYSGYCIIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAK	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-36	GCPSGERYSGYCIIASVGNDIYNFIFGFRSCCKWPW	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T
I11-37	GFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAK	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-38	GFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISGICPSGERYSGYC	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-39	GFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISGIIASVGNDIYNF	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-40	GFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISG	0.961	9.71	3.8	N	44.44	0.54	NT
I11-41	GFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYC	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-42	GFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAKIIASVGNDIYNF	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-43	GFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYCILLDKLSCKISG	0.942	8.28	2.7	N	33.33	0.45	NT
I11-44	GFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYCIGLLDTIKNVAK	0.914	8.53	2.7	N	36.11	0.29	T
I11-45	GFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYCIIASVGNDIYNF	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T
I11-46	GFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNFILLDKLSCKISG	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-47	GFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAK	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-48	GFGFRSCCKWPWIIASVGNDIYNFICPSGERYSGYC	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T
I11-49	GIASVGNDIYNFILLDKLSCKISGIGLLDTIKNVAK	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-50	GIASVGNDIYNFILLDKLSCKISGICPSGERYSGYC	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-51	GIASVGNDIYNFILLDKLSCKISGIFGFRSCCKWPW	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-52	GIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAKILLDKLSCKISG	0.966	8.72	0.9	N	44.44	0.49	NT
I11-53	GIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAKICPSGERYSGYC	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-54	GIASVGNDIYNFIGLLDTIKNVAKIFGFRSCCKWPW	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-55	GIASVGNDIYNFICPSGERYSGYCILLDKLSCKISG	0.914	6.02	-0.2	N	33.33	0.46	NT
I11-56	GIASVGNDIYNFICPSGERYSGYCIGLLDTIKNVAK	0.858	6.11	-0.1	N	36.11	0.40	NT
I11-57	GIASVGNDIYNFICPSGERYSGYCIGFRSCCKWPW	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T
I11-58	GIASVGNDIYNFIFGFRSCCKWPWILLDKLSCKISG	0.914	8.38	1.8	N	44.44	0.43	NT
I11-59	GIASVGNDIYNFIFGFRSCCKWPWIGLLDTIKNVAK	0.897	8.91	1.9	N	47.22	0.40	NT
I11-60	GIASVGNDIYNFIFGFRSCCKWPWICPSGERYSGYC	0.904	7.65	0.7	N	36.11	0.45	T

Peptid kodu	X:L aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
L11-1	GLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAKLCPSGERYSGYC	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-2	GLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPW	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT

L11-3	GLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNF	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-4	GLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYCLGLLDTIKNVAK	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-5	GLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYCLFGFRSCCKWPW	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-6	GLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNF	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-7	GLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAK	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT
L11-8	GLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPWLCPSGERYSGYC	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-9	GLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNF	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT
L11-10	GLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAK	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-11	GLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNFLCPSGERYSGYC	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-12	GLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPW	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT
L11-13	GGLLDTIKNVAKLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYC	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-14	GGLLDTIKNVAKLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPW	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT
L11-15	GGLLDTIKNVAKLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNF	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-16	GGLLDTIKNVAKLCPSGERYSGYCLLLDKLSCKISG	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-17	GGLLDTIKNVAKLCPSGERYSGYCLFGFRSCCKWPW	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-18	GGLLDTIKNVAKLCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNF	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-19	GGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPWLLDKLSCKISG	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT
L11-20	GGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPWLCPSGERYSGYC	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-21	GGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNF	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-22	GGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISG	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-23	GGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNFLCPSGERYSGYC	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-24	GGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPW	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-25	GCPSGERYSGYCLLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAK	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-26	GCPSGERYSGYCLLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPW	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-27	GCPSGERYSGYCLLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNF	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-28	GCPSGERYSGYCLGLLDTIKNVAKLLDKLSCKISG	0.856	8.37	1.8	Ç	33.33	0.56	NT
L11-29	GCPSGERYSGYCLGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPW	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-30	GCPSGERYSGYCLGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNF	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-31	GCPSGERYSGYCLFGFRSCCKWPWLLDKLSCKISG	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-32	GCPSGERYSGYCLFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAK	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-33	GCPSGERYSGYCLFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNF	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T
L11-34	GCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISG	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-35	GCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAK	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-36	GCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPW	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T
L11-37	GFGFRSCCKWPWLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAK	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT
L11-38	GFGFRSCCKWPWLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYC	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-39	GFGFRSCCKWPWLLDKLSCKISGLIASVGNDIYNF	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT
L11-40	GFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAKLLDKLSCKISG	0.947	9.71	3.8	N	44.44	0.61	NT
L11-41	GFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAKLCPSGERYSGYC	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-42	GFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAKLIASVGNDIYNF	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-43	GFGFRSCCKWPWLCPSGERYSGYCLLLDKLSCKISG	0.896	8.27	2.7	N	33.33	0.46	T
L11-44	GFGFRSCCKWPWLCPSGERYSGYCLGLLDTIKNVAK	0.848	8.53	2.7	N	36.11	0.37	T
L11-45	GFGFRSCCKWPWLCPSGERYSGYCLIASVGNDIYNF	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T
L11-46	GFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISG	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT
L11-47	GFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAK	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-48	GFGFRSCCKWPWLIASVGNDIYNFLCPSGERYSGYC	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T
L11-49	GIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISGLGLLDTIKNVAK	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-50	GIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISGLCPSGERYSGYC	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-51	GIASVGNDIYNFLLLDKLSCKISGLFGFRSCCKWPW	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT

L11-52	GIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAKLLLDKLSCKISG	0.941	8.72	0.9	N	44.44	0.54	NT
L11-53	GIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAKLCPGGERYSGYC	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-54	GIASVGNDIYNFLGLLDTIKNVAKLFGFRSCCKWPW	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-55	GIASVGNDIYNFLCPGGERYSGYCLLLDKLSCKISG	0.820	6.02	-0.2	N	33.33	0.48	NT
L11-56	GIASVGNDIYNFLCPGGERYSGYCLGLLDTIKNVAK	0.730	6.11	-0.1	N	36.11	0.43	NT
L11-57	GIASVGNDIYNFLCPGGERYSGYCLFGFRSCCKWPW	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T
L11-58	GIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPWLLLDKLSCKISG	0.846	8.38	1.8	N	44.44	0.48	NT
L11-59	GIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPWLGLLDTIKNVAK	0.814	8.91	1.9	N	47.22	0.43	NT
L11-60	GIASVGNDIYNFLFGFRSCCKWPWLCPGGERYSGYC	0.781	7.65	0.7	N	36.11	0.40	T

12 aminoasit uzunluğundaki peptid setleri

Peptid kodu	X:K aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
K12-1	GSLLNKLCKLSGKDAIKKVAAGAAGKCSRFRSCCKWPW	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-2	GSLLNKLCKLSGKDAIKKVAAGAAGKACLGECHFGRC	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-3	GSLLNKLCKLSGKDAIKKVAAGAAGKHCRARGRLGGYC	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-4	GSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAAGAAGK	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-5	GSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPWKACLGECHFGRC	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-6	GSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYC	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-7	GSLLNKLCKLSGKACLGECHFGRCDAIKKVAAGAAGK	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-8	GSLLNKLCKLSGKACLGECHFGRCCSRFRSCCKWPW	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-9	GSLLNKLCKLSGKACLGECHFGRCKHCRARGRLGGYC	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-10	GSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYCKDAIKKVAAGAAGK	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-11	GSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPW	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-12	GSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYCKACLGECHFGRC	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-13	GDAIKKVAAGAAGKSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPW	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-14	GDAIKKVAAGAAGKSLLNKLCKLSGKACLGECHFGRC	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-15	GDAIKKVAAGAAGKSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYC	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-16	GDAIKKVAAGAAGKCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSG	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-17	GDAIKKVAAGAAGKCSRFRSCCKWPWKACLGECHFGRC	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-18	GDAIKKVAAGAAGKCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYC	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T
K12-19	GDAIKKVAAGAAGKACLGECHFGRCSLLNKLCKLSG	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-20	GDAIKKVAAGAAGKACLGECHFGRCCSRFRSCCKWPW	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-21	GDAIKKVAAGAAGKACLGECHFGRCKHCRARGRLGGYC	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-22	GDAIKKVAAGAAGKHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSG	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-23	GDAIKKVAAGAAGKHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPW	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T
K12-24	GDAIKKVAAGAAGKHCRARGRLGGYCKACLGECHFGRC	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-25	GCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSGKDAIKKVAAGAAGK	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-26	GCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSGKACLGECHFGRC	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-27	GCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYC	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-28	GCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAAGAAGKSLLNKLCKLSG	0.971	10.76	9.7	Ç	35.9	0.49	T
K12-29	GCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAAGAAGKACLGECHFGRC	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-30	GCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAAGAAGKHCRARGRLGGYC	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T
K12-31	GCSRFRSCCKWPWKACLGECHFGRCSLLNKLCKLSG	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-32	GCSRFRSCCKWPWKACLGECHFGRCDAIKKVAAGAAGK	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-33	GCSRFRSCCKWPWKACLGECHFGRCKHCRARGRLGGYC	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T
K12-34	GCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSG	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-35	GCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYCKDAIKKVAAGAAGK	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T

K12-36	GCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYCKACLRGECHFGRG	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T
K12-37	GACLRGECHFGRCKSLLNKLCKLSGKDAIKKVAKAAGK	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-38	GACLRGECHFGRCKSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPW	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-39	GACLRGECHFGRCKSLLNKLCKLSGKHCRARGRLGGYC	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-40	GACLRGECHFGRCKDAIKKVAKAAGKKSLLNKLCKLSG	0.974	10.4	7.8	Ç	33.33	0.43	NT
K12-41	GACLRGECHFGRCKDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPW	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-42	GACLRGECHFGRCKDAIKKVAKAAGKKHCRARGRLGGYC	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-43	GACLRGECHFGRCKCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSG	0.988	9.76	7.6	Ç	28.21	0.44	NT
K12-44	GACLRGECHFGRCKCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAKAAGK	0.996	10.3	8.7	Ç	33.33	0.42	T
K12-45	GACLRGECHFGRCKCSRFRSCCKWPWKHCRARGRLGGYC	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T
K12-46	GACLRGECHFGRCKHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSG	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-47	GACLRGECHFGRCKHCRARGRLGGYCKDAIKKVAKAAGK	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-48	GACLRGECHFGRCKHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPW	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T
K12-49	GHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSGKDAIKKVAKAAGK	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-50	GHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSGKCSRFRSCCKWPW	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-51	GHCRARGRLGGYCKSLLNKLCKLSGKACLRGECHFGRG	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-52	GHCRARGRLGGYCKDAIKKVAKAAGKKSLLNKLCKLSG	0.887	10.9	9.9	Ç	30.77	0.45	NT
K12-53	GHCRARGRLGGYCKDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPW	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T
K12-54	GHCRARGRLGGYCKDAIKKVAKAAGKACLRGECHFGRG	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-55	GHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPWKSLLNKLCKLSG	0.950	10.5	9.7	Ç	25.64	0.44	T
K12-56	GHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPWKDAIKKVAKAAGK	0.990	10.7	10.8	Ç	30.77	0.43	T
K12-57	GHCRARGRLGGYCKCSRFRSCCKWPWKACLRGECHFGRG	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T
K12-58	GHCRARGRLGGYCKACLRGECHFGRCKSLLNKLCKLSG	0.958	10	7.8	Ç	23.08	0.45	NT
K12-59	GHCRARGRLGGYCKACLRGECHFGRCKDAIKKVAKAAGK	0.987	10.4	8.9	Ç	28.21	0.45	T
K12-60	GHCRARGRLGGYCKACLRGECHFGRCKCSRFRSCCKWPW	0.898	9.72	8.7	Ç	23.08	0.42	T

Peptid kodu	X:R aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
R12-1	GSLLNKLCKLSGRDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPW	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-2	GSLLNKLCKLSGRDAIKKVAKAAGKACLRGECHFGRG	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-3	GSLLNKLCKLSGRDAIKKVAKAAGKHHCRARGRLGGYC	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-4	GSLLNKLCKLSGRCSRFRSCCKWPWRDAIKKVAKAAGK	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-5	GSLLNKLCKLSGRCSRFRSCCKWPWRACLRGECHFGRG	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-6	GSLLNKLCKLSGRCSRFRSCCKWPWRHCRARGRLGGYC	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-7	GSLLNKLCKLSGRACLRGECHFGRGDAIKKVAKAAGK	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-8	GSLLNKLCKLSGRACLRGECHFGRGCSRFRSCCKWPW	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-9	GSLLNKLCKLSGRACLRGECHFGRGHHCRARGRLGGYC	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-10	GSLLNKLCKLSGRHCRARGRLGGYCRDAIKKVAKAAGK	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-11	GSLLNKLCKLSGRHCRARGRLGGYCRCSRFRSCCKWPW	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-12	GSLLNKLCKLSGRHCRARGRLGGYCRACLRGECHFGRG	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-13	GDAIKKVAKAAGKRSLLNKLCKLSGRCSRFRSCCKWPW	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-14	GDAIKKVAKAAGKRSLLNKLCKLSGRACLRGECHFGRG	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-15	GDAIKKVAKAAGKRSLLNKLCKLSGRHCRARGRLGGYC	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-16	GDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPWRSLLNKLCKLSG	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-17	GDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPWRACLRGECHFGRG	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T
R12-18	GDAIKKVAKAAGKCSRFRSCCKWPWRHCRARGRLGGYC	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-19	GDAIKKVAKAAGKACLRGECHFGRGKSLLNKLCKLSG	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-20	GDAIKKVAKAAGKACLRGECHFGRGCSRFRSCCKWPW	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T

R12-21	GDAIKKVAKAAGK R ACLRGECHFGR C RHCRARGRLGGYC	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-22	GDAIKKVAKAAGK R HCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-23	GDAIKKVAKAAGK R HCRARGRLGGYC R CSRFRSCCKWPW	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-24	GDAIKKVAKAAGK R HCRARGRLGGYC R ACLRGECHFGR C	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-25	GCSRFRSCCKWPW R SLLNKLCKLSG R DAIKKVAKAAGK	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-26	GCSRFRSCCKWPW R SLLNKLCKLSG R ACLRGECHFGR C	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-27	GCSRFRSCCKWPW R SLLNKLCKLSG R HCRARGRLGGYC	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-28	GCSRFRSCCKWPW R DAIKKVAKAAGK R SLLNKLCKLSG	0.947	10.9	9.7	Ç	35.9	0.46	T
R12-29	GCSRFRSCCKWPW R DAIKKVAKAAGK R ACLRGECHFGR C	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T
R12-30	GCSRFRSCCKWPW R DAIKKVAKAAGK R HCRARGRLGGYC	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-31	GCSRFRSCCKWPW R ACLRGECHFGR C SLLNKLCKLSG	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-32	GCSRFRSCCKWPW R ACLRGECHFGR C DAIKKVAKAAGK	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T
R12-33	GCSRFRSCCKWPW R ACLRGECHFGR C RHCRARGRLGGYC	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T
R12-34	GCSRFRSCCKWPW R HCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-35	GCSRFRSCCKWPW R HCRARGRLGGYC R DAIKKVAKAAGK	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-36	GCSRFRSCCKWPW R HCRARGRLGGYC R ACLRGECHFGR C	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T
R12-37	GACLRGECHFGR C SLLNKLCKLSG R DAIKKVAKAAGK	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-38	GACLRGECHFGR C SLLNKLCKLSG R CSRFRSCCKWPW	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-39	GACLRGECHFGR C SLLNKLCKLSG R HCRARGRLGGYC	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-40	GACLRGECHFGR C DAIKKVAKAAGK R SLLNKLCKLSG	0.956	10.6	7.8	Ç	33.33	0.44	NT
R12-41	GACLRGECHFGR C DAIKKVAKAAGK R CSRFRSCCKWPW	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T
R12-42	GACLRGECHFGR C DAIKKVAKAAGK R HCRARGRLGGYC	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-43	GACLRGECHFGR C CSRFRSCCKWPW R SLLNKLCKLSG	0.987	9.8	7.6	Ç	28.21	0.45	T
R12-44	GACLRGECHFGR C CSRFRSCCKWPW R DAIKKVAKAAGK	0.995	10.4	8.7	Ç	33.33	0.43	T
R12-45	GACLRGECHFGR C CSRFRSCCKWPW R HCRARGRLGGYC	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T
R12-46	GACLRGECHFGR C RHCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-47	GACLRGECHFGR C RHCRARGRLGGYC R DAIKKVAKAAGK	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-48	GACLRGECHFGR C RHCRARGRLGGYC R CSRFRSCCKWPW	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T
R12-49	GHCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG R DAIKKVAKAAGK	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-50	GHCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG R CSRFRSCCKWPW	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-51	GHCRARGRLGGYC R SLLNKLCKLSG R ACLRGECHFGR C	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-52	GHCRARGRLGGYC R DAIKKVAKAAGK R SLLNKLCKLSG	0.827	11	9.9	Ç	30.77	0.47	NT
R12-53	GHCRARGRLGGYC R DAIKKVAKAAGK R CSRFRSCCKWPW	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-54	GHCRARGRLGGYC R DAIKKVAKAAGK R ACLRGECHFGR C	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-55	GHCRARGRLGGYC R CSRFRSCCKWPW R SLLNKLCKLSG	0.950	10.8	9.7	Ç	25.64	0.45	T
R12-56	GHCRARGRLGGYC R CSRFRSCCKWPW R DAIKKVAKAAGK	0.988	11.1	10.8	Ç	30.77	0.43	T
R12-57	GHCRARGRLGGYC R CSRFRSCCKWPW R ACLRGECHFGR C	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T
R12-58	GHCRARGRLGGYC R ACLRGECHFGR C SLLNKLCKLSG	0.956	10.2	7.8	Ç	23.08	0.44	NT
R12-59	GHCRARGRLGGYC R ACLRGECHFGR C DAIKKVAKAAGK	0.985	10.6	8.9	Ç	28.21	0.46	NT
R12-60	GHCRARGRLGGYC R ACLRGECHFGR C CSRFRSCCKWPW	0.991	9.8	8.7	Ç	23.08	0.46	T

Peptid kodu	X:I aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
I12-1	GSLNKLCKLSG I DAIKKVAKAAGK I CSRFRSCCKWPW	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-2	GSLNKLCKLSG I DAIKKVAKAAGK I ACLRGECHFGR C	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-3	GSLNKLCKLSG I DAIKKVAKAAGK I HCRARGRLGGYC	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-4	GSLNKLCKLSG I CSRFRSCCKWPW I DAIKKVAKAAGK	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-5	GSLNKLCKLSG I CSRFRSCCKWPW I ACLRGECHFGR C	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T

I12-6	GSLNKLCKLSGICSRFRSCCKWPWIHCRARGRLGGYC	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-7	GSLNKLCKLSGIACLRGECHFGRCDIAIKKVAKAAGK	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-8	GSLNKLCKLSGIACLRGECHFGRICSRFRSCCKWPW	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T
I12-9	GSLNKLCKLSGIACLRGECHFGRICHRARGRLGGYC	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-10	GSLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYCIDAIKKVAKAAGK	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-11	GSLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYICISFRSCCKWPW	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-12	GSLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYICIACLRGECHFGRIC	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-13	GDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSGICSRFRSCCKWPW	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-14	GDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSGIACLRGECHFGRIC	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-15	GDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYC	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-16	GDAIKKVAKAAGKICSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSG	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-17	GDAIKKVAKAAGKICSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRIC	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-18	GDAIKKVAKAAGKICSRFRSCCKWPWIIHRARGRLGGYC	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-19	GDAIKKVAKAAGKIACLRGECHFGRICISLLNKLCKLSG	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-20	GDAIKKVAKAAGKIACLRGECHFGRICSRFRSCCKWPW	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-21	GDAIKKVAKAAGKIACLRGECHFGRICHRARGRLGGYC	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T
I12-22	GDAIKKVAKAAGKIIHRARGRLGGYICISLLNKLCKLSG	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-23	GDAIKKVAKAAGKIIHRARGRLGGYICISFRSCCKWPW	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-24	GDAIKKVAKAAGKIIHRARGRLGGYICIACLRGECHFGRIC	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T
I12-25	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGIDAIKKVAKAAGK	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-26	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGIACLRGECHFGRIC	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T
I12-27	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYC	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-28	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSG	0.989	10.6	7.7	Ç	41.03	0.47	T
I12-29	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKIACLRGECHFGRIC	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-30	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKIIHRARGRLGGYC	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-31	GCSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRICISLLNKLCKLSG	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T
I12-32	GCSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRICDAIKKVAKAAGK	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-33	GCSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRICHRARGRLGGYC	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
I12-34	GCSRFRSCCKWPWIIHRARGRLGGYICISLLNKLCKLSG	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-35	GCSRFRSCCKWPWIIHRARGRLGGYICDAIKKVAKAAGK	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-36	GCSRFRSCCKWPWIIHRARGRLGGYICIACLRGECHFGRIC	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
I12-37	GACLRGECHFGRICISLLNKLCKLSGIDAIKKVAKAAGK	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-38	GACLRGECHFGRICISLLNKLCKLSGICSRFRSCCKWPW	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T
I12-39	GACLRGECHFGRICISLLNKLCKLSGIIHRARGRLGGYC	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-40	GACLRGECHFGRICDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSG	0.991	10	5.8	Ç	38.46	0.40	NT
I12-41	GACLRGECHFGRICDAIKKVAKAAGKICSRFRSCCKWPW	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-42	GACLRGECHFGRICDAIKKVAKAAGKIIHRARGRLGGYC	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T
I12-43	GACLRGECHFGRICISFRSCCKWPWISLLNKLCKLSG	0.991	8.83	5.6	N	33.33	0.44	T
I12-44	GACLRGECHFGRICISFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGK	0.997	9.75	6.7	Ç	38.46	0.40	T
I12-45	GACLRGECHFGRICISFRSCCKWPWIIHRARGRLGGYC	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
I12-46	GACLRGECHFGRICHRARGRLGGYICISLLNKLCKLSG	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-47	GACLRGECHFGRICHRARGRLGGYICDAIKKVAKAAGK	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T
I12-48	GACLRGECHFGRICHRARGRLGGYICISFRSCCKWPW	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
I12-49	GHCRARGRLGGYICISLLNKLCKLSGIDAIKKVAKAAGK	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-50	GHCRARGRLGGYICISLLNKLCKLSGICSRFRSCCKWPW	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-51	GHCRARGRLGGYICISLLNKLCKLSGIACLRGECHFGRIC	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-52	GHCRARGRLGGYICDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSG	0.971	10.7	7.9	Ç	35.9	0.44	NT
I12-53	GHCRARGRLGGYICDAIKKVAKAAGKICSRFRSCCKWPW	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-54	GHCRARGRLGGYICDAIKKVAKAAGKIACLRGECHFGRIC	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T

I12-55	GHCRARGRLGGYCICSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSG	0.975	10.1	7.7	N	30.77	0.44	T
I12-56	GHCRARGRLGGYCICSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGK	0.995	10.5	8.8	Ç	35.9	0.40	T
I12-57	GHCRARGRLGGYCICSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRG	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
I12-58	GHCRARGRLGGYCIACLRGECHFGRGISLLNKLCKLSG	0.981	9.2	5.8	Ç	28.21	0.45	NT
I12-59	GHCRARGRLGGYCIACLRGECHFGRGIDAIKKVAKAAGK	0.994	10	6.9	Ç	33.33	0.45	T
I12-60	GHCRARGRLGGYCIACLRGECHFGRGICSRFRSCCKWPW	0.995	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T

Peptid kodu	X:L aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
L12-1	GSLNKLCKLSGLDAIKKVAAGKICSRFRSCCKWPW	0.986	10.5	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-2	GSLNKLCKLSGLDAIKKVAAGKIACLRGECHFGRG	0.986	10.0	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-3	GSLNKLCKLSGLDAIKKVAAGKLHCRARGRLGGYC	0.960	10.7	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-4	GSLNKLCKLSGLICSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGK	0.986	10.5	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-5	GSLNKLCKLSGLICSRFRSCCKWPWIACLRGECHFGRG	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-6	GSLNKLCKLSGLICSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYC	0.970	10.1	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-7	GSLNKLCKLSGLIACLRGECHFGRGIDAIKKVAKAAGK	0.986	10.1	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-8	GSLNKLCKLSGLIACLRGECHFGRGICSRFRSCCKWPW	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-9	GSLNKLCKLSGLIACLRGECHFGRGLHCRARGRLGGYC	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT
L12-10	GSLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYCIDAIKKVAKAAGK	0.960	10.7	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-11	GSLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYICSRFRSCCKWPW	0.970	10.1	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-12	GSLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYICLA CLRGECHFGRG	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT
L12-13	GDAIKKVAAGKISLLNKLCKLSGLICSRFRSCCKWPW	0.986	10.5	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-14	GDAIKKVAAGKISLLNKLCKLSGLIA CLRGECHFGRG	0.986	10.1	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-15	GDAIKKVAAGKISLLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYC	0.960	10.7	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-16	GDAIKKVAAGKICSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSG	0.986	10.5	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-17	GDAIKKVAAGKICSRFRSCCKWPWIA CLRGECHFGRG	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-18	GDAIKKVAAGKICSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYC	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-19	GDAIKKVAAGKIA CLRGECHFGRGISLLNKLCKLSG	0.986	10.09	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-20	GDAIKKVAAGKIA CLRGECHFGRGICSRFRSCCKWPW	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-21	GDAIKKVAAGKIA CLRGECHFGRGLHCRARGRLGGYC	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-22	GDAIKKVAAGKLHCRARGRLGGYISLLNKLCKLSG	0.960	10.71	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-23	GDAIKKVAAGKLHCRARGRLGGYICSRFRSCCKWPW	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-24	GDAIKKVAAGKLHCRARGRLGGYICLA CLRGECHFGRG	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-25	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGLDAIKKVAAGK	0.986	10.56	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-26	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGLIA CLRGECHFGRG	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-27	GCSRFRSCCKWPWISLLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYC	0.970	10.15	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-28	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKISLLNKLCKLSG	0.986	10.56	7.7	Ç	41.03	0.51	T
L12-29	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKIA CLRGECHFGRG	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-30	GCSRFRSCCKWPWIDAIKKVAKAAGKLHCRARGRLGGYC	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-31	GCSRFRSCCKWPWIA CLRGECHFGRGISLLNKLCKLSG	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-32	GCSRFRSCCKWPWIA CLRGECHFGRGIDAIKKVAKAAGK	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-33	GCSRFRSCCKWPWIA CLRGECHFGRGLHCRARGRLGGYC	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
L12-34	GCSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYISLLNKLCKLSG	0.970	10.15	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-35	GCSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYCIDAIKKVAKAAGK	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-36	GCSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYICLA CLRGECHFGRG	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
L12-37	GACLRGECHFGRGISLLNKLCKLSGLDAIKKVAAGK	0.986	10.09	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-38	GACLRGECHFGRGISLLNKLCKLSGLICSRFRSCCKWPW	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-39	GACLRGECHFGRGISLLNKLCKLSGLHCRARGRLGGYC	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT

L12-40	GACLRGECHFGRCLDAIKKVAKAAGKLSLLNKLSCKLSG	0.986	10.09	5.8	Ç	38.46	0.44	NT
L12-41	GACLRGECHFGRCLDAIKKVAKAAGKLSRFRSCCKWPW	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-42	GACLRGECHFGRCLDAIKKVAKAAGKLHCRARGRLGGYC	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-43	GACLRGECHFGRCLSRFRSCCKWPWLSLLNKLSCKLSG	0.986	8.83	5.6	N	33.33	0.47	T
L12-44	GACLRGECHFGRCLSRFRSCCKWPWLDAIKKVAKAAGK	0.995	9.75	6.7	Ç	38.46	0.39	T
L12-45	GACLRGECHFGRCLSRFRSCCKWPWLHCRARGRLGGYC	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
L12-46	GACLRGECHFGRCLHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSG	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT
L12-47	GACLRGECHFGRCLHCRARGRLGGYCLDAIKKVAKAAGK	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-48	GACLRGECHFGRCLHCRARGRLGGYCLSRFRSCCKWPW	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
L12-49	GHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSGLDAIKKVAKAAGK	0.960	10.71	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-50	GHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSGLSRFRSCCKWPW	0.970	10.15	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-51	GHCRARGRLGGYCLSLNKLSCKLSGLACLRGECHFGRCL	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT
L12-52	GHCRARGRLGGYCLDAIKKVAKAAGKLSLLNKLSCKLSG	0.960	10.71	7.9	Ç	35.9	0.48	NT
L12-53	GHCRARGRLGGYCLDAIKKVAKAAGKLSRFRSCCKWPW	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-54	GHCRARGRLGGYCLDAIKKVAKAAGKLACLRGECHFGRCL	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-55	GHCRARGRLGGYCLSRFRSCCKWPWLSLLNKLSCKLSG	0.970	10.15	7.7	N	30.77	0.46	T
L12-56	GHCRARGRLGGYCLSRFRSCCKWPWLDAIKKVAKAAGK	0.993	10.57	8.8	Ç	35.9	0.40	T
L12-57	GHCRARGRLGGYCLSRFRSCCKWPWLACLRGECHFGRCL	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T
L12-58	GHCRARGRLGGYCLACLRGECHFGRCLSLNKLSCKLSG	0.972	9.2	5.8	Ç	28.21	0.47	NT
L12-59	GHCRARGRLGGYCLACLRGECHFGRCLDAIKKVAKAAGK	0.990	10.06	6.9	Ç	33.33	0.45	NT
L12-60	GHCRARGRLGGYCLACLRGECHFGRCLSRFRSCCKWPW	0.992	8.88	6.7	Ç	28.21	0.43	T

13 aminoasit uzunluğundaki peptid setleri

Peptid kodu	X:K aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
K13-1	GVLDKLSCKISKSCKGLLDTVKGVAKKA	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-2	GVLDKLSCKISKSCKGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-3	GVLDKLSCKISKSCKGLLDTVKGVAKKA	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-4	GVLDKLSCKISKSCKGRCSRGERYSYGCKGLLDTVKGVAKKA	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-5	GVLDKLSCKISKSCKGRCSRGERYSYGCKKVGKAIGKALPAI	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-6	GVLDKLSCKISKSCKGRCSRGERYSYGCKKASCARRSGYCAF	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-7	GVLDKLSCKISKSCKVGKAIGKALPAIKGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-8	GVLDKLSCKISKSCKVGKAIGKALPAIKGRCSRGERYSYG	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-9	GVLDKLSCKISKSCKVGKAIGKALPAIKKASCARRSGYCAF	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-10	GVLDKLSCKISKSCKASCARRSGYCAFGLLDTVKGVAKKA	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-11	GVLDKLSCKISKSCKASCARRSGYCAFGRCSRGERYSYG	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-12	GVLDKLSCKISKSCKASCARRSGYCAFKVGKAIGKALPAI	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-13	GGLLDTVKGVAKKA	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-14	GGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-15	GGLLDTVKGVAKKA	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-16	GGLLDTVKGVAKKA	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-17	GGLLDTVKGVAKKA	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-18	GGLLDTVKGVAKKA	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT
K13-19	GGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-20	GGLLDTVKGVAKKA	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-21	GGLLDTVKGVAKKA	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-22	GGLLDTVKGVAKKA	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-23	GGLLDTVKGVAKKA	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT

K13-24	GGLDVTVGVAKKA K KASCARRSGYCAF K KVGKAIGKALPAI	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-25	GGRCRSGERYSGY C K VLDKLSCKISKSC K GGLDVTVGVAKKA	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-26	GGRCRSGERYSGY C K VLDKLSCKISKSC K KVGKAIGKALPAI	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-27	GGRCRSGERYSGY C K VLDKLSCKISKSC K KASCARRSGYCAF	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-28	GGRCRSGERYSGY C K GGLDVTVGVAKKA K VLDKLSCKISKSC	0.966	10.21	7.7	Ç	23.81	0.57	NT
K13-29	GGRCRSGERYSGY C K GGLDVTVGVAKKA K KVGKAIGKALPAI	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-30	GGRCRSGERYSGY C K GGLDVTVGVAKKA K KASCARRSGYCAF	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT
K13-31	GGRCRSGERYSGY C K KVGKAIGKALPAI K VLDKLSCKISKSC	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-32	GGRCRSGERYSGY C K KVGKAIGKALPAI K GGLDVTVGVAKKA	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-33	GGRCRSGERYSGY C K KVGKAIGKALPAI K KASCARRSGYCAF	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT
K13-34	GGRCRSGERYSGY C K KASCARRSGYCAF K VLDKLSCKISKSC	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-35	GGRCRSGERYSGY C K KASCARRSGYCAF K GGLDVTVGVAKKA	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT
K13-36	GGRCRSGERYSGY C K KASCARRSGYCAF K KVGKAIGKALPAI	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT
K13-37	GKVGKAIGKALPAI K VLDKLSCKISKSC K GGLDVTVGVAKKA	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-38	GKVGKAIGKALPAI K VLDKLSCKISKSC K GGRCRSGERYSGYC	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-39	GKVGKAIGKALPAI K VLDKLSCKISKSC K KASCARRSGYCAF	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-40	GKVGKAIGKALPAI K GGLDVTVGVAKKA K VLDKLSCKISKSC	0.994	10.7	8.9	Ç	42.86	0.37	NT
K13-41	GKVGKAIGKALPAI K GGLDVTVGVAKKA K GGRCRSGERYSGYC	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-42	GKVGKAIGKALPAI K GGLDVTVGVAKKA K KASCARRSGYCAF	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-43	GKVGKAIGKALPAI K GGRCRSGERYSGY C K VLDKLSCKISKSC	0.962	10.4	8.7	Ç	28.57	0.50	NT
K13-44	GKVGKAIGKALPAI K GGRCRSGERYSGY C K GGLDVTVGVAKKA	0.967	10.7	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
K13-45	GKVGKAIGKALPAI K GGRCRSGERYSGY C K KASCARRSGYCAF	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT
K13-46	GKVGKAIGKALPAI K KASCARRSGYCAF K VLDKLSCKISKSC	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-47	GKVGKAIGKALPAI K KASCARRSGYCAF K GGLDVTVGVAKKA	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-48	GKVGKAIGKALPAI K KASCARRSGYCAF K GGRCRSGERYSGYC	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT
K13-49	GKASCARRSGYCAF K VLDKLSCKISKSC K GGLDVTVGVAKKA	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-50	GKASCARRSGYCAF K VLDKLSCKISKSC K GGRCRSGERYSGYC	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-51	GKASCARRSGYCAF K VLDKLSCKISKSC K KVGKAIGKALPAI	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-52	GKASCARRSGYCAF K GGLDVTVGVAKKA K VLDKLSCKISKSC	0.984	10.4	8.7	Ç	33.33	0.54	NT
K13-53	GKASCARRSGYCAF K GGLDVTVGVAKKA K GGRCRSGERYSGYC	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT
K13-54	GKASCARRSGYCAF K GGLDVTVGVAKKA K KVGKAIGKALPAI	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-55	GKASCARRSGYCAF K GGRCRSGERYSGY C K VLDKLSCKISKSC	0.961	10.2	17.3	Ç	19.05	0.48	NT
K13-56	GKASCARRSGYCAF K GGRCRSGERYSGY C K GGLDVTVGVAKKA	0.920	10.4	8.7	Ç	23.81	0.53	NT
K13-57	GKASCARRSGYCAF K GGRCRSGERYSGY C K KVGKAIGKALPAI	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT
K13-58	GKASCARRSGYCAF K KVGKAIGKALPAI K VLDKLSCKISKSC	0.978	10.6	9.7	Ç	38.1	0.48	NT
K13-59	GKASCARRSGYCAF K KVGKAIGKALPAI K GGLDVTVGVAKKA	0.988	10.9	9.9	Ç	42.86	0.44	NT
K13-60	GKASCARRSGYCAF K KVGKAIGKALPAI K GGRCRSGERYSGYC	0.940	10.5	9.7	Ç	28.57	0.48	NT

Peptid kodu	X:R aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
R13-1	GVLDKLSCKISKSC R GGLDVTVGVAKKA R GGRCRSGERYSGYC	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-2	GVLDKLSCKISKSC R GGLDVTVGVAKKA R KVGKAIGKALPAI	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-3	GVLDKLSCKISKSC R GGLDVTVGVAKKA R KASCARRSGYCAF	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-4	GVLDKLSCKISKSC R GGRCRSGERYSGY C R GGLDVTVGVAKKA	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-5	GVLDKLSCKISKSC R GGRCRSGERYSGY C R KVGKAIGKALPAI	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT
R13-6	GVLDKLSCKISKSC R GGRCRSGERYSGY C R KASCARRSGYCAF	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-7	GVLDKLSCKISKSC R KVGKAIGKALPAI R GGLDVTVGVAKKA	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-8	GVLDKLSCKISKSC R KVGKAIGKALPAI R GGRCRSGERYSGYC	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT

R13-9	GVLDKLSCKISKSCRKVGKAIGKALPAIRKASCARRSGYCAF	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-10	GVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAFRLGLDVTVGVAKKA	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-11	GVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAFRRGRCSGERYSGYC	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-12	GVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAFRRVGKAIGKALPAI	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-13	GGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSCRRGRCSGERYSGYC	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-14	GGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSCRKVGKAIGKALPAI	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-15	GGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAF	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-16	GGLDVTVGVAKKA RRGRCSGERYSGYC RVLDKLSCKISKSC	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-17	GGLDVTVGVAKKA RRGRCSGERYSGYC RKVGKAIGKALPAI	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-18	GGLDVTVGVAKKA RRGRCSGERYSGYC RKASCARRSGYCAF	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-19	GGLDVTVGVAKKA RKVGKAIGKALPAI RVLDKLSCKISKSC	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-20	GGLDVTVGVAKKA RKVGKAIGKALPAI RRGRCSGERYSGYC	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-21	GGLDVTVGVAKKA RKVGKAIGKALPAI RKASCARRSGYCAF	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-22	GGLDVTVGVAKKA RKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSC	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-23	GGLDVTVGVAKKA RKASCARRSGYCAF RRGRCSGERYSGYC	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-24	GGLDVTVGVAKKA RKASCARRSGYCAF RKVGKAIGKALPAI	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-25	GGRCRSGERYSGYCRVLDKLSCKISKSCRLGLDVTVGVAKKA	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-26	GGRCRSGERYSGYCRVLDKLSCKISKSCRKVGKAIGKALPAI	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT
R13-27	GGRCRSGERYSGYCRVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAF	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-28	GGRCRSGERYSGYCRGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSC	0.924	10.3	7.7	Ç	23.81	0.52	NT
R13-29	GGRCRSGERYSGYCRGLDVTVGVAKKA RKVGKAIGKALPAI	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-30	GGRCRSGERYSGYCRGLDVTVGVAKKA RKASCARRSGYCAF	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-31	GGRCRSGERYSGYCRKVGAIGKALPAI RVLDKLSCKISKSC	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT
R13-32	GGRCRSGERYSGYCRKVGAIGKALPAI RGLDVTVGVAKKA	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-33	GGRCRSGERYSGYCRKVGAIGKALPAI RKASCARRSGYCAF	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT
R13-34	GGRCRSGERYSGYCRKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSC	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-35	GGRCRSGERYSGYCRKASCARRSGYCAF RGLDVTVGVAKKA	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-36	GGRCRSGERYSGYCRKASCARRSGYCAF RKVGKAIGKALPAI	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT
R13-37	GKVGKAIGKALPAI RVLDKLSCKISKSCRLGLDVTVGVAKKA	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-38	GKVGKAIGKALPAI RVLDKLSCKISKSCRRGRCSGERYSGYC	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT
R13-39	GKVGKAIGKALPAI RVLDKLSCKISKSCRKASCARRSGYCAF	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-40	GKVGKAIGKALPAI RGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSC	0.986	10.9	8.9	Ç	42.86	0.42	NT
R13-41	GKVGKAIGKALPAI RGLDVTVGVAKKA RRGRCSGERYSGYC	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-42	GKVGKAIGKALPAI RGLDVTVGVAKKA RKASCARRSGYCAF	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-43	GKVGKAIGKALPAI RRGRCSGERYSGYC RVLDKLSCKISKSC	0.927	10.5	8.7	Ç	28.57	0.46	NT
R13-44	GKVGKAIGKALPAI RRGRCSGERYSGYC RGLDVTVGVAKKA	0.922	10.9	8.9	Ç	33.33	0.52	NT
R13-45	GKVGKAIGKALPAI RRGRCSGERYSGYC RKASCARRSGYCAF	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT
R13-46	GKVGKAIGKALPAI RKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSC	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-47	GKVGKAIGKALPAI RKASCARRSGYCAF RGLDVTVGVAKKA	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-48	GKVGKAIGKALPAI RKASCARRSGYCAF RRGRCSGERYSGYC	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT
R13-49	GKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSCRLGLDVTVGVAKKA	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-50	GKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSCRRGRCSGERYSGYC	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-51	GKASCARRSGYCAF RVLDKLSCKISKSCRKVGKAIGKALPAI	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-52	GKASCARRSGYCAF RGLDVTVGVAKKA RVLDKLSCKISKSC	0.962	10.6	8.7	Ç	33.33	0.53	NT
R13-53	GKASCARRSGYCAF RGLDVTVGVAKKA RRGRCSGERYSGYC	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-54	GKASCARRSGYCAF RGLDVTVGVAKKA RKVGKAIGKALPAI	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-55	GKASCARRSGYCAF RRGRCSGERYSGYC RVLDKLSCKISKSC	0.926	10	8.6	Ç	19.05	0.47	NT
R13-56	GKASCARRSGYCAF RRGRCSGERYSGYC RGLDVTVGVAKKA	0.835	10.5	8.7	Ç	23.81	0.48	NT
R13-57	GKASCARRSGYCAF RRGRCSGERYSGYC RKVGKAIGKALPAI	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT

R13-58	GKASCARRSGYCAFRKVGKAIGKALPAIRVLDKLSCKISKSC	0.957	10.8	9.7	Ç	38	0.47	NT
R13-59	GKASCARRSGYCAFRKVGKAIGKALPAIRGLLDTVKGVAKKA	0.972	11.2	9.9	Ç	42.86	0.48	NT
R13-60	GKASCARRSGYCAFRKVGKAIGKALPAIRGRCRSGERYSGYC	0.949	10.7	9.7	Ç	28.57	0.47	NT

Peptid kodu	X:I aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
I13-1	GVLDKLSCKISKSCIGLLDTVKGVAKKAIGRCRSGERYSGYC	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-2	GVLDKLSCKISKSCIGLLDTVKGVAKKAIKVGKAIGKALPAI	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-3	GVLDKLSCKISKSCIGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAF	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-4	GVLDKLSCKISKSCIGRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKA	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-5	GVLDKLSCKISKSCIGRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAI	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-6	GVLDKLSCKISKSCIGRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAF	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-7	GVLDKLSCKISKSCIKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-8	GVLDKLSCKISKSCIKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYC	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-9	GVLDKLSCKISKSCIKVGKAIGKALPAIIGASCARRSGYCAF	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-10	GVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKA	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-11	GVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYC	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-12	GVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAI	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-13	GGLLDTVKGVAKKAIVLDKLSCKISKSCIGRCRSGERYSGYC	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-14	GGLLDTVKGVAKKAIVLDKLSCKISKSCIKVGKAIGKALPAI	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-15	GGLLDTVKGVAKKAIVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAF	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-16	GGLLDTVKGVAKKAIGRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSC	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-17	GGLLDTVKGVAKKAIGRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAI	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-18	GGLLDTVKGVAKKAIGRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAF	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-19	GGLLDTVKGVAKKAIKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSC	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-20	GGLLDTVKGVAKKAIKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYC	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-21	GGLLDTVKGVAKKAIKVGKAIGKALPAIIGASCARRSGYCAF	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT
I13-22	GGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSC	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-23	GGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYC	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-24	GGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAI	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT
I13-25	GRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIGLLDTVKGVAKKA	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-26	GRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIKVGKAIGKALPAI	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-27	GRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAF	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-28	GRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKAIVLDKLSCKISKSC	0.980	10.7	8.5	Ç	28.57	0.55	NT
I13-29	GRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKAIKVGKAIGKALPAI	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-30	GRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAF	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-31	GRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSC	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-32	GRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKA	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-33	GRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAIIGASCARRSGYCAF	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT
I13-34	GRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSC	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-35	GRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKA	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-36	GRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAI	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT
I13-37	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCIGLLDTVKGVAKKA	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-38	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCIGRCRSGERYSGYC	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-39	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCIKASCARRSGYCAF	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-40	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKAIVLDKLSCKISKSC	0.994	10.5	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
I13-41	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKAIGRCRSGERYSGYC	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-42	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKAIKASCARRSGYCAF	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT

I13-43	GKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSC	0.978	10	6.7	Ç	33.33	0.45	NT
I13-44	GKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKA	0.977	10.5	6.9	Ç	38.1	0.48	NT
I13-45	GKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAF	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT
I13-46	GKVGKAIGKALPAIIKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSC	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-47	GKVGKAIGKALPAIIKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKA	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT
I13-48	GKVGKAIGKALPAIIKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYC	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT
I13-49	GKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSCIIIGLLDTVKGVAKKA	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-50	GKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSCIIIGRCRSGERYSGYC	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-51	GKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAI	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-52	GKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKAIIIVLDKLSCKISKSC	0.989	10.1	6.7	Ç	38.1	0.53	NT
I13-53	GKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKAIIIGRCRSGERYSGYC	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-54	GKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKAIIKVGKAIGKALPAI	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT
I13-55	GKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSC	0.985	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
I13-56	GKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKA	0.962	10	6.7	Ç	28.57	0.50	NT
I13-57	GKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAI	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT
I13-58	GKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAIIIVLDKLSCKISKSC	0.984	10.4	7.7	Ç	42.86	0.48	NT
I13-59	GKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAIIIGLLDTVKGVAKKA	0.990	10.8	7.9	Ç	47.62	0.46	NT
I13-60	GKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYC	0.985	10.3	7.7	Ç	33.33	0.46	NT

Peptid kodu	X:L aa için	AA	pI	N	Ç	H	HA	T
L13-1	GVLDKLSCKISKSCIIIGLLDTVKGVAKKAIIIGRCRSGERYSGYC	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-2	GVLDKLSCKISKSCIIIGLLDTVKGVAKKAIIKVGKAIGKALPAI	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-3	GVLDKLSCKISKSCIIIGLLDTVKGVAKKAIIKASCARRSGYCAF	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-4	GVLDKLSCKISKSCIIIGRCRSGERYSGYCIIGLLDTVKGVAKKA	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-5	GVLDKLSCKISKSCIIIGRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAI	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-6	GVLDKLSCKISKSCIIIGRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAF	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
L13-7	GVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAIIIGLLDTVKGVAKKA	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-8	GVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYC	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-9	GVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAIIKASCARRSGYCAF	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-10	GVLDKLSCKISKSCIIKASCARRSGYCAFIIGLLDTVKGVAKKA	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-11	GVLDKLSCKISKSCIIKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYC	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
L13-12	GVLDKLSCKISKSCIIKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAI	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-13	GGLLDTVKGVAKKAIIIVLDKLSCKISKSCIIIGRCRSGERYSGYC	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-14	GGLLDTVKGVAKKAIIIVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAI	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-15	GGLLDTVKGVAKKAIIIVLDKLSCKISKSCIIKASCARRSGYCAF	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-16	GGLLDTVKGVAKKAIIIGRCRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSC	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-17	GGLLDTVKGVAKKAIIIGRCRSGERYSGYCIKVGKAIGKALPAI	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-18	GGLLDTVKGVAKKAIIIGRCRSGERYSGYCIKASCARRSGYCAF	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-19	GGLLDTVKGVAKKAIIKVGKAIGKALPAIIIVLDKLSCKISKSC	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-20	GGLLDTVKGVAKKAIIKVGKAIGKALPAIIIGRCRSGERYSGYC	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-21	GGLLDTVKGVAKKAIIKVGKAIGKALPAIIKASCARRSGYCAF	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-22	GGLLDTVKGVAKKAIIKASCARRSGYCAFIIVLDKLSCKISKSC	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-23	GGLLDTVKGVAKKAIIKASCARRSGYCAFIIGRCRSGERYSGYC	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-24	GGLLDTVKGVAKKAIIKASCARRSGYCAFIKVGKAIGKALPAI	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-25	GGRCSRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIIIGLLDTVKGVAKKA	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-26	GGRCSRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIIKVGKAIGKALPAI	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-27	GGRCSRSGERYSGYCIIVLDKLSCKISKSCIIKASCARRSGYCAF	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT

L13-28	GGRCRSGERYSGYCLGLLDTVKGVAKKALVLDKLSCKISKSC	0.964	9.82	5.7	Ç	28.57	0.59	NT
L13-29	GGRCRSGERYSGYCLGLLDTVKGVAKKALKVGKAIGKALPAI	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-30	GGRCRSGERYSGYCLGLLDTVKGVAKKALKASCARRSGYCAF	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-31	GGRCRSGERYSGYCLKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSC	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-32	GGRCRSGERYSGYCLKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKA	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-33	GGRCRSGERYSGYCLKVGKAIGKALPAIKASCARRSGYCAF	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT
L13-34	GGRCRSGERYSGYCLKASCARRSGYCAFIVLDKLSCKISKSC	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
L13-35	GGRCRSGERYSGYCLKASCARRSGYCAFILGLLDTVKGVAKKA	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-36	GGRCRSGERYSGYCLKASCARRSGYCAFIVKVGKAIGKALPAI	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT
L13-37	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCILGLLDTVKGVAKKA	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-38	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCILGRCRSGERYSGYC	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-39	GKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSCILKASCARRSGYCAF	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-40	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKALVLDKLSCKISKSC	0.993	10.6	6.9	Ç	47.62	0.39	NT
L13-41	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKALGRCRSGERYSGYC	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-42	GKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKALKASCARRSGYCAF	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-43	GKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYCLVLDKLSCKISKSC	0.967	10.1	6.7	Ç	33.33	0.52	NT
L13-44	GKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYCLGLLDTVKGVAKKA	0.961	10.5	6.9	Ç	38.1	0.60	NT
L13-45	GKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYCLKASCARRSGYCAF	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT
L13-46	GKVGKAIGKALPAIKASCARRSGYCAFIVLDKLSCKISKSC	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-47	GKVGKAIGKALPAIKASCARRSGYCAFILGLLDTVKGVAKKA	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-48	GKVGKAIGKALPAIKASCARRSGYCAFILGRCRSGERYSGYC	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT
L13-49	GKASCARRSGYCAFIVLDKLSCKISKSCILGLLDTVKGVAKKA	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-50	GKASCARRSGYCAFIVLDKLSCKISKSCILGRCRSGERYSGYC	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
L13-51	GKASCARRSGYCAFIVLDKLSCKISKSCILKVGKAIGKALPAI	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-52	GKASCARRSGYCAFILGLLDTVKGVAKKALVLDKLSCKISKSC	0.983	10.1	6.9	Ç	38.1	0.55	NT
L13-53	GKASCARRSGYCAFILGLLDTVKGVAKKALGRCRSGERYSGYC	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-54	GKASCARRSGYCAFILGLLDTVKGVAKKALKVGKAIGKALPAI	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-55	GKASCARRSGYCAFILGRCRSGERYSGYCLVLDKLSCKISKSC	0.971	9.47	6.6	Ç	23.81	0.47	NT
L13-56	GKASCARRSGYCAFILGRCRSGERYSGYCLGLLDTVKGVAKKA	0.923	10.1	6.7	Ç	28.57	0.53	NT
L13-57	GKASCARRSGYCAFILGRCRSGERYSGYCLKVGKAIGKALPAI	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT
L13-58	GKASCARRSGYCAFILKVGKAIGKALPAIIVLDKLSCKISKSC	0.980	10.4	7.7	Ç	42.86	0.47	NT
L13-59	GKASCARRSGYCAFILKVGKAIGKALPAIIGLLDTVKGVAKKA	0.986	10.8	7.9	Ç	47.62	0.49	NT
L13-60	GKASCARRSGYCAFILKVGKAIGKALPAIIGRCRSGERYSGYC	0.973	10.3	7.7	Ç	33.33	0.49	NT

AA: Antimikrobiyal Aktivite, pI: İzoelektrik nokta, N: Net yük, H: Hidrofobiklik, HA: Hemolitik Aktivite, T: Toksidite (NT: Toksik Değil),

Ç: Çözünürlük (N: Çözünürlüğü düşük)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Şeyma AYDIN
Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, İzmir	2014
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, Kayseri	2011
Lise	Kırıkkale Anadolu Lisesi, Kırıkkale	2006

YABANCI DİL

İngilizce

ARAŞTIRMA ALANLARI

Gıda Mikrobiyolojisi, Gıda Biyoteknolojisi, Gıda Teknolojisi

YAYINLAR

1. Cyclic Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Importance. 7th International Congress on Applied Biological Science, Türkiye, 1-2 Kasım 2022, ss. 23.
2. Prolince Zengin Antimikrobiyal Peptidler ve Kullanım Alanları. 8. Uluslararası Erciyes Bilimsel Araştırmalar Kongresi, Kayseri, Türkiye, 1-2 Ekim 2022, ss. 157-169.
3. AYDIN, Ş., & KESMEN, Z. (2020). Kendiliğinden Montajlı Peptidler ve Kullanım Alanları. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(3), 361-385.