

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KRABROLİNİN *P.PASTORIS*'TE ÜRETİMİ
VE
OPTİMİZASYONU**

EVİRİM ÇELEBİ

Balıkesir, Ağustos-2009

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRABROLİNİN *P. PASTORIS*'TE ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EVİRİM ÇELEBİ

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 20.08.2009

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yard.Doç.Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ-Danışman)

Balıkesir, Ağustos-2009

Özet

KRABROLİNİN *P. PASTORIS*'TE ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Evrin ÇELEBİ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR)

Balıkesir, 2009

Bu çalışmada özellikle son yıllarda önem kazanan, hemen hemen tüm canlılarda bulunan, bağışıklık sistemi için son derece önemli rol oynayan ve AMP (antimikrobiyal peptit) olarak isimlendirilen bir grup peptitten krabrolin üzerinde çalışılmış, bu peptidin çalkalamalı maya (*Pichia pastoris*) kültüründe üretiminin optimizasyonu hedeflenmiş ve aktivitenin en üst düzeye ulaştığı koşulların saptanması amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle kültür çalışmalarında kritik öneme sahip parametreler saptanmış (sıcaklık, pH gibi) ve tasarlanan her bir deney serisine teker teker uygulanmıştır.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen 6 deney serisinde pH'nın tek başına gözle görülür bir aktivite artışına neden olmadığı, özellikle EDTA ve BSA ile birlikte dikkate alındığında aktivitenin artışında etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlarca emin olunması için bazı deneylerin, bazı ek kontroller ile beraber tekrar edilmesine gerek vardır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Antimikrobiyal peptitler, Krabrolin, *P. pastoris*

Abstract

OPTIMIZATION OF CRABROLIN PRODUCTION IN *P. PASTORIS*

Evrim CELEBI

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Master Thesis / Supervisor: Assistant Professor Ekrem DÜNDAR)

Balikesir, Turkey, 2009

In this study, crabrolin, an anti-microbial peptide (AMP) that is found in all organisms, has crucial roles in immune system, and has gained importance recently, was studied with respect to yield optimisation in shake-cultures. For this purpose, crucial parameters of culture growth (such as pH and temperature) were first determined and then applied to all experiments designed.

Based on results of the six experiment series, it was concluded that pH alone was not important parameter for an increase of activity, but EDTA and BSA were particularly effective when arranged together with pH. To confirm these results, some experiments need to be repeated along with some additional controls.

KEY WORDS: Antimicrobial peptides, Crabrolin, *P. pastoris*

İçindekiler

Özet.....	i
Abstract.....	iii
İçindekiler.....	iv
Şekiller Listesi.....	vi
Tablolar Listesi.....	viii
Önsöz.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Antimikrobiyal Peptitler.....	3
1.1.1 Antimikrobiyal Peptitlerin Tarihçesi.....	8
1.1.2 AMP' lerin yapıları.....	10
1.1.3 Mekanizma.....	11
1.1.3.1 Fıçı Tahtası Modeli.....	14
1.1.3.2 Kilim Modeli.....	16
1.1.4 Tedavi Potansiyeli.....	18
1.1.5 Seçicilik.....	19
1.1.6 Krabrolin.....	21
1.2 <i>Pichia pastoris</i>	22
1.2.1 <i>P. pastoris</i> metanol mekanizması.....	23
1.2.2 Alkol Oksidaz.....	24
1.2.3 Vektör.....	25
1.2.4 Heterolog Proteinlerin Sentezi.....	27
1.3 Çalışmanın Amacı.....	27
2. MATERYAL VE METOT.....	28
2.1 Medya.....	28
2.2 Tampon ve Solüsyonlar.....	28
2.3 Petriler.....	30
2.4 Çalkalanmalı kültürlerde protein ekspresyonu.....	30
2.5 Peptidin saflaştırılması.....	31
2.6 Krabrolinin aktivitesi ve tahlili.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1 Süreç dizaynı ve parametrelerin optimizasyonu.....	34

3.2 Krabrolinin Ekspresyonu ve saflaştırılması için optimum deneysel koşulların araştırılması	37
3.3 pH Optimizasyonu.....	41
3.4 Tampon Optimizasyonu.....	43
3.5 Proteazların İnhibe Edilmesi İçin Spesifik Olmayan İnhibitörlerin Kullanılması.....	46
3.6 Proteazların inhibisyonu için BSA'nın Denenmesi.....	48
3.7 Havalandırmanın Arttırılması için Alüminyum Folyo Kullanılması.....	53
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
5. KAYNAKLAR.....	67

Şekiller Listesi

Şekil 1.1 Antimikrobiyal katyonik peptid	3
Şekil 1.2 AMP'lerin moleküler yapıları.....	10
Şekil 1.3 Antimikrobiyal peptidlerin membranla etkileşimi.	13
Şekil 1.4 Fıçı Tahtası Modeli.	15
Şekil 1.5 Kilim modeli.	17
Şekil 1.6 <i>Vespa crabro</i>	21
Şekil 1.7 <i>P. Pastoris</i> 'de metanol mekanması.	23
Şekil 1.8 <i>P. pastoris</i> AOX lokusunun karşılaştırmalı restriksiyon haritası	24
Şekil 3.1 Krabrolinin ekspresyonunun ve saflaştırılmasının deneysel dizaynı ve optimizasyon sürecinin safhalarının genel açıklaması.	35
Şekil 3.2 Rekombinant krabrolin ekspresyon kültüründe <i>P. pastoris</i> için büyüme eğrisi.....	38
Şekil 3.3 Deney 1' e ait bir örnek.	39
Şekil 3.4 Deney 1 için krabrolin tayinini gösteren başka bir örnek.	40
Şekil 3.5 Farklı pH koşulları altında büyüme kültüründeki <i>P. pastoris</i> 'in büyüme grafiği. .42	
Şekil 3.6 Deney 2 için krabrolin aktivitesinin belirlenmesi.	43
Şekil 3.7 Farklı pH koşulları altındaki büyüme kültüründeki <i>P. pastoris</i> için büyüme eğrisi45	
Şekil 3.8 Deney 3 için krabrolin aktivitesinin belirlenmesi.	46
Şekil 3.9 Medya katkısı olarak EDTA'nın kullanıldığı farklı pH koşulları altında büyüme kültüründeki <i>P. pastoris</i> için büyüme grafiği.	47
Şekil 3.10 Medya katkısı olarak 10mM EDTA'nın kullanıldığı ve pH 4, 5 ve 6'da büyüyen <i>P. pastoris</i> kültürü için büyüme grafiği.....	49
Şekil 3.11 Medya katkısı olarak %1 BSA katılmış ve pH 4 ve 5 de yetiştirilen <i>P. Pastoris</i> kültürünün büyüme grafiği.	50
Şekil 3.12 pH4 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları.	50
Şekil 3.13 pH 5 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları.	51
Şekil 3.14 pH 6 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları.	51
Şekil 3.15 %1 BSA'lı kültürde büyütülmüş <i>P. pastoris</i> 'den elde edilen krabrolin aktivitesinin tayini ve deney 5'e ait bazı sonuçlar.	52
Şekil 3.16 10 mM EDTA'lı pH 4,5 ve 6 da büyütülmüş <i>P. pastoris</i> kültürleri için büyüme eğrileri.	54
Şekil 3.17 Alüminyum folyo kullanılmış erlenlerde kültüre alınan <i>P. pastoris</i> 'in büyüme eğrisi.	55
Şekil 3.18 Deney 6'dan pH 4 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları.	56

Şekil 3.19 Deney 6'dan pH 5 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları.	57
Şekil 3.20 Deney 6'dan pH6 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları.....	58
Şekil 3.21 Deney 6'dan seçilen 2 petrinin krabrolin aktivitesi.	59
Şekil 3.22 Deney 6'dan seçilen bazı örneklerin krabrolin aktivitesi.	60
Şekil 4.1 <i>P. pastoris</i> (x-33)'de rekombinant krabrolin ekspresyonunun optimizasyonu için deneysel dizaynın şematik sunumu.....	63
Şekil 4.2 Sürecin kısıtlamaları ve dizayn ile bağlantılı perspektifler ile genel laboratuvar prosedürleri.....	66

Tablolar Listesi

Tablo 1.1 Yapılarına göre bazı antimikrobiyal peptitler	6
Tablo 1.2 Bazı antibakteriyel peptitler	7
Tablo 1.3 Bazı antifungal peptitleri ve işlevleri	8
Tablo 2.1 Kullanılan metanolün zaman aralıkları ve miktarı	31

Önsöz

Bu çalışma öğrenci hareketliliği değişim programıyla Aalborg Üniversitesi (Danimarka) Biyoteknoloji Bölümünde yürütülmüş ve tamamlanmıştır. Bu çalışmanın yapılmasında emeği geçen başta sayın danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a, yurt dışında ki çalışmam süresince beni çalışmaya kabul eden sayın Doç. Dr. Niels T. ERIKSEN ve Doç. Dr. EvaMaria PETTERSEN'e bu çalışma için yurtdışına gitmeme vesile olan Balıkesir Üniversitesi Erasmus Koordinatörü sayın Yılmaz ARI ve birim çalışanlarına, gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında benden yardımlarını hiç esirgemeyen arkadaşlarım Murat SAYIN, Kemal TAŞTEMÜR, Sevilay BARAK, Cihan BARAK, Ahmet YILDIZ, Alp ALPER, Şakir AKGÜN, Öznur SUAKAR, Görkem DENİZ, Meltem AYDIN, Nurten ZAMUR, Ayşegül ŞAHİN, Nurcan DEDEOĞLU'na, bu tezin gerek yazımında gerekse tartışılmasında büyük gayret gösteren ve beni hep destekleyen sevgili arkadaşım Aennes ABBAS'a, ayrıca her türlü desteğini benden esirgemeyen sevgili abim Ferit KARANFİL'e ve tabii ki bu zamana kadar benden maddi ve manevi yardımlarını hiç esirgememiş ve hep arkamda olan aileme TEŞEKKÜR ederim.

Balıkesir, Ağustos 2009

Evrin ÇELEBİ

1. GİRİŞ

Yaklaşık çeyrek asır öncesine kadar bilim adamları bakterilerle olan savaşı kazanacaklarını iddia etmekteydiler. Fakat şu anda elde edilen veriler antibiyotik öncesindeki duruma geri döndüğümüzü göstermektedir.

1940'lı yıllarda penisilin gibi ilk ticari antibiyotiklerin gelişmesiyle beraber değişik şekillerde direnç gösteren bakterilerin sayısında artış başlamıştır. Yapılan çalışmalar bu yeni mekanizma faaliyetlerinin neden olduğu problemi çözmede çok başarılı olmadı ve insanlardaki aşırı ve uygun olmayan kullanım çoklu direnç artışlarına sebep oldu [1].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre *Staphylococcus aureus* ırklarının %95'inin penisiline direnç göstermekte olduğu ve *enterococci*, *pneumococci* *Pseudomonas*, *Serratii* [2]. ve *Mycobacterium tuberculosis*'in (Beijing ırkı) dünyanın değişik bölgelerinde %90'lara varan oranlarda çoklu ilaç direnci gösterdiği bilinmektedir. Buna ek olarak bakteri direncinde, Amerika ve Japonya'da %70 oranında hastanede alınan yangıların sorumlu olduğu bilinmektedir [3].

Bilinçsizce kullanılan antibiyotiklerin neden olduğu bakterilerdeki direnç artışı yüzünden, son yıllarda etkisini kaybeden antibiyotiklerin yerini, antimikrobiyal ilaçlara bırakmaya başlamıştır [1]. Antimikrobiyal peptitler (AMP) yeni ilaçların olası bileşikleridir. AMP'ler memelilerde, omurgalılarda, böceklerde ve bitkilerde bulunan ilk savunma hattının etkili ve de eski elemanlarıdır. Bu elemanlar yaklaşık bir milyon yıldır bulunmakta ve bakteriler, antibiyotikler gibi onlara karşı oldukça etkili bir mekanizma geliştirememektedir. AMP'ler sıra dışı aktivite ve seçicilik gösterdiği için bu durum onları yeni ilaçlar için bir umut kaynağı yapmaktadır [4].

AMP'ler ile geleneksel antibiyotiklerin arasındaki büyük fark, antibiyotiklerin, mikropların içindeki çok özel olan hedeflere göre davranması ve bu yüzden bakterinin morfolojisinin korunup bu saldırı esnasında direnç mekanizması gerçekleştirilebilir olmasıdır. Oysa AMP'ler hedef hücrenin membranını bozar ya da parçalar ve içine sızar ve böylece hücre için aşılması zor olan bir hasara yol açar. Bu yüzden bakterilerin AMP'lere karşı direnç kazanmalarının antibiyotiklere göre daha zor olduğuna inanılmaktadır. AMP'lerin geleneksel antibiyotiklere karşı bir avantajı da gelecekte kokteyl olarak faydalanılabilecek tedavi seçeneklerinin geliştirilebilme ihtimalidir [1, 3-8].

Çoğu AMP aynı zamanda gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere, mantarlara, mayalara, hatta belli zarflı virüs ve protozoalara karşı bile aktivite sergilemektedir. Diğer AMP'lerin daha sınırlı bir spektrumda da olsa antibiyotiklere göre daha hızlı şekilde bakterileri öldürdüğü gösterilmiştir. AMP'ler ayrıca yara iyileştirme gibi farklı özelliklere de sahiptir [1, 3, 4, 6, 7]. Gelecekte AMP'leri antibiyotik olarak kullanabilmemiz ve antimikrobiyal aktivitelerini optimize edebilmemiz için de membran geçirgenliğinin anlaşılması çok önemlidir [9, 10].

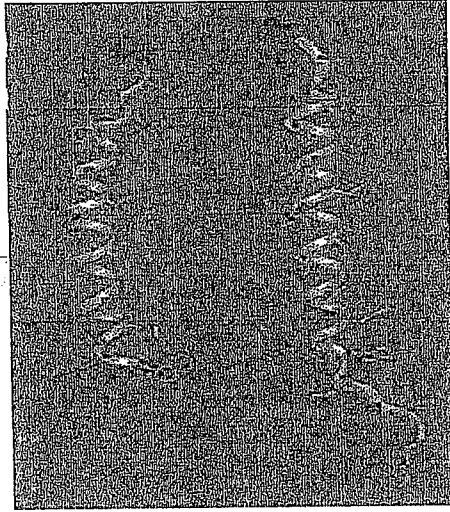
AMP'lerin antibiyotik aktivitelerinin araştırılması için rekombinant ekspresyonu da yapılabilmektedir. Bununla beraber AMP'ler bakteri hücreleri için de toksiktir ve bu nedenle *E.coli*'de direkt olarak üretimi olmaz. İşte bu yüzden antimikrobiyal proteinlerin üretimi için bu çalışmada da kullanılmış olan *Pichia pastoris* gibi ökaryotik sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Ökaryotik sistemlerin çoğu bakteriyel ekspresyon sistemlerine nazaran çalışılması ve karakteristik özellikleri bakımından özellikle de kısa AMP'lerin sentezi çoğu proteinlerle kıyaslandığında daha karmaşıktır. Bununla beraber kimyasal sentez daha pahalıdır ve geniş üretimler için uygun değildir [11]. Bu çalışmanın yapılması sebebi, *P. pastoris* kullanılarak çalkalamalı kültürde uygun ekspresyon sisteminin optimizasyonunun başarılmasına katkıda bulunmaktır. Bu

çalışmada daha önceki çalışmalarda krabrolin genine sahip pPICZ α -A ekspresyon vektörü ile transforme olmuş *Pichia pastoris* kullanılarak krabrolin üretilmiş ve bu üretimin optimizasyonu araştırılmıştır.

1.1 Antimikrobiyal Peptitler

Tüm mikroorganizmalar var oluşlarından beri diğer mikroorganizmalara karşı hassasiyet göstermektedirler. Bunun nedeni mikroorganizmaların salgıladığı toksin maddelere ve bünyelerinde bulunan bazı bileşiklere konukçunun tepki vermesinden kaynaklanmaktadır. Bunun yanında konukçu vücudunda onlar için gerekli gıdaların ortamda hazır olarak bulunması, mikroorganizmaların yerleşip rahatlıkla çoğalmalarını mümkün kılmaktadır.



Şekil 1. 1 Antimikrobiyal katyonik peptid [12].

Ayrıca çok hücreli canlılar da istilacıları tanıyıp onları engellemeye yönelik savunma sistemlerine sahiptirler. Bu savunma sistemleri, mikroorganizmaları tanıyıp onları sistemden yok etme veya etkisiz hale getirme şeklinde işler [13].

Özellikle çok hücreli organizmaların savunma sistemlerinde etkili rol oynayan makrofaj, sitokinler, proteinler, kemokinler gibi bazı bileşenler vardır. Bunlardan antimikrobiyal peptitler olarak da isimlendirilen ve gram pozitif, gram-negatif bakterilerle mantar hatta bazı virüsleri de öldürme yeteneği bulunan bazı peptitlerin varlığı son yarım asır içerisinde keşfedilmiş ve bu peptitler ile ilgili sayısız çalışmalar yapılmıştır. Bugün bu peptitlerin bağışıklık sistemindeki rolleri ve etki mekanizmaları göz önüne serilmektedir. Bu peptitlerin savunma sisteminde rol alan ilk bağışıklık elemanları olmalarının yanında savunma direncine ve tepkisine göre kendilerini adapte edebilmeleri ve diğer savunma elemanlarıyla ve mikroorganizmalarla etkileşime girebilmeleri de diğer önemli özelliklerindedir [14].

Savunma peptitleri olarak da adlandırılan antimikrobiyal peptitler evrimsel olarak korunmuş immun sistemin vazgeçilmez elemanlarıdır ve hemen hemen tüm canlı sınıflarında keşfedilmiştir.

Bu peptitlerin potansiyel bir iyileştirici özelliği kanıtlanmış, geniş spektrumlu bir antibiyotik gibi olan, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere, mycobacteria türlerine (*Mycobacterium tuberculosis*), bazı zarflı virüslere, mantarlara ve hatta bazı kanserli hücrelere de etki ettiği bilinmektedir [15].

Antimikrobiyal peptitler, gen olarak polipeptit şeklinde kodlanan antimikrobiyal maddeler olarak tanımlanmıştır. Genelde 100 bç'den daha azdırlar. Hastalığın erken dönemlerinde aktif olup yabancı organizmalara karşı savunmada yüksek yapılı organizmaların en büyük silahlarından biridirler.

AMP'lerin sekonder yapılarının birbirlerinden büyük farklılık gösterdiğine inanılmaktadır. Birçok çalışmada AMP'lerin hücre membran lipitleri ve fonksiyonlarını bozarak bakteri hücrelerini öldürdükleri gözlenmiştir. Bu sayededir ki direnç mekanizmasının bu peptitlere karşı geliştirilmesi kolay olmamıştır.

Bu yapı farklılıklarına rağmen temel olarak yabancı mikroorganizmalara karşı gösterilen mekanizma benzerlik göstermektedir. Diğer bir ifadeyle mekanizmalar belirli olan yapıya bağlı olarak gelişmemektedir.

AMP'lerin yaygın yapısal özellikleri arasında suda çözünebilen moleküller olmaları, amfifilik özellikde olmaları ve deterjanlar gibi yağlara bağlanma affinitesi göstermeleri sayılabilir.

Antimikrobiyal peptitler deri gibi nemli yüzeylerde (burun, soluk borusu, ağız vb) ve sindirim ile ilgili bölgelerde bulunmakta ve bu bölgelerde konağın yabancı istilalara karşı savunması görevini üstlenmektedirler [1, 6, 12].

Çeşitli organizmalarda 800'den fazla AMP tanımlanmıştır [4]. Bunlardan bazıları yapılarına göre Tablo 1.1'de, hedef hücre ve etki şekillerine göre de Tablo 1.2'de gösterilmiştir. Bunlar oldukça değişken yapı ve dizi bakımından da oldukça değişkenlik gösterirler ki çok yakın akraba türlerde bile nadiren benzerlik gösterirler [1, 6, 16].

Tablo 1. i Yapılarına göre bazı antimikrobiyal peptitler.

Yapı	Kaynak	Bulunduğu bölge
α-helikal		
sekropin A	İpek böceği	E, BH, KS
Magainin 2	Kurbaga	E
Peksiganan	Sentetik	
Dermaseptin I	Kurbaga	E
LL-37	İnsan	E, BH
Büforin II	Omurgalı	E
Tek disülfid bağ		
Bakteresin I	İnek	BH
Thanatin	Böcek	BH
Breyinin II	Rana kurbagaları	E
Ranaleksin	Rana kurbagaları	E
Ranacurin I	Rana kurbagaları	E
Esculentin I	Rana kurbagaları	E
İki disülfid bağ		
Tachyplesin	At nalı yengeci	BH
Androctonin	Akrçp	KS
Protegrin I	Domuz	BH
3 disülfid bağ		
α -defensin (HNRP3)	İnsan	BH, E
β -defensin (TAP)	İnek	E, BH
μ -defensin	Maymun	BH
Defensin (sapacinA)	Böcek	E, BH, H
Thionin (crambin)	Bilgi	E
4 disülfid bağ		
Defensin	Tırp thionları	E
Drosomycin	Meyve sineği	KS
Heptidin	İnsan	Liver
Lineer		
Bac 5	İnek	BH
PR-39	Domuz	BH
Indolisidin	İnek	BH
Apidacein	Bakarısı	KS
Pyrrhocorin	Böcek	KS
Histatin 5	İnsan	Tükürük

* BS, Kan hücresi; KS, Kan sıvısı; E, Epitel dokuv[17].

Tablo 1. 2 Bazı antibakteriyel peptitler [18].

Peptit	Yapı	Kaynak	Hedef	Referans
Magainin	α -heliks	Kurbaga	HSV, HIV	Hücresel hedef [19],[20]
Sekropin	α -heliks	Böcek	Junin virus, HSV, HIV	Viral gen-ekspresyonunun bastırılması, Hücresel hedef, Viral gen ekspresyonunun
Mellitin	α -heliks	Arı	HSV, Junin virus	Hücresel hedef, Hücresel hedef [20], [21], [22]
LL-37	α -heliks	İnsan	HSV	Zayıf viral inaktivasyon [22]
Brevinin-1	α -heliks	Kurbaga	HSV	Viral inaktivasyon [22]
Θ -Defensin	Sıkık β -levhası	Primat-İnsan	HIV, HSV	gp 120'nin glikosilasyonu, gB ye bağlanma ve viral parçaların bloklanması [23],[24]
Defensin	β -levhası	İnsan, Tavşan	HSV, IAV, HCMV, VSC, HIV, Adenovirus	HSV membran/glikoprotein ile etkileşim, Viral partiküllerin inaktivasyonu, Viral partiküllerin inaktivasyonu, Viral partiküllerin inaktivasyonu, Hücresel hedef, Bilinmiyor [24], [25], [26], [27], [28], [29]
Dermaseptin	β -levhası	Kurbaga	HIV, HSV	Viral membranın bozulması, Virus-hücre arayüzeyinde aktivite [30],[31]
Tachyplesin	β -levhası	At nali yengeci	HIV, HSV, VSV, IAV	Virus-hücre kaynaşması, Viral inaktivasyon, Viral kalıf, Viral kalıf [22],[32],[33]
Protegrin	β -levhası	Domuz, İnsan	HIV, HSV	Bilinmiyor, Viral inaktivasyon [22],[34]
poliphemusin	β -levhası	At nali yengeci	HIV	Gp 120 ve CD4 e bağlanma [35],[36]
Laktoferrin	β -kavım	Sığır, İnsan	HCMV, HIV, HSV, Papillovirus	Virus-hücre arayüzeyinde aktivite, Bilinmiyor, Heparin sulfat engellemesi, Virus-hücre arayüzeyinde aktivite [37],[38],[39], [40]
Indosilidin	Uzamsı	Sığır	HIV, HSV	İntegraz enziminin inhibisyonu, Viral membrane/glikoproteinlerin hedef alınması [20],[41],[42]

Tablo 1. 3 Bazı antifungal peptitleri ve işlevleri.

Melittin	α -heliks	Arı	<i>C.albicans</i>	Geçirgenlik	[43]
Magainin	α -heliks	Kurbağa	<i>C.albicans</i>	Lizis	[44],[45]
Sekropin	α -heliks	Böcek	<i>Aspergillus furnigatus</i>	Membranda kolesterol/ergesterol bağları	[46],[47]
PMAP-23	α -heliks	Domuz	<i>C.albicans</i>	Geçirgenlik	[42],[48]
Brevinin-1	α -heliks	Kurbağa	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Lizis	[49]
Defensin	β -levhası	Memeli	<i>C.albicans</i>	Membran geçirgenliği ve/veya lizis	[50],[51]
Pn-AMP 1	β -levhası	Bitki	<i>C.albicans</i> , <i>S.cerevisiae</i>	Aktin filamentlerin depolimerasyonu	[52],[53]
Histadin	Histidine zengin	İnsan, primat	<i>C.albicans</i>	Mitokondrinin hasarı	[54],[55]
Tenesin3	Uzamış kıvrım	böcek	<i>C.albicans</i> , <i>A.furnigatus</i>	Sitoplazmik bölgede bilinmeyen hedef	[56],[57]
İndolisidin	uzamış	sığır	<i>T.beigelii</i>	Hücre membranının bozulması	[58]

1.1.1 Antimikrobiyal Peptitlerin Tarihçesi

Antimikrobiyal peptitler birbirinden bağımsız iki çalışmayla keşfedilmiştir. Bunlardan ilki, bakterileri öldüren fagositik memeli hücrelerinin mekanizması üzerine ikincisi ise, hayatta kalmak için bakterileri öldüren organizmaların mekanizmaları üzerinedir. 1870'lerin sonlarında bilim adamları konakçıya hasar vermeksizin mikropları öldürebilecek biyolojik bir ajan araştırdılar [59]. 1883'de

Metchnikov mikropların fagositozunda beyaz kan hücrelerinin ilgisinin olduğunu tanımladı ve bu hücrelerin farklılıklarını da belirtti [59, 60]. Takip eden yıllarda Petterson antimikrobiyal aktiviteye sahip insan anfiyezidnen bir irinin sulu özünü buldu. Pettersen ve arkadaşları antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşikleri tanımlamayı amaçlamaktaydılar. Bununla beraber zamanın teknik ve koşulları bu antibiyotik ajanların araştırılmasında etkili değildi. Yaklaşık 20 yıl sonra Fleming'in ilk lizozimi keşfi [59] ve ardından da penisilinin bulunması yeni bir çağın başlangıcını oluşturmaktaydı. Antimikrobiyal maddelerin araştırılması için penisilinin keşfinden 10 yıl sonra Hotchkiss ve Dubos [61] *Bacillus brevis*'den gramisidin ve tirosidini izole etmeyi başardılar fakat yalnızca gramisidin çok sınırlı şekilde kullanılabilir çünkü ökaryotik hücreler için toksik etkisi vardı. Bu gelişmelerin takibinde birçok canlıdan da antimikrobiyal aktiviteye sahip moleküller keşfedilmiştir. Mesela arının zehirinden mellitin izole edilmiş fakat bunun gibi sonradan keşfedilen birçok molekülün çok daha fazla toksik olduğu ve hemolitik etkisinin olduğu keşfedilmiştir [60]

1969'da Zeya ve Spitznagel tavşan çekirdek lökositlerinden pozitif yüklerinden dolayı bakteri membran geçirgenliğini bozan ve hemolitik olmayan 5 tane katyonik antimikrobiyal protein izole ettiler [62].

1970'li yıllarda bitki'den elde edilmiş ilk antimikrobiyal peptid olan tiyonin izole edildi [63].

1978'de Weis ve Elsbach [64] kronik myeloid lösemi hastalarının beyaz kan hücrelerinin granül proteinlerinden 'bakteri geçirgenliğini indükleyen faktör' adı verilen bir proteini izole ettiler. Bu protein bakterilere karşı olan aktivitesinin yanı sıra endotoksinleri nötrleme gibi özelliklere de sahipti.

1980'lerin başlarında bir seri çalışmadan sonra güve pupasından elde edilen ve böceklerden izole edilmiş ilk antimikrobiyal peptid olan sekropin keşfedildi [65]. İlk zamanlarda bu peptitlerin sadece böceklerde bulunduğu düşünülmekteydi fakat daha sonra diğer hayvan sınıflarından da benzer özelliklere sahip peptitler keşfedildi [13].

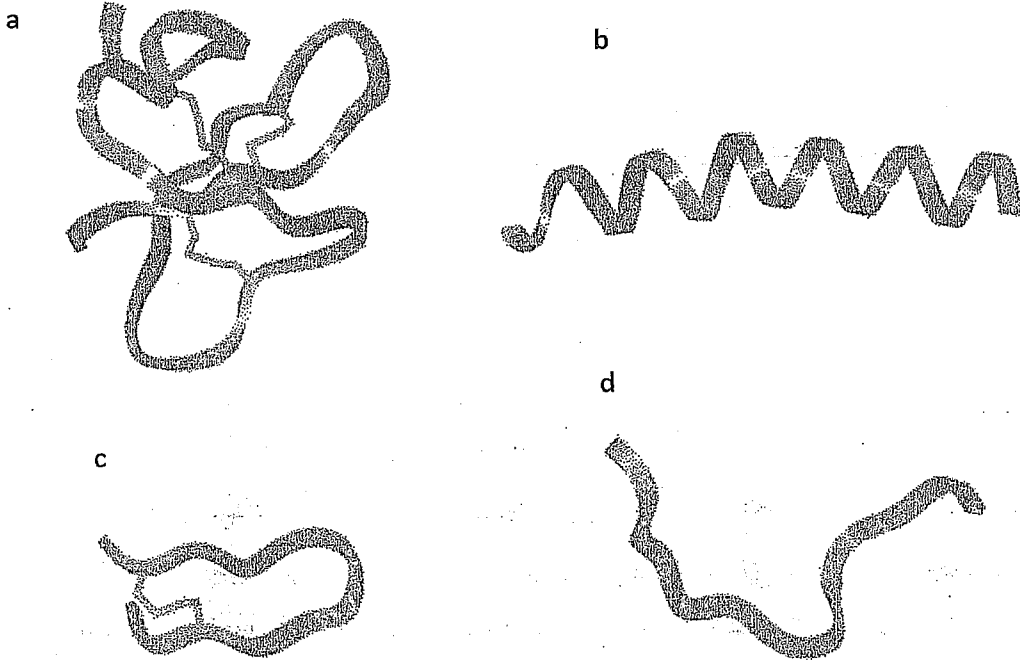
1995 yılında ilk defa AMP'lerin bağışıklık sistemindeki rolleri ve işlevleri hakkında geniş çaplı bir makale yayınlandı [66].

1.1.2 AMP'lerin yapıları

AMP'ler oldukça büyük çeşitlilik gösterdiklerinden mikroplara karşı göstermiş oldukları saldırı yöntemlerine göre gruplandırılırlar. Bununla beraber bazı AMP'ler sekonder yapılarına göre de gruplandırılabilirler. Genel olarak 4 grupta incelenirler. (Şekil 1.2):

2 yada 3 disülfid bağlarıyla stabilize olmuş β -levha

- Amfipatik Alfa heliks
- Tekli disülfid bağıyla olan ilmek yapısı
- Uzamış molekül yapısı [1, 16, 67, 68].



Şekil 1. 2 AMP'lerin moleküler yapıları a) 2 ya da 3 disülfid bağı ile bağlı olan β levhası, b) α heliks c) tek disülfid bağıyla olan ilmek ve d) uzamış molekül yapısı [6].

Disülfid bağlarıyla dengede olan levha sınıfı paralel olmayan bir yapıyla karakterize edilir. Helikal peptitler helikal konformasyonlarıyla karakterize edilirler ki sıklıkla molekülün merkezinde ufak bir kıvrım ihtiva ederler. Amfipatikler; bu peptitlerin helikal konformasyonları mikrop membranları ile olan etkileşimiyle uyarılırlar. Uzamış olan peptit sınıfı helikal ve levha şekilde olanların aksine içerdikleri yüksek miktardaki prolin ve glisinden dolayı sekonder yapıdan yoksundurlar. Bu peptitler membran lipitleriyle olan Van der Waals ve hidrojen bağlarıyla son yapılarını kazanırlar. İlmek şeklinde olanlar ise disülfid ve amid veya isopeptit bağları ihtiva eden bağlarla ayırt edilirler.

AMP'ler farklı yapısal özellikleri ile sınıflandırılmalarının yanı sıra mikroplara karşı göstermiş oldukları mekanizmalar ile de kategorize edilmektedirler. AMP'lerin direk olarak membranla etkileşen bir davranış mekanizması olduğu düşünülmektedir. Doğal L peptitlerinin yaptığı kadar AMP'lerin D enansiyomerlerinin de aynı biyolojik aktiviteleri ve membrandan geçebilme özelliği sergilediği bulunmuştur. Genelde AMP'lerin membranlarla etkileşimi membran geçirgenliğini artırır. Bununla beraber sadece sınırlı sayıdaki mekanizmalar antimikrobiyal peptitlerin hareketlerinin mekanizması hakkında bilgi verir.[4]

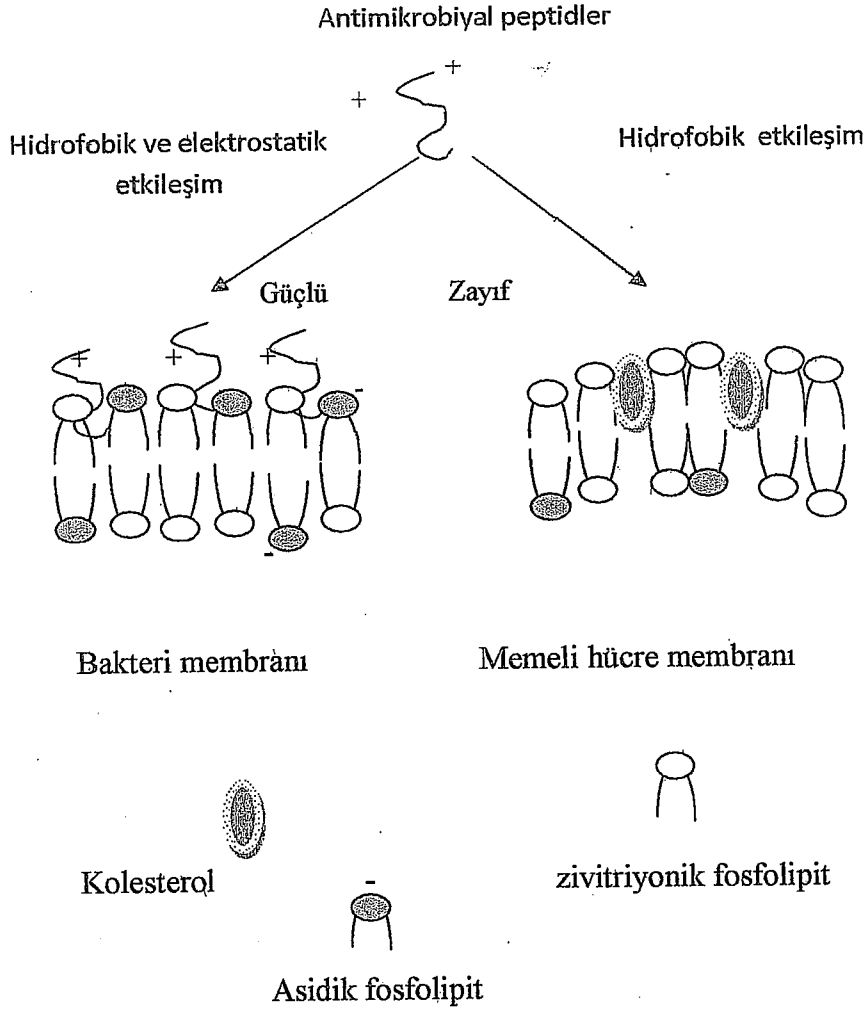
1.1.3 Mekanizma

Antimikrobiyal peptitler pozitif yükleri sayesinde herhangi bir aracıya ihtiyaç duymadan bakterilerin dış membran yüzeyiyle etkileşime girebilmektedirler. Bunun sebebi gram-negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkarit tabakasının, gram pozitif bakterilerde ise lipoteikoik asidin negatif yüklerinden dolayı pozitif yüklü olan katyonik peptitlerin kolayca bağlanabilmeleridir. Bu durum memeli hücreleri için bir avantaj da oluşturmaktadır zira memeli hücrelerinin membran yapısı ve muhtevası bakteri hücrelerinden farklılık göstermekte bu yüzden antimikrobiyal peptitin bağlanabilmesi için gerekli negatif yük olmadığından memeli

hücreleriyle antimikrobiyal (katyonik) peptitler arasında etkileşim gerçekleşmemektedir.

Memeli hücreleriyle bakteri hücresi arasındaki diğer bir önemli fark ise memeli hücrelerinde bulunan kolesterolün varlığıdır.

Tüm bu farklılıklar sayesinde memeli hücrelerine karşı herhangi bir yan etkisi bulunmaksızın seçici olarak bakterilerin konakçı içerisinde öldürülmesi sağlanabilmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Antimikrobiyal peptitlerin membranla etkileşimi. (Bakteri membranları asidik fosfolipite sahip olduklarından pozitif yüklü peptidler bu membranlarla etkileşime girerler. Diğer taraftan asidik fosfolipit, memeli hücrelerinin iç kısmında bulunur. Dış kısımda ağırlıklı olarak zitivriyonik fosfolipitin bulunması ve antimikrobiyal peptidlerin affinitesinin düşük oluşu aynı zamanda kolesterol varlığında memeli hücrelerinin bu peptidler tarafından oluşabilecek membran etkileşimlerini bir anlamda engellemiş yada azaltmış olması membran yapısının antimikrobiyal aktivite üzerine olan etkisini açıklamaktadır. Bu şekil referans [17, 69]den modifiye edilmiştir.)

Bunun yanında yapılan bazı çalışmalar antimikrobiyal peptitlerin aktivitelerinin, her zaman dış membran yapısına bağlı olmadığını göstermiştir [8].

AMP'lerin hemen hemen hepsi katyoniktir ki bunun anlamı lizin ve arjininin fazlalığından dolayı net bir pozitif yüke sahip olmalarıdır. Bu nedenle AMP'lerin büyük bir çoğunluğuna KAMP (katyonik antimikrobiyal peptitler) adı verilmiştir. KAMP'lar aynı zamanda amfipatik (yani suda çözünen hidrofilik ve çözünmeyen hidrofofik grupların her ikisini de bir arada bulunduran) moleküllerdir. Bu

özellikleri sayesinde membranın hidrofobik bölgesiyle bütünleşebilir ve dış membran boyunca yer değiştirebilir. Bu sebeple arjinin ve lizin KAMP'ın hedef membranıyla olan etkileşimine olumlu katkısı vardır. KAMP'ların LPS'lere (Lipopolisakkarit) bağlanmasının dış membrandaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerli (divalent) katyonların yer değiştirmesiyle olduğu düşünülmektedir. Bu divalent katyonların LPS'lerin negatif yüklerine bağlanmasından dolayı dış hücre membranının stabilizesi için elzem önem taşımaktadır. Bu yüzden divalent katyonların yer değiştirmesinden dolayı KAMP'lar ile LPS etkileşimleri nedeniyle, LPS katmanları üzerinde bozulmalar meydana geldiğine inanılmaktadır. Bu bozulma KAMP'ların dış membran boyunca "kendiliğinden aktive olan madde alımı" (self-promoted uptake) adı verilen bir mekanizmayla hareket etmelerini sağlar [1, 4-7, 12, 70].

Bu mekanizmaya göre, aminoglikozidler ve polimiksin B gibi katyonik bileşiklerin membran stabilizetisini bozmaları ve bu nedenle membrana girebilmelerine olanak sağlamaktadır [71].

Sitoplazmik membran da dış hücre membranı gibi negatif yüklüdür. KAMP'ların membran üzerindeki etkisi de bu negatif yükten dolayıdır. KAMP'ların sitoplazmik membranla olan etkileşimleri 2 sınıfa ayrılır. Bunlar membranı bozarak etki eden ve membranı bozmadan etki eden mekanizmalardır. KAMP'ların membranı bozmaları ise sitoplazmik membranın şiddetli bir şekilde karıştırılmasıdır ki bu mekanizmayı açıklayan iki model geliştirilmiştir; fiçı tahtası modeli ve kilim modelidir [5, 12, 72, 73]. Aşağıda bu iki mekanizma açıklanmıştır.

1.1.3.1 Fiçı Tahtası Modeli

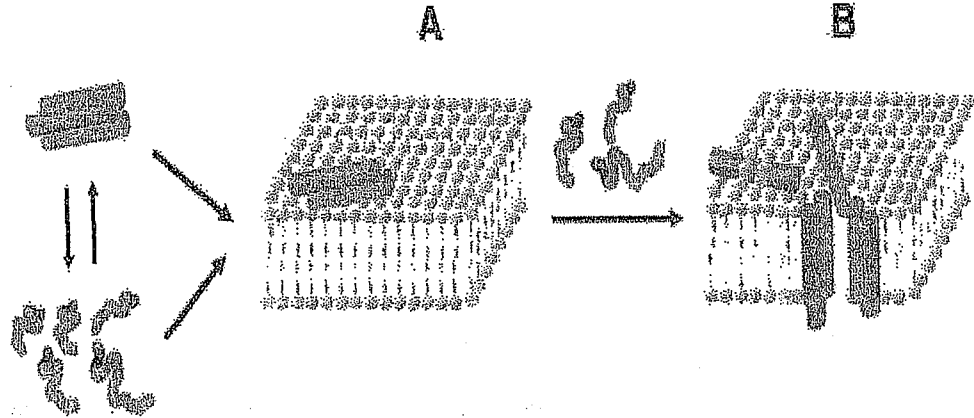
Bu model antimikrobiyal mekanizmayı açıklamak için öne sürülmüş olan ilk modeldir. Bu modele, peptitlerin membran içerisindeki görünimleri fiçiyi andırdığı için bu ad verilmiştir. Bu modelde peptitler membrana dikey şekilde konumlanırlar. Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi (Şekil 1.4) AMP'ler bu konumlamayla polar

kısımları transmembran por içine, hidrofobik kısımları da lipit membran yüzeyine dönük şekildedirler. Bu modelde peptitlerin hidrofilik yüzleri çözücü ile, hidrofobik yüzleri ise membranın lipit kısmı ile temas eder ve sonuçta membranda kanallar ya da porlar meydana gelir. Bu yolla mikrobiyal membran içerisinde kanal formunu kazanırlar. Oluşan bu porlar membran bileşenlerinin azalması ve membran potansiyelinin bozulmasına neden olur [10]. Peptitlerin membrana etki edebilmeleri için membranın negatif olarak yüklenmesi gerekmektedir.

Bu modele göre peptitlerin bazı özelliklerinin olması gerekmektedir bunlardan bazıları şunlardır;

- Hidrofobik yapıya sahip olmalı,
- α helikal bir peptid için minimum 22 aa. β -levha için 8 aa. uzunluğunda olmalı,
- membranın yapısını bozmak için en az 2-3 peptidin bir araya gelmesi yani belirli bir konsantrasyonda olması gerekmektedir.

Tüm bu açıklamaların yanında konuyla ilgili çalışmalar göstermektedir ki, bu model sadece selektif olmayan katyonik peptitlerin membranla olan etkileşimlerini açıklamaktadır. Bu yüzden selektif olan katyonik peptitlerin etkileşimlerini açıklamak için kilim modeli geliştirilmiştir [8, 10, 12, 73, 74].



Şekil 1.4 Fıçı Tahtası Modeli. Şekilde fıçı tahtası modeline göre membran geçirgenliğinin bozulması gösterilmiştir. Peptitler önce monomer ya da oligomerik olarak membran yüzeyine tutunurlar (A), daha sonra membranın lipit çekirdeğine girmesi ve ek olarak diğer monomerlerin bu bölgeye toplanması (B). Burada koyu renk hidrofobik yüzeyi, açık renk ise, hidrofilik yüzeyi temsil etmektedir. Not: Bu şekil yazarın izniyle konulmuştur [10]

1.1.3.2 Kilim Modeli

Kilim modelinde AMP'ler membran içersine girmezler onun yerine sitoplazmik membrana paralel olarak dizilirler. Bundan dolayı membran üzerinde kilim gibi bir yapı kazanırlar. AMP'lerin bu uyumu membranın iki katmanlı yapısının dengesinde bölgesel bozulmalara ve membranda geniş çatlaklara neden olur. Şekil 1.5'de gösterildiği gibi bu çatlakların sitoplazmik bileşenlerin dışarıya akmasına neden olması, membran potansiyelinin çökmesine ve son olarak membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur.

Kilim modelinde fiçi tahtası modelinin aksine pozitif yüklü peptitler membranın hidrofobik kısmının içine girmezler, onun yerine hidrofilik kısımları birbirine bakacak şekilde bir topluluk halinde bulunurlar. Bunun yanında kilim modelinde fiçi modelinin aksine membrana nüfuz eden peptitlerin belirli bir yapıda olması şart değildir, çeşitli yapı ve büyüklükte olabilirler. Bu modelin geliştirilmesinin amacı 'neden AMP'ler antimikrobiyaldir ve yapı, dizi ve uzunluklarıyla ilişkili olmadan aktivite gösterebilmektedirler?' sorusunun cevabını vermektir [8, 10, 12, 73-76].

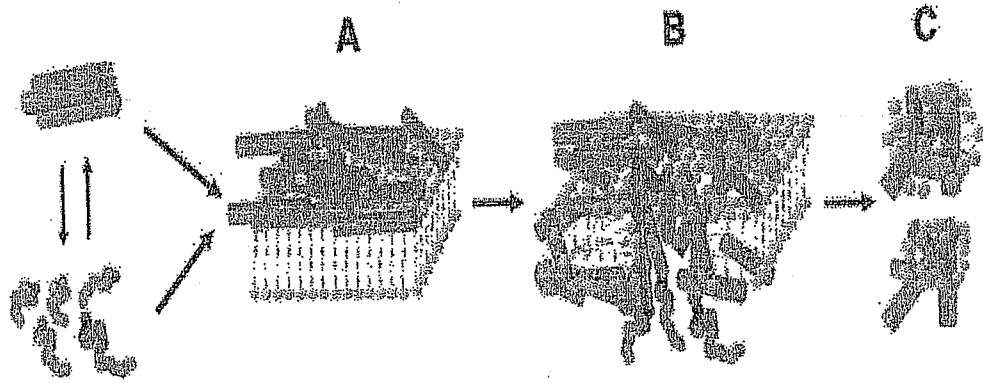
Bu modelde monomerik ya da oligomerik AMP'lerin negatif olan membran yüzeyine bağlanması için amfipatik yapıda olması gerekli değildir. Membran ile olan ilk etkileşim elektrostatik çekim kuvvetiyle gerçekleşir, fakat bu modelde aktif olan AMP'ler pozitif yüklü olmalıdırlar. Bundan sonraki adımda AMP'ler hidrofobik yüzeyleri membranın hidrofobik yüzeyine bakacak şekilde yeniden yön değiştiriler. AMP'ler belirli yoğunluğa ulaştıktan sonra membran yapısının bozulmasıyla membrana nüfuz ederler. Membranın çöküşünden önceki adımda bu modelde aktif olan AMP'lerin membranda geçici olmayan boşluk formunu oluşturmaları gerekir. Bu boşluklarda, AMP'ler yalnızca fosfolipit gruplarıyla temas ederler [8, 10, 12, 73-76].

Ortaya sürülen ve yukarıda bahsedilen bu iki antimikrobiyal aktivite mekanizmasının yanında çoğu peptidin daha geniş polipeptitlerle birlikte çalıştıkları hatta bazılarının antibiyotiklerin etkisini arttırdıklarına dair kanıtlar vardır [77].

Dış membranı parçalayabilen lizozim gibi bir polipeptit AMP'lerin membran içine girişine neden olabilmektedir. Bunun yanında son zamanlardaki çalışmalara göre AMP'ler (KAMP'lar) DNA, RNA, veya hücrel proteinler gibi iç kısımda bulunan hedeflerle etkileşmek için bakteriyel fosfolipitlerle çapraz bağlar yapabilirler [1, 5, 6, 12, 16].

Hareket mekanizmalarına rağmen AMP'lerin en ilginç özelliklerinden biri memeli hücreleri için toksik olmazlarken mikropları öldürmeleri ve hücre türlerini ayırt etme yetenekleridir. Tabi ki bu seçiciliğin temelindeki özellik membranların ayırt edilmesidir [73].

AMP'lerin mekanizmaları bulunmuş olsa da, farklı membran tiplerinden etkileniyor olabilirler. Bu yüzden AMP'ler farklı membranlar üzerinden farklı mekanizmalara adapte olabilirler [4].



Şekil 1.5 Kilim modeli. Bu şekil membrana nüfus için önerilen kilim modelini göstermektedir. Peptitler membrana monomer veya oligömer olarak ulaştıktan sonra hidrofobik yüzeyleri membrana, ve hidrofilik yüzeyleri çözücüye bakacak şekilde membran yüzeyine bağlanırlar (A). Peptit monomerleri eşik yoğunluğa ulaştığı zaman membrana nüfuz ederler ve geçiş boşluğu (por) oluştururlar (B), bu aynı zamanda membran bütünlüğünü bozan bir süreçtir (C). Koyu renk, hidrofobik yüzey; açık renk, hidrofilik yüzeyi göstermektedir.

1.1.4 Tedavi Potansiyeli

Doğal AMP'lerin birçoğu anti-enfeksiyon terapötikleri olarak geliştirilip analiz edilmiştir. Mukoza iltihabı, kistik fibrozis, akciğer iltihapları, tropikal deri enfeksiyonları ve ayak ülseri [18] gibi çok değişik hastalıkları içine alan kullanım alanları vardır [78].

AMP'lerin aktivite spektrumu, yalnızca bakterileri öldürme yeteneklerinin yanı sıra klasik antibiyotik direncinden etkilenmemeleri ve endotoksinleri etkisizleştirmeleri ile antibiyotiklerden ayrılırlar. Burada bahsettiğimiz endotoksinlerden etkilenmemeleri ve bakteri direncini kırabilmeleri ile beraber aktivite gösterdikleri canlıların sayısı ve kullanım alanlarının genişliği AMP'lerin keşfini ve geliştirilmesini önemli derecede arttırmıştır.

Bununla beraber araştırmalar farklı yaklaşımlarla tasarlanmış ve yürütülmüştür. AMP'ler antibiyotiklere kıyasla daha büyük moleküler ağırlığa sahiptirler. Bu yüzden dışarıda üretilme maliyetlerini azaltmak için rekombinant olarak üretilmişler ve bunun için değişik sistemler geliştirilmiştir. Şu ana kadar ufak ölçekli üretimleri gerçekleştirilmişse de geniş çaplı üretim endüstriyel olarak henüz başarılamamıştır [79-81].

Yapılan araştırmalara ilâveten memeli hücrelerinde toksik etkisi olduğu belirlenmiş olan AMP'lerin de araştırılması gerekmektedir. Hâlbuki diğer AMP'lerin gösterdiği toksik etkileri çok azdır [77].

Buna ilaveten her ne kadar AMP'lere karşı mikropların genel olarak bir direnç göstermediği görülmüşse de bazı türlerin doğal olarak ya da sonradan kazandıkları direnç mekanizmaları da mevcuttur [82].

AMP'ler için yapılan araştırmalar ışığında söylenebilir ki, AMP'ler enfeksiyonlara karşı tüm hayvanlar için bir savunma mekanizması vazifesi görmekte ve çoğu organizmanın doğal bağışıklık sisteminin kritik elemanları olarak görev yapmaktadır.

1.1.5 Seçicilik

Bakteri hücrelerini ökaryotik hücrelere göre nispeten AMP'lere karşı daha hassas yapan üç neden vardır. Bunlardan en önemlisi ökaryotik ve bakteri hücre membranı arasındaki lipit kompozisyon farkıdır. İkinci faktör, KAMP'ların seçiciliğine izin veren bakterilerdeki kolesterolün varlığıdır. Üçüncü faktör ise AMP aktivitesine katkıda bulunan negatif transmembran potansiyelidir. AMP'lerin (Katyonik peptitlerin) aktivitelerini açıklayan uygun tanımın yapılabilmesi için ökaryot ve prokaryotlara ait farklı membranların tanımlanması ve açıklanması gerekmektedir [4].

Tüm biyomembranların temel bileşeni fosfolipit tabakasıdır. Bu tabakalar amfipatik bir yapıya sahiptirler yani diğer bir ifadeyle hem hidrofobik hem de hidrofillik bir yapıya sahiptir. Bununla beraber ökaryot ve prokaryot membranları da kendi aralarında farklılık göstermektedirler. Bakteri biyomembranları dominant olarak membranı negatif yapan fosfatidilgliserol (FG), kardiolipin (KL) ve fosfatidilserin (FS) dir. Bunun karşılığında ökaryotlar fosfatidiletanolamin (FE), fosfatidilkolin (PK) ve sfingomiyelin gibi membranı nötr yapan zwitteriyonik fosfolipitlerce zengindir [76].

KAMP'ların seçici olmalarındaki en önemli faktör lipit bileşimindeki farklılıklardır. Buna ek olarak gram negatiflerin dış membran yüzeylerinde LPS gram- pozitif bakterilerin dış yüzeyinde asidik polisakaritler bulunmaktadır. Bu

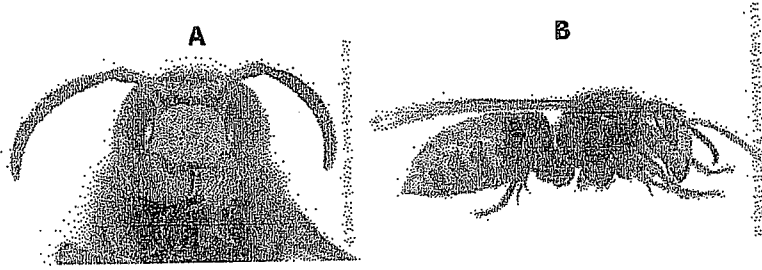
yapılar bakteri membranını negatif yapar. Bakteri membranı negatif olarak yüklü olduğu için KAMP'lar tercihen bu membranlara bağlanırlar. Bununla beraber ökaryotik hücre membranlarının dış membran kısımları AMP ile membran birleşimini inhibe eder. İşte bu sebeplerden dolayı fosfolipitlerdeki farklılıklardan kaynaklanan farklı elektrostatik yükler, AMP'nin seçici olmasına izin verir. Membran yüklerinden dolayı AMP'lerin seçici olması bazı çalışmalarla teyit edilmiştir. Yaygın kanı, daha fazla pozitif yüke sahip olan katyonik peptitler seçiciyken net bir pozitif yüke sahip olmayan AMP'ler seçici değildir [1, 5, 8, 10, 74].

Nötür olmasının yanında ökaryotik hücre membranı kolesterol de ihtiva eder ve bu da prokaryotik hücrelere göre lipid membranının daha esnek olmasına neden olur. Gerçekte hücre membranının daha sert olması onu daha kararsız yapar. Bu yüzden kolesterolün varlığı KAMP'larda prokaryotlara doğru bir seçiciliğe neden olur [4].

Buna ek olarak kolesterolün varlığı AMP'ler için memeli ve fungal hücrelerde de bir ayırma sebep olur [76]. Prokaryotik hücreler ökaryotik hücrelerden hücre içi ve hücreler arası sitoplazmik membran yaprakçıkları arasındaki elektriksel ayrımlarla ayırt edilirler. Bu elektrokimyasal gradient, trans membran potansiyel ($\Delta\psi$) olarak da isimlendirilir. Memelilerin membran potansiyeli $\Delta\psi$ -90 dan -110 mV'a kadar değişirken, bakteri hücre membranında bu oran -130 mV ile -150 mV arasındadır. Böyle bir potansiyelin varlığı mikrop membran yüzeyinde KAMP'ların yoğunlaşmasına neden olan elektroforetik bir kemiosmotik potansiyel anlamına gelir. $\Delta\psi$ daki bu farklılıklar AMP'lerin bakteri hücrelerine meyilli olmasındaki etkenlerden biridir [76]. Bu membran gradiyentindeki farklılıklardan doğan seçicilik, "Neden bazı KAMP'lar insan hücrelerine nazaran daha yüksek membran potansiyeline sahip kanser hücrelerini tercih ediyor." sorusunu da açıklayabilmektedir. Bununla beraber kanser hücreleri normal insan hücreleri ile kıyaslandığında farklı membran bileşimine sahiptir. Hücrelerdeki bu varyasyonlar ve membran potansiyeli KAMP'ların kanser hücrelerine karşı olan seçiciliğinin bir nedeni olabilir [76, 83]. Fosfolipit katmanının düzenine bağlı seçiciliğe rağmen asimetrik yapıların da KAMP'ların seçiciliğinde önemli rolleri vardır [76].

1.1.6 Krabrolin

Krabrolin Avrupa eşek arısı *Vespa crabro*'nun (şekil 1.6) zehrinden elde edilmiş 13 aa. uzunluğunda katyonik bir peptittir. Krabrolin antimikrobiyal aktivitesinin yanında yine aynı türden elde edilen Mastroparan C den daha az bir hemolitik aktiviteye sahiptir. Hemolitik aktivitesinin daha düşük oluşu krabrolini dirençli bakterilere karşı enfeksiyon tedavileri için Mastroparan C'ye göre daha uygun bir aday yapmaktadır. Krabrolinin dizisi $\text{NH}_2\text{-LATVIKRLILPLF}$ şeklindedir ve krabrolinin sahip olduğu 13 amino asidin 10'u hidrofobik olmasından dolayı hidrofobisitesi yüksektir. Krabrolin lizin ve arjinin fazlalığından dolayı katyonik ve net +2 yüke sahiptir [20]. Krabrolinin trifluroetanol içeren solüsyonlarda, belli bir sırası olmayan amfipatik α - helikal konformasyonu kazandığı bilinmektedir [84].



Şekil 1.6 *Vespa crabro*. [85]. A) Önden ve B) lateralden görüntüsü.

Bununla beraber α - helikal konformasyonun krabrolinin antimikrobiyal aktivitesi için bir ön koşul olmadığı düşünülmektedir. Fakat net yüke sahip olması ile hidrofobisitesinin varlığının önemli olduğu, lizin miktarındaki artışın MİK (minimal inhibisyon konsantrasyonu) değerini arttırırken hemolitik aktivitede bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir [22]. Buna rağmen henüz krabrolinin antimikrobiyal mekanizması tam olarak çözülememiştir [86].

Krabrolinin fosfolipaz A_2 aktivitesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Fosfolipaz A_2 , Ca^{+2} bağlı membrandaki yağ asitlerini hidrolizleyen bir enzimdir [84, 86].

Krishnakumari ve Nagaraj'ın çalışmalarında, 15 µg/ml ile gram negatif *E. coli* bakterilere karşı, sırasıyla 300 µg/ml ve 75 µg/ml ile Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*'e karşı gösterdikleri minimal inhibisyon konsantrasyon (MIK) değerleriyle krabrolinin, gram pozitif bakterilere karşı gram negatif bakterilere göre daha aktif olduklarını belirlemişlerdir. Bununla beraber bu peptit gram-negatif olan *Pseudomonas putida* ya karşı inaktivite olmuş, *E.coli*'ye karşı MIK değerlerinde hemolitik aktivitesi çok düşük çıkmıştır. Gerçek de krabrolinin, *E coli* ye karşı MIK değerlerinde az bir hemolitik aktivite göstermesi onun dirençli bakterilere yapılan enfeksiyon tedavilerine karşı uygun bir aday olmasını mümkün kılmaktadır [84, 86].

1.2 *Pichia pastoris*

Karbon kaynağı olarak metanolü kullanan belli türler yaklaşık yarım asır önce Koichi Ogata (Cregg J., yayınlanmamış) tarafından keşfedilmiştir. 1970 lerde Philips Petroleum adlı bir şirket yüksek hücre yoğunluğunda devam kültürlerinde metanol ile *P. pastoris*'i büyütmek için kültür medyaları ve metotlar geliştirdiler. Bununla beraber bu zamanlarda hayvan besinlerinin büyük kaynağı olan soya fasulyelerinin fiyatları büyük bir artış göstermiş yağ krizi de patlak vermiş ve bu yüzden metanol fiyatları büyük bir artış göstermiştir.

1980'lerin başlarında *P. Pastoris*'le rekombinant protein ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. Bunu AOX promotörünün suşların ve vektörlerin geliştirilmesi takip etmiş ve sonrasında "Intvitrogen" ismiyle dünya çapında satışına başlanmıştır.

Pichia pastoris karbon kaynağı ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilme kapasitesine sahip metilotrofik mayalardır. 'Bu zamana kadar *P. pastoris* birçok rekombinant ürünün sentezinde kullanılmış, mesela insan endostatin den örümceğin ağının ihtiva ettiği proteine kadar yüzlerce proteinin ekspresyonu yapılmıştır ve son zamanlarda çok başarı kazanılmış ve çok popüler olmuştur. *P. pastoris*'in tercihinde bunların haricinde bazı faktörler de etkili olmuştur. Bunların neler olduğu aşağıda bahsedilmiştir.

Pichia pastoris'in rekombinant proteinlerin üretiminde seçilmesinde bazı avantajlar göz önüne alınmaktadır [87]. Bunlar arasında ;

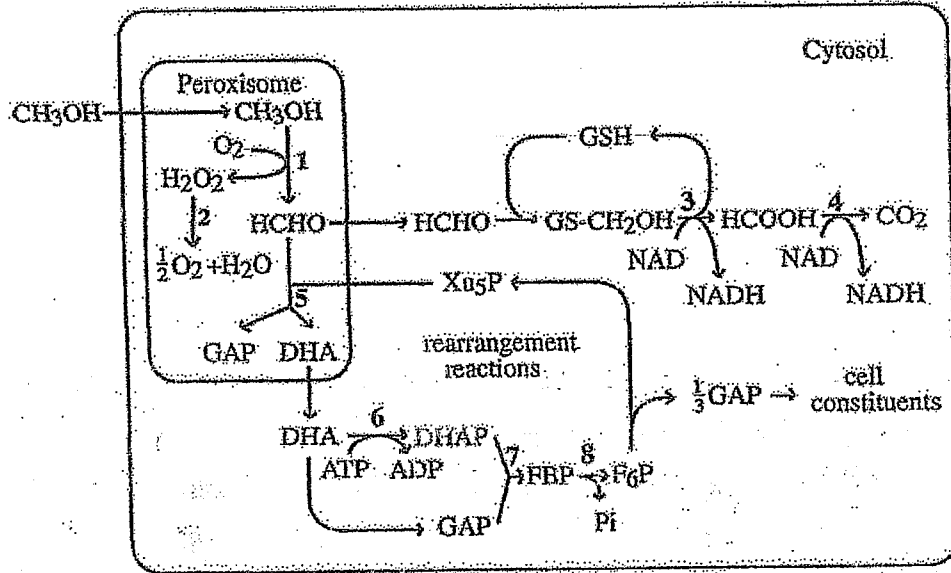
-moleküler genetik seviyede kolayca işlenebilmeleri,
-hücreler arası veya hücre içinde büyük miktarlarda protein ekspresyonu,
-glizolizasyon, sülfidasyon gibi post translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilebilmesi [88].

-güçlü bir promotörün varlığı,

-ucuz üretimin yapılabilmesi sayılabilir [11, 87, 89].

1.2.1 *P. pastoris* metanol mekanizması

P. pastoris metanolü kullanabilen 4 farklı cins ile temsil edilen mayalardan biridir. Diğer cinsler; *Candida*, *Hansenula* ve *Torulopsis*'dir [90]. Genel olarak bu cinslere ait türlerdeki metabolizma süreçleri benzerlik göstermektedir [91].

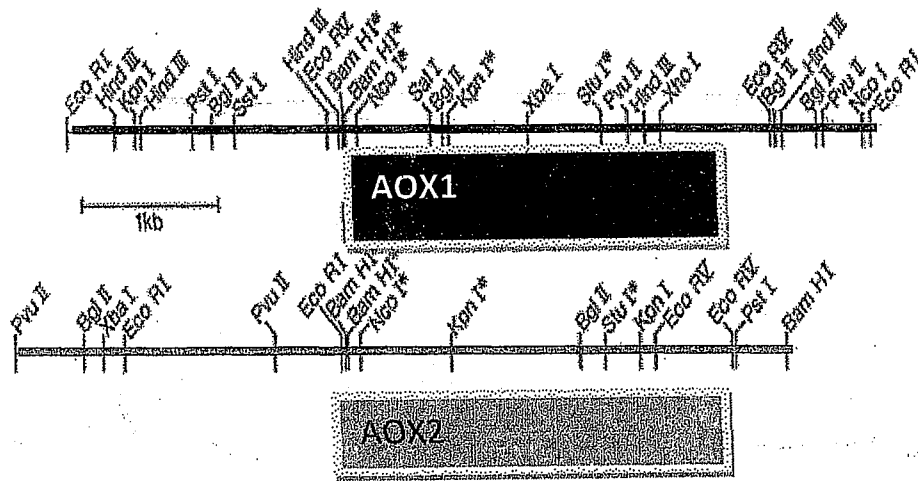


Şekil 1.7 *P. Pastoris*'de metanol mekanizması. 1) Alkol oksidaz, 2) katalaz, 3) formaldehit dehidrogenaz, 4) formatdehidrogenaz, 5) dihidroksiaseton sentetaz, 6) dihidroksikinaz, 7) fruktoz 1,6 bifosfat aklolaz 8) fruktoz 1,6 bifosfat az [92].

Metanol metabolizmasında ilk adım metanolün formaldehide oksidasyonudur. Bu süreçte üretilen hidrojen peroksit, alkol oksidaz enzimi (AOX) tarafından kullanılır. Hidrojen peroksit hücreler için toksik etkiye sahiptir ve bu metabolizmada hidrojen peroksitler peroksizomlar vasıtasıyla hücreden uzaklaştırılırlar. AOX her ünitesinde kofaktör flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunan homo-oktomer yapıdadır. AOX'ın oksijene karşı affinitesi düşüktür fakat enzimin çok üretilmesiyle bu eksiklik giderilmektedir.

1.2.2 Alkol Oksidaz

P. pastoris 'de iki adet AOX kodlayan gen vardır. Bunlardan biri AOX1 diğeri AOX2'yi kodlar fakat AOX1'in alkolün oksidasyonundaki rolü AOX2'ye göre daha fazladır. AOX promotorü oldukça güçlü bir promotördür. Öyleki çalkalamalı kültürlerde metanolla büyütüldüğünde üretilen toplam proteinin yaklaşık %5'i, fermenter kültürlerde ise %30'u rekombinant proteinlerden oluşabilir [93].



Şekil 1. 8 *P. pastoris* AOX lokusunun karşılaştırmalı restriksiyon haritası. İki gende de bulunan restriksiyon bölgeleri yıldızla işaretlenmiştir [94].

AOX1 geninin ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde kontrol edilir. AOX1 in düzenlenmesinde iki mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan biri baskılama diğeri indüklenme mekanizmasıdır. Glukoz varlığında bu gen güçlü bir şekilde baskılanır. Gliserol varlığında da baskı altına alınır. Öte yandan metanol ise genin ekspresyonunu teşvik eder [95, 96]. *Pichia pastoris* sisteminde güçlü bir promotör olan AOX kullanıldığı için oluşan ürünler *S.cerevisiae* 'ye göre 10 ila 100 kat daha fazla rekombinant protein üretilmiştir [97]. AOX1 promotörünün güçlü regülasyonunun diğeri bir yararı ise karbon kaynakları ile baskılanabilmesidir. Böylece karbon kaynaklarının eklenmesi ile durdurulabilir. Bu yöntem hücreler için toksik olabilecek proteinlerin üretimi için kullanılabilir [93].

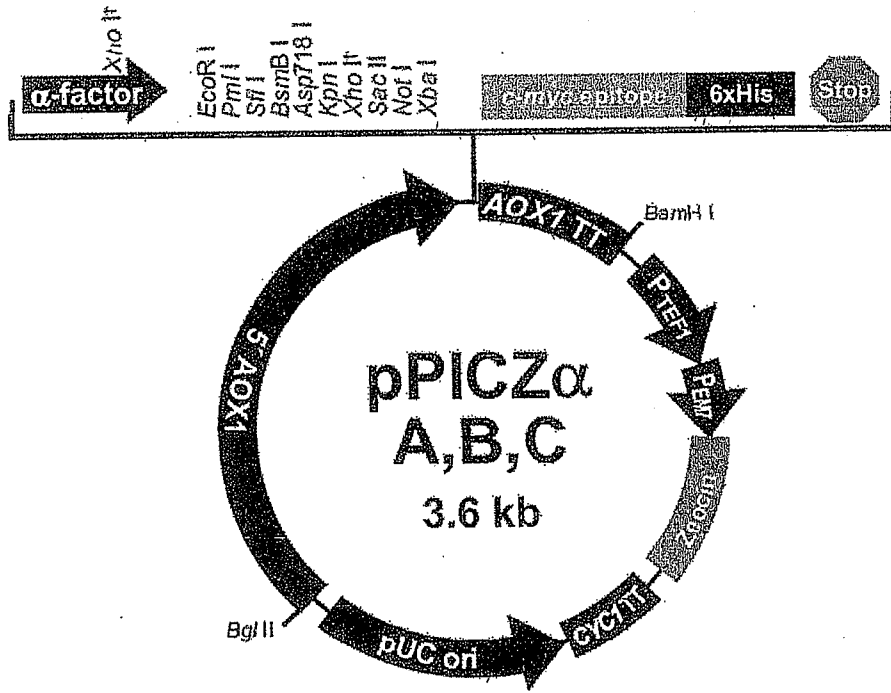
1.2.3 Vektör

P. pastoris için mevcut olan birkaç vektör bulunmaktadır. Bu vektörler, AOX1 promotörünün kullanılmasıyla rekombinant proteinlerin metanol ile yüksek seviyede ekspresyonunu mümkün kılar.

Bu vektörlerden biride bizimde çalışmalarımızda kullanılmış olan ve içerisinde *S.cerevisiae* salgılama sinyal dizisi kullanılarak rekombinant protein ekspresyonuna izin veren pPICZ α -A vektörüdür. Bu vektörün çoklu klonlama bölgelerinde XhoI restriksiyon kısmının kullanılmasıyla Kex2 kesim bölgesinde bir genin klonlanması mümkün olur dahası rekombinant N-terminal uçlu bir rekombinant protein elde edilebilir.

P. pastoris ve *E.coli*'nin transforme olmuş hücrelerini kolayca ayırt etmek için bu vektör bir ZeozinTM direnç geni olan Sh ble genini içerir. Bu gen her iki mikroorganizma için bir promotöre sahiptir.

Her iki organizmanın seleksiyonu için ZeozinTM 'nin kullanımı vektörün boyutunu azaltmaktadır. Vektörün boyutu çok önemlidir çünkü daha ufak ve tümleşik vektörlerde transformatların daha düzenli olduğu bulunmuştur [88]. pPICZ α -A vektörü ayrıca, rekombinant proteinlerin kolay saflaştırılması ve tespiti için bir polihistidin etiketi ve C terminal gen (c-myc epitope) ile rekombinant gen kaynaştırılmasında izin verir. Bir stop kodonu eğer istenmiyorsa rekombinant protein dizisinin sonuna insert edilebilir [98].



Şekil 1.9 pPICZ α -A vektörü ve bölgeleri [87]

pPICZ α -A vektörü mayalar için replikasyon orijini içermez ve transformatlar, eğer *P. pastoris* genomu içerisine entegre edilirse elde edilebilir. pPICZ α -A vektörünün linearize edilebileceği restriksiyon kesim bölgeleri SacI, PmaI ve BstXI enzimlerinin kestığı yerlerdir. Bu enzimlerle linearize edilen vektörler konakçı *Pichia*'nın 5' AOX1 bölgesine entegre tek bir parça değişimi ile entegre olabilirler. pPICZ α -A vektörünün entegre olabilmesi, seçilme baskısının (selective pressure) olmadığı durumlardaki son derece verimliliğinden kaynaklandığı için zeozinin transforme olmuş *P. pastoris*'in ortamında bulunmasına gerek yoktur [93].

1.2.4 Heterolog Proteinlerin Sentezi

P. pastoris ile heterolog proteinler, hücreler arası ya da büyüme ortamına ekspre edilebilir. Çünkü *P. pastoris* çok düşük seviyede hücre içine proteinin ekspresyonunu yapabilir, bu da proteinin hücreden saflaştırılması için kendiliğinden bir çözüm gibi görünmektedir. Buna rağmen genel olarak yabancı proteinler için seçenekler *Pichia sp.* için sınırlıdır. Proteinin salgı metabolizması için bazı sinyal dizileri gerekmektedir. Bu zamana kadar birkaç dizi başarıyla kullanılmıştır [11, 87, 93, 99].

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu çalışma antimikrobiyal bir peptit olan krabrolinin *P. Pastoris* sistemi kullanılarak yüksek miktarda üretiminin sağlanması ve bunun için en uygun koşulların belirlenerek bu koşulların optimizasyonun yapılması ve bunun yanında daha geniş ölçekli üretimlerde kullanılması için bir referans olarak kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Medya

Maya Ekstrakt Pepton Dekstroz (MED) medya: 10 g. Maya ekstraktı (Oxoid Ltd, England) ve 20 g. Pepton (Remel, USA) 900 mL saf ve otoklavlanmış suda çözüldükten sonra yaklaşık 60 °C'ye soğutuldu ve %20 dekstroz ilave edildi [98].

10X Maya Nitrojen Base (MNB) medya: 134 g. YNB (Invitrogen, California) 1000 mL saf suda çözüldükten sonra filtre edildi [98].

Minimal Metanol (MM) medium: 800 mL saf su otoklavlandıktan sonra 60°C'ye soğutuldu ve 100 mL fitre edilmiş MNB medya (Invitrogen, California), 2mL %0,02 Biotin ve 100 mL %5 metanol eklendi [98].

2.2 Tampon ve Solüsyonlar

0,1 M K fosfat tamponu (son hacim 200 mL): Tampon için öncelikle 2 solüsyon hazırlanmıştır. Bunlar; 0,2 M mono-potasyum ve di-potasyum tuzlarıdır. 0,2M potasyum fosfat, mono potasyum tuzu için 27,2 g. KH_2PO_4 (MA = 136,09) 500mL dd H_2O ile çözülmüş ve daha sonra 1 lt'ye tamamlanmıştır. 0,2 M potasyum fosfat, di-potasyum tuzu içinse, 34,8 gr K_2HPO_4 (MA = 174,18) 500mL dd H_2O ile çözülmüş ve daha sonra 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra bu iki solüsyon istenilen pH'nın eldesi için belirli oranlarda karıştırılmıştır [100].

0,1 M NaOAc (Son hacim 100 mL): 0,1 M NaOAc eldesi için iki solüsyon gerekmektedir. Bunlardan ilki 0,2 M asetik asittir. Bu solüsyon için 11,55 mL. glasiyal asetik asit ile 500 mL. ddH₂O karıştırıldıktan sonra 1litreye tamamlanmıştır. İkinci solüsyon ise 0,2 M potasyum asetatıdır, Bu solüsyonun eldesi için 19,62 gr potasyum asetat (KOAc, MA = 98,14) 800 mL. ddH₂O suda çözülüp 1litreye tamamlanmıştır. Daha sonra bu iki solüsyon istenilen pH'nin eldesi için belirli oranlarda karıştırılmıştır.

500X B (0.02% Biotin): 20 mg. Biotin 100 mL. Suda çözüldükten sonra filtre edilerek steril edildi ve +4°C'de saklandı [98].

10X D (20% Dekstroz): 200 gr. D-glikoz 1000 mL suda çözüldükten sonra otoklavlandı [98].

10X M (5% Metanol): 5 mL. metanol ile 95 mL. su karıştırıldı ve filtre edildikten sonra +4°C'de saklandı [98].

%10 BSA Çözeltisi: 2.5 g bovin serum albumin tartılmış ve 25 mL saf ve otoklavlanmış su ile çözülmüştür. Daha sonra çalışmalarda % 1 oranında kullanılmak üzere MM (Minimal Metanol) medya üzerine 1:10 oranında katılmıştır.

0,1 M EDTA: 186,12 g disodyum etilendiamintetraasetat-2H₂O (Na₂EDTA-2H₂O, Ma = 372,24) 800 mL ddH₂O ile çözülmüş ve manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırılıp pH 8,0'a ayarlanmıştır. Daha sonra hacim 1 litreye tamamlanmıştır (son konsantrasyon 0,5 M). Bu stok slüsyonu daha sonra su ile 0,1 M'a seyreltilmiş, sonrasında çalışmalarda kullanılırken son konsantrasyonun 10 mM olması için MM büyüme medyası üzerine 1:10 oranında eklenmiştir.

2.3 Petriler

LB %1 agaroz petri: 2,5 g tripton, 1,25 g yeast ekstrakt (Oxoid Ltd, England), 2,5 g NaCl, 2,5 g. agaroz 250 mL saf su ile karıştırıldıktan sonra 1 M NaOH ile pH ayarlanmış ve otoklavlanmıştır.

LB Agar petri: : 2,5 g tripton, 1,25 g maya ekstrakt (Oxoid Ltd, England), 2,5 g NaCl, 3,75 g agar (Bie & Berntsen, USA) 250 mL saf su ile karıştırıldıktan sonra 1 M NaOH ile pH ayarlanmış ve otoklavlanmıştır. Daha sonra petri kaplarına dökülmüştür.

2.4 Çalkalamalı kültürlerde protein ekspresyonu

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda pPICZ α -A vektörü ile transforme olmuş *P. pastoris* x-33 suşları kullanılmıştır. Ön kültür olarak 25 mL MED medya içinde 20 saat 30 °C'de büyümeye bırakılmışlardır. Daha sonra hücreler 3000 g'de 5 dk. santrifüj edilerek toplanmıştır. Hücre çökeltisi 100mL. MM medya ile çözülmüş ve 20°C de 250 rpm'de 2 litrelik set yüzeyli erlenlerde (buffed flask) inkübe edilmişlerdir (Ana kültür). Aşağıda belirtilmiş olan bazı deneylerde 100 mM fosfat tampon veya 100 mM asetat tamponu kullanılmıştır. Bu tamponlar farklı pH'lerde büyüme kültürü elde etmek için kullanılmıştır. Bunun haricinde yine bu çalışmada belirtilmiş deneylerde EDTA (10mM son konsantrasyon) veya BSA % 1 son konsantrasyon) gibi katkılar büyüme kültürüne eklenmiştir. Rekombinant krabrolinin ekspresyonu metanolün eklenmesi ile teşvik edilmiştir. Metanol eklenme zamanı ve miktarı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.1). Bunun haricinde 12 ve 24 saatte de bir metanol eklenmiştir. 99 saat sonra ekspresyon kültürü 5000 g'de 10 dk. 4°C'de santrifüj yapılarak hücreler çöktürülmüştür. Buna ek olarak ekspresyon seviyelerinin kontrolü için bazı deneylerde 72 saat sonra da örnekleme yapılmıştır. Daha sonra süpernatant alınarak (100 mL.) 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılmış ve liyofilize edilmiştir.

2.5 Peptidin saflaştırılması

1.5 mL. ddH₂O (4°C) daha önceden liyofilize yaptığımız ekspresyon kültürü (bu aşamada toz halinde bulunur) bulunan 50 mL'lik falkon tüplerine eklendi. Daha sonra bu protein tozu, eklenen su ile sert bir şekilde hemen karıştırılarak çözüldü. İkinci adımda organik çözügen olarak 5 mL. 20°C dietileter kullanılarak proteinin çökmesi sağlandı. Çökme işleminden sonra oluşan solüsyon döner buharlaştırıcıya (RV 10 digital V, IKA, Germany) kuruması için konuldu (30dk, 125 rpm). Daha sonra artık kristalize hale gelmiş ve kurumuş toz tekrar suda çözülerek 14 mL'lik falkon tüpe aktararak liyofilizatöre konulmuştur. Daha sonra bu liyofilize edilmiş tozdan 0.05 g. ve 0.1 g. tartılarak 350 µL 0.01 TFA (Trifloroasidik Asid) içinde çözülmüştür.

Tablo 2. 1 Kullanılan metanolün zaman aralıkları ve miktarı

Zaman aralıkları [h]	Metanol miktarı [mL]
0-1	0.5
1-2	1.0
2-3	1.5
3-4	2.0
4-5	2.5
5-6	3.0
6-7	3.5
7-8	4.0
8-9	4.5
9-10	5.0
10-11	5.5
11-12	6.0
12-13	6.5
13-14	7.0
14-15	7.5
15-16	8.0
16-17	8.5
17-18	9.0
18-19	9.5
19-20	10.0
20-21	10.5
21-22	11.0
22-23	11.5
23-24	12.0
24-25	12.5
25-26	13.0
26-27	13.5
27-28	14.0
28-29	14.5
29-30	15.0
30-31	15.5
31-32	16.0
32-33	16.5
33-34	17.0
34-35	17.5
35-36	18.0
36-37	18.5
37-38	19.0
38-39	19.5
39-40	20.0
40-41	20.5
41-42	21.0
42-43	21.5
43-44	22.0
44-45	22.5
45-46	23.0
46-47	23.5
47-48	24.0
48-49	24.5
49-50	25.0
50-51	25.5
51-52	26.0
52-53	26.5
53-54	27.0
54-55	27.5
55-56	28.0
56-57	28.5
57-58	29.0
58-59	29.5
59-60	30.0
60-61	30.5
61-62	31.0
62-63	31.5
63-64	32.0
64-65	32.5
65-66	33.0
66-67	33.5
67-68	34.0
68-69	34.5
69-70	35.0
70-71	35.5
71-72	36.0
72-73	36.5
73-74	37.0
74-75	37.5
75-76	38.0
76-77	38.5
77-78	39.0
78-79	39.5
79-80	40.0
80-81	40.5
81-82	41.0
82-83	41.5
83-84	42.0
84-85	42.5
85-86	43.0
86-87	43.5
87-88	44.0
88-89	44.5
89-90	45.0
90-91	45.5
91-92	46.0
92-93	46.5
93-94	47.0
94-95	47.5
95-96	48.0
96-97	48.5
97-98	49.0
98-99	49.5
99-100	50.0

2.6 Krabrolinin aktivitesi ve tahlili

Krabrolin aktivitesi *E.coli* DH5 α suşu kullanılarak test edilmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi TFA'da çözülerek hazırlanan ve içerisinde belirli miktarda liyofilize protein tozu içeren solüsyonlar LB agar üzerinde bu suşun inhibisyonunu gözlemlemek için kullanılmıştır. *E coli* 300 μ L. saf su içerisinde dağıtıldıktan sonra bu bakteri solüsyonuna daha sonra 12 mL. %1 agaroz LB medyum eklendi. Bu medyum, sonrasında ise 9 cm. çapındaki petri kaplarına dökülüp katılaşmaya bırakıldı ve sonrasında ise 10 - 100 μ L.'lik pipet ucu kullanılarak kuyucuklar açıldı. Farklı miktarlarda (5 - 55 μ L.) hazırlanmış protein solüsyonları (% 0.01'lik TFA'de 350 μ L) sırasıyla bu kuyucuklara eklendi. Petriler daha sonra 18 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonrasında inkübatörden çıkarılan petriler 24 saat bekletilerek inhibisyon zonlarındaki değişimler kontrol edildi.

3. BULGULAR

Daha önceden bahsedildiği gibi *P. pastoris* 'in rekombinant sistemler için yüksek miktarlarda ve farklı skalalardaki üretimler için (basit laboratuvar araştırmaları ve endüstriyel üretim) kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Rekombinant protein ekspresyonunda, ilgilenilen proteinin üretimine bağlı ideal koşulların belirlenmesi için yapılan deneyler kadar yöntemin belirlenmesi de o kadar gereklidir. Sunulan bu çalışmada *P. pastoris* x-33 kullanılarak krabrolinin saflaştırılması ve rekombinant ekspresyon için bir seri optimizasyon çalışması uygulanmıştır. Bu optimizasyon çalışmasında, ileriye yönelik olarak, AMP için yüksek aktivite amaçlanmıştır.

Bundan dolayı *P. pastoris* kültürleri krabrolinin ekspresyonu ve aktivitesinin optimizasyonu için çalkalamalı kültür formatında ve farklı işlem parametreleri ile test edilerek (bu parametrelerin büyüme ve aktivite üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için) büyütölmüşlerdir.

Yapılan bir seri deneyler boyunca krabrolin aktivitesinin eldesinden *P. pastoris* x-33 ile ekspre edilmiş bazı fonksiyonel proteinlerin sorumlu olduğu farz edilebilir. Deney 2 ve 3'de saflaştırılmış proteinden elde edilemeyen aktivitenin yanında çoğu deneylerde göreceli olarak ortadan yükseğe farklı seviyelerde protein aktivitesi elde edilmiştir (deney 4, 5 ve 6). Kullanılmasıyla yüksek aktivite seviyesi veya yüksek seviyede protein miktarının elde edilmesi ile sonuçlanan deney

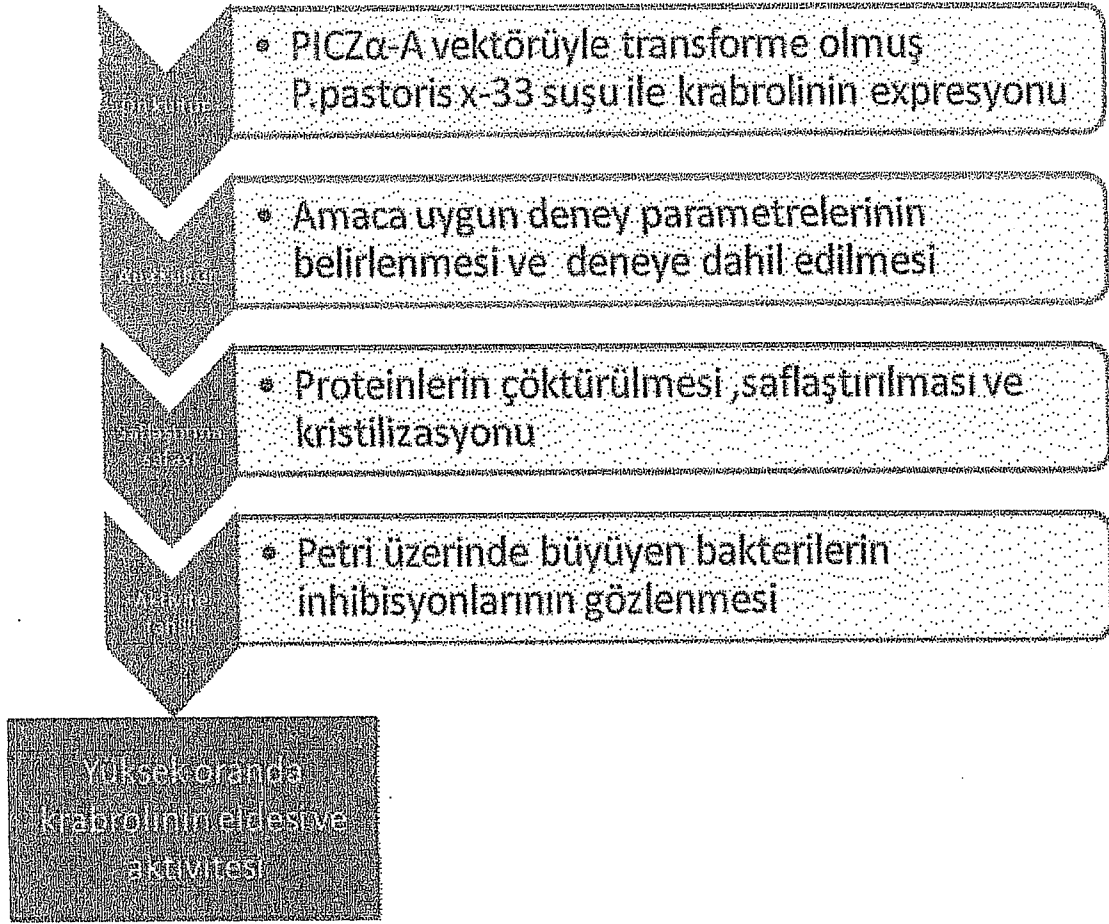
parametrelerinin varyasyonları, ileride daha yüksek miktarlardaki kültür çalışmalarının araştırılması için sınıflandırılmıştır.

Ekspresyon yöntemlerinin dizaynında seçilmiş parametreler kadar bütün deneylerin sonuçları da aşağıda ard arda gelen bölümlerde tartışılacaktır.

3.1 Süreç dizaynı ve parametrelerin optimizasyonu

Farklı deney parametreleri, literatürden araştırılmış ve bir ekspresyon sistemi olarak *P. pastoris* kullanılarak krabrolinin üretimi için dizayn edilmiştir. Daha önceden bahsedildiği gibi her işlem yeni bir rekombinant proteinin ekspresyonu için adapte edilmek zorundadır. Bu nedenden dolayı *P. pastoris*'de rekombinant krabrolinin ekspresyonunun optimizasyonu için her deneyde farklı bir işlem dizayn edilmiş, planlanmış ve yerine getirilmiştir.

Bu işlemlerin temel süreci aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3. 1 Krabrolinin ekspresyonunun ve saflaştırılmasının deneysel dizaynı ve optimizasyon sürecinin safhalarının genel açıklaması. Rekombinant krabrolin ekspresyonunun *P. pastoris* x-33 suşu ile başlaması, ilgili süreç parametrelerinin (daha önceden bahsedilmiştir) adaptasyonu ve seleksiyonu ; büyüme kültürüne salgılanmış olan proteinlerin kristalizasyonu ve son olarak antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesi.

P. pastoris kültürünün standart parametreleri bu çalışmada sunulan deneylerin bir bölümünde tanımlanacaktır. Rekombinant krabrolin ekspresyonunun optimizasyonu için seçilmiş parametreler, deneylerin detaylarında tartışılmadan önce bu parametreler için aşağıda kısa bir tanımlama yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı *P. pastoris* kültüründe rekombinant krabrolinin üretiminin en iyi şekilde elde edilebilmesi için pH, O₂, karbon kaynağı (oranı ve zamanı), farklı medya katıkları ve toplam bekletme zamanı gibi farklı parametrelerin optimizasyonunu yapmaktır.

Bu parametrelerin varyasyonlarının potansiyel olarak protein üretimi ve aktivitesi üzerine etkili olduğu fark edilmiştir. Sıcaklık gibi belirli parametreler daha önceden ayarlanıp tüm deneyler süresince sabit olarak değişmeden kullanılmıştır. Diğer listelenmiş olan parametreler ise krabrolin aktivitesinin verimini ve *P. pastoris*'in kültürde büyüme potansiyelini arttırmak, potansiyellerini değerlendirmek ve kültürdeki değişimi kontrol etmek için değiştirilmiştir.

Kültür sıcaklığı tüm deneyler için 20 °C'ye düşürülmüştür. Bazı literatür çalışmalarında düşük sıcaklıkların protein ekspresyonunda daha olumlu sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır [101]. Bunun nedeni düşük sıcaklığın yüksek sıcaklığa göre bazı avantajlarının olabileceğinin düşünülmesidir (düşük proteaz aktivitesi, hücre yaşama şansının artırılması yüksek sıcaklıklarda yanlış protein bağlanmalarının olabilmesi ve daha yüksek sıcaklıklarda rekombinant proteinlerin stabilizesinin kaybolabilmesi gibi).

Metanol miktarı ve indüksiyonu için farklı deney modellerine göre değişiklikler yapılmıştır (Tablo 2.1'e göre veya alternatif olarak her 12 ve 24 saat için). Metanol indüksiyonu bir proteinin üretimindeki büyüme oranları için son derece önemlidir zira metanol yoğunluğu hem hücre yoğunluğunu hem de protein miktarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir [87].

Burada not edilmelidir ki fermenter kültürler oksijen miktarının kontrolü (havalandırma), pH, sıcaklık gibi bundan farklı parametrelerin kontrolüne de izin verdiği için büyük avantajlar sağlamaktadır. Bizim de kullandığımız çalkalamalı kültürlerinde çoğunlukla elle kontrol yapılırken fermenter kültürler otomatik ve gerçek zamanlı olarak değişkenlerin izlenmesine ve kontrol edilmesine olanak sağlar. Bu özel durum ise deneylerdeki optimizasyon için çok önemlidir. Özellikle de benzer şekilde deneylerde sabit tutulması gereken parametreler için ayrı bir önem taşımaktadır.

Bahsettiğimiz bu nedenlerden dolayı söylenebilir ki aşağıda bahsedilen deneyler rekombinant krabrolin ekspresyonu için bir başvuru, bir giriş niteliği taşımakta ve daha geniş çapta üretimler için bir fikir vermesi amaçlanmaktadır.

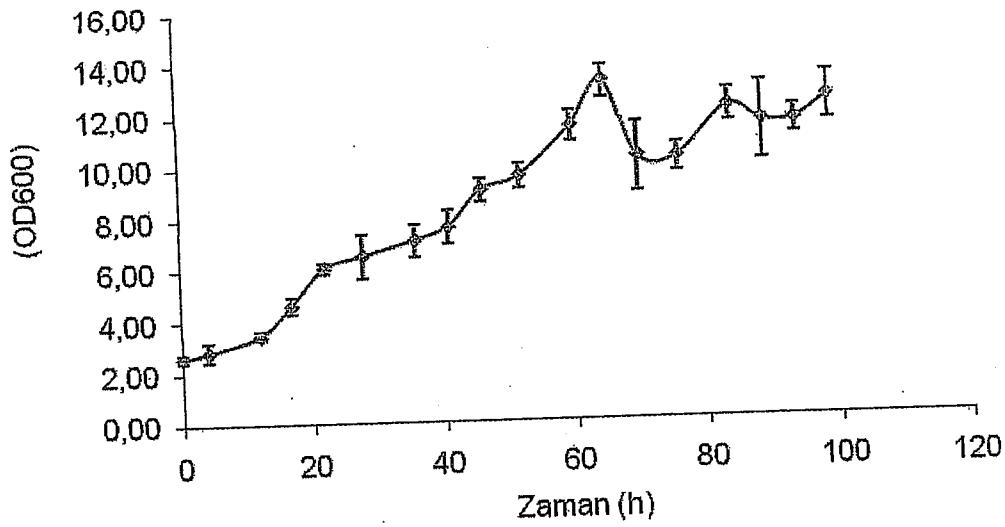
3.2 Krabrolinin Ekspresyonu ve saflaştırılması için optimum deneysel koşulların araştırılması

Bu deney, çalışmanın başlangıcında krabrolinin ekspresyonu ve saflaştırılması için optimum deneysel koşulların araştırılması için bir başlangıç noktası olarak işlev görmüştür. Bu deney tamamen deney sürecinde kullanılan parametrelerin varyasyonlarını içeren şekil 2.1'de tanımlanmış deney dizaynının tüm adımlarına uygun olarak yapılmıştır. Bu parametrelerden bazıları sonraki deneylerde değiştirilmiştir (bölüm 3.2-3.7). Bu deneyler, parametreler değiştirildiği zaman oluşan değişikliklerin incelenmesi, gerekli ana koşulların oluşturulması ve saptanması için gerekli görülmüştür. Bu koşulların optimizasyonunun etkisi *P. pastoris*'in kültürdeki durumunun gözlenmesi ile anlaşılmıştır. Bu da OD₆₀₀'de kültür örneklerinin belirli aralıklarla ölçülmesiyle mümkün olmuştur. Daha sonrasında yukarıda bahsedilen yöntemle (bkz. 2.6) krabrolinin aktivitesi ve salgılanan protein miktarı belirlenmiştir.

Tüm deneylerde standart prosedürler takip edilmiştir. Bunları şu şekilde özetleyebiliriz; bu deneyde gliserol stoktan alınan örnekler petriye ekilmiş ve deneylerde bu örnekler kullanılmıştır. Daha sonrasında standart olarak ön kültür hazırlanmıştır (25mL MPD medya), büyüme kültürü olarak MM medyum kullanılmış ve 20°C de standart olarak 250 rpm'de çalkalanmıştır. Ekspresyon, tablo 2.1'de listelenmiş aralıklarla kültüre metanol eklenmesiyle teşvik edilmiştir.

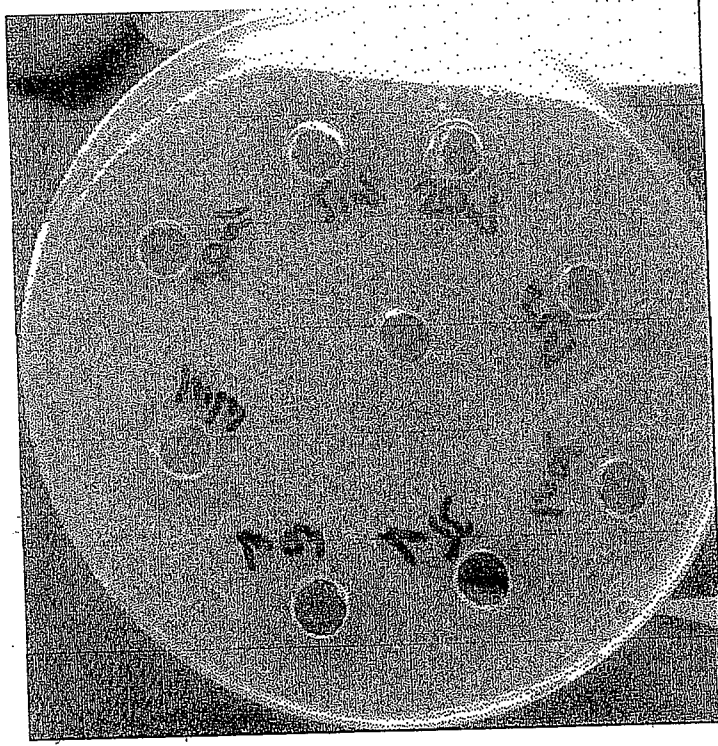
Bu deney için 4'lü paralel kültür kullanılmış ve aşağıdaki şekilde OD₆₀₀ ölçüm sonuçlarından oluşan grafikde *P. pastoris*'in büyüme eğrisi gösterilmiştir. Tüm kültürler benzer büyüme ve ufak standart sapmalar göstermiştir.

P. pastoris büyüme grafiği

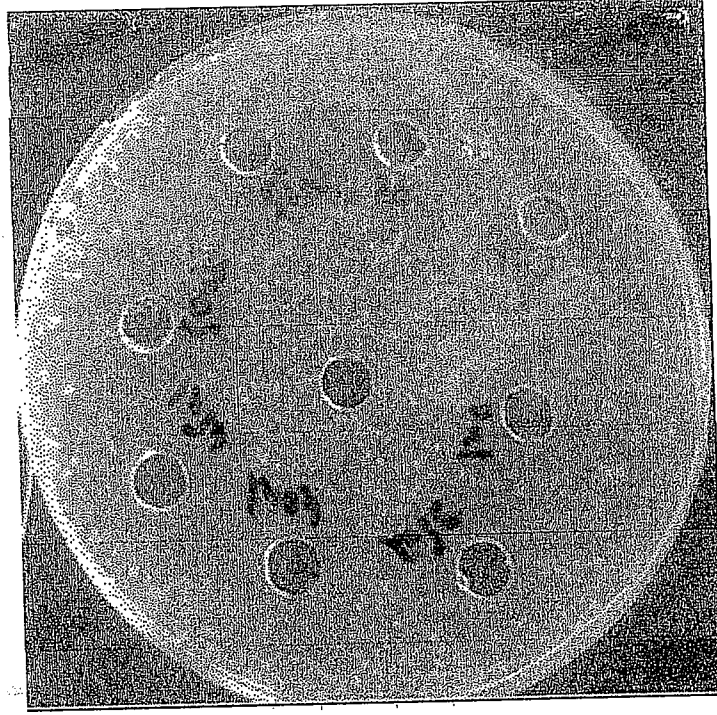


Şekil 3.2. Rekombinant krabrolin ekspresyon kültüründe *P. pastoris* için büyüme eğrisi. Süreç materyal metotta tanımlandığı gibi bu aşamada parametrelerin optimizasyonu için herhangi bir değişiklik henüz uygulanmamıştır. Metanol için zaman aralıkları tablo 2.1'e göre düzenlenmiş ve ayrıca hücre yoğunluğu OD₆₀₀ ölçümleri ile belirlenmiştir. Toplam kültürasyon zamanı 99 saattir.

99 saat sonra ekspresyon kültürü alınmış ve 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Krabrolin ve belki de hücreler tarafından salgılanmış olan diğer proteinleri de içeren bu medya, daha sonra liyofilizatöre konulmuş ve kristalizasyonu yapılmıştır. Kristalleşen protein örneklerinden sırasıyla 0.05 ve 0.1 gr. tartılıp % 0.01 TFA ile çözülmüş daha sonra krabrolin aktivitesi gözlenmiştir. Bu süreç materyal metot kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.



Şekil 3. 3 Deney 1' e ait bir örnek. Salgılanan proteinler kristallendirildikten sonra bir protein çözeltisi son konsantrasyon $0,143\text{mg}/\mu\text{L}$ olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden farklı miktarlarda ($20\text{-}55\ \mu\text{L}$) daha önceden pipet ucu ile açılmış kuyulara aktarıldı. Deney 1'de kayda değer zon oluşumu $35\ \mu\text{L}$ 'den itibaren başlamıştır. 6mm 'ye tekabül eden bu zon $55\ \mu\text{L}$ 'ye kadar artmıştır. Resimde görülen fakat petrinin ortasında tanımlanmamış olan kuyucukda negatif kontrol olarak $20\ \mu\text{L}$ $\%0,01$ TFA kullanılmıştır.



Şekil 3.4 Deney 1 için krabrolin tayinini gösteren başka bir örnek. Bu sefer içerisinde salgılanmış proteinleri bulunduran protein çözeltisi $0.286 \text{ mg}/\mu\text{L}$ (şekil 2.3'deki miktarın 2 katı) olacak şekilde hazırlanmış ve kuyulara belirli miktarlarda ($20\text{--}55 \mu\text{L}$) konulmuştur. Gözlenebilir şekilde zon oluşumu $20 \mu\text{L}$ 'den itibaren başlamıştır. Bu deneyde diğer tüm deneylerde olduğu gibi bu aşamada zon oluşumuna karşı *E. coli* DH α kullanılmıştır.

Elde edilen bu inhibisyon zonları 12-48 saat arası kontrol edilmiş ve sonunda gözle görülür bir değişim gözlenmemiştir. Kayda değer inhibisyon zonu $0.143 \text{ mg} / \text{mL}$ (şekil 3.3) için $35 \mu\text{L}$ 'de 6mm. olarak tespit edilmiş ve bu zon çapı $55 \mu\text{L}$ 'ye kadar artmıştır. Öte yandan iki kat konsantrasyonda $0.286 \text{ mg}/\mu\text{L}$ 'de (şekil 3.4) ise bu zon çapı $20 \mu\text{L}$ 'de başlamıştır.

İdeal olarak aynı miktarlarda krabrolin pozitif kontrol olarak eklenebilirdi fakat elde edilen protein örneklerindeki krabrolin miktarı henüz tespit edilemediğinden bunu gerçekleştirmek mümkün olmamıştır. Fakat takip eden deneylerde salgılanan protein miktarları ve krabrolin aktivitesi, optimizasyon için bir referans noktası olarak kullanılabilir. Deney 1'deki koşullar sürecin başlangıcının

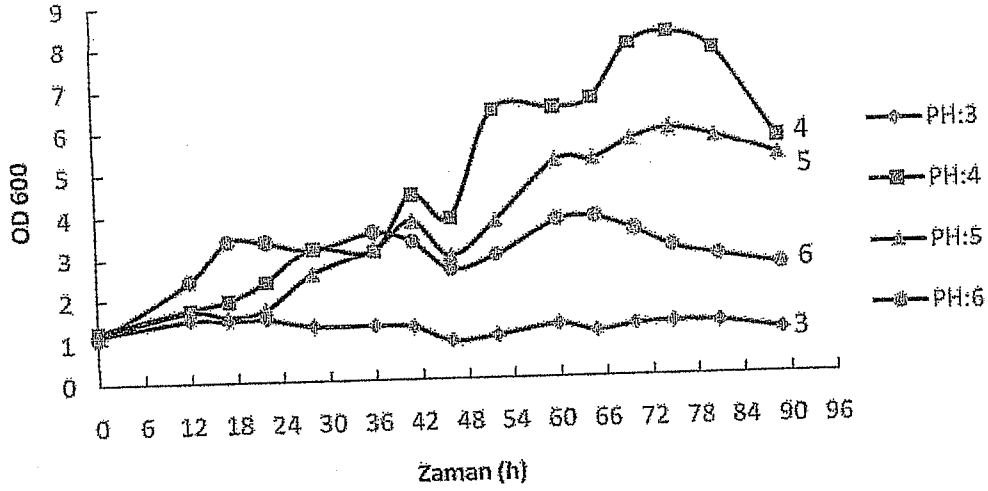
belirlenmesi ve oluşturulması, modifiye edilmemiş koşullar altında krabrolin ekspresyonunun seviyesinin ve bu sürecin stabilizesinin araştırılması için gereklidir.

3.3 pH Optimizasyonu

İkinci deney optimizasyon için belirlenmiş parametrelerden pH'nın etkisini gözlemlemek için yapılmıştır. 1. Deneyde pH dengede tutulmamış ve herhangi bir tampon bunun için var olan medyaya eklenmemiştir. Bu deneyde geri kalan bütün parametreler 1.deney'deki gibi düzenlenmiş sadece pH değiştirilmiştir. pH rekombinant protein üretiminde önemli olan bir parametre olarak görülmekte ve bazı literatür kaynaklarında pH'nın büyüme ve proteoliz aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır [101].

P. pastoris geniş pH aralığında (3-7) büyüme yeteneğine sahiptir ve bu pH seviyelerinin hepsinde can alıcı bir fark var gibi görünmemektedir. Rekombinant protein ekspresyonu ve stabilizesi bilinen proteazların aktivitesi ile alakalıdır. Bununla beraber çeşitli pH değişikliklerinin etkisi bazı çalışmalarda gösterilmiştir [101]. Bu nedenle bu deneyde bu etkinin krabrolin ekspresyonu ve aktivitesi üzerindeki sonuçlarını belirleyebilmek için ekspresyon kültürü pH 3, 4, 5 ve 6'da test edildi. pH spesifik tamponların (asetat tampon ve fosfat tampon bkz. Materyal metot) kullanımı ile korundu ve sabitlendi.

P. pastoris'in pH 3,4,5 ve 6'daki büyüme eğrileri

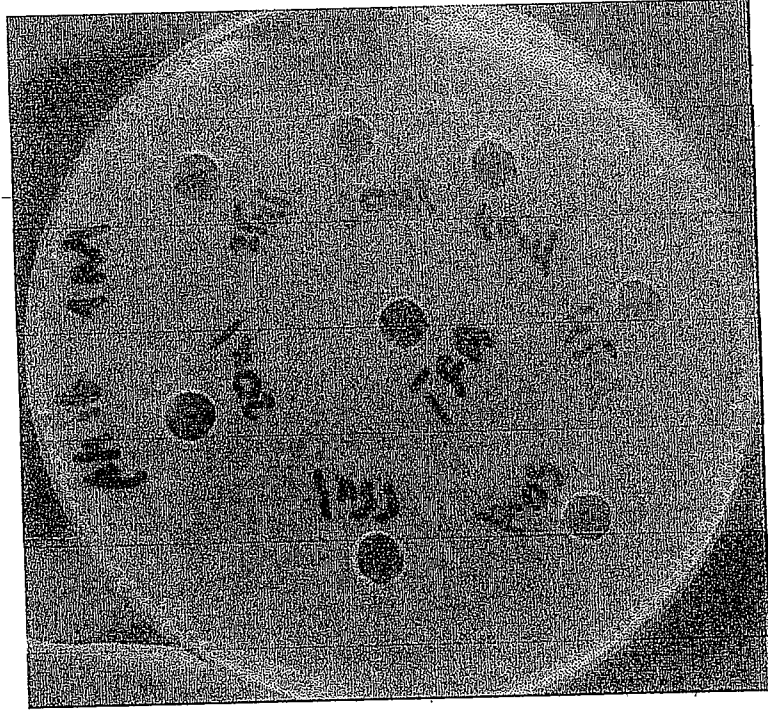


Şekil 3. 5 Farklı pH koşulları altında büyüme kültüründeki *P. pastoris*'in büyüme grafiği. Zaman aralıkları tablo 2.1'e göre ayarlanmıştır. Hücre yoğunluğu OD₆₀₀'deki ölçümlerle belirlenmiş toplam deney süresi 99 saat tutulmuştur fakat grafikte ilk 90 saatin eğrisi verilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde farklı pH'lerdeki farklı kültürler arasında büyüme davranışları gözlemlenmiştir. Hücre yoğunlukları deney 1'de ulaşılan ortalama olarak yarısına ulaşabilmiştir. Bu düşük hücre yoğunluğu muhtemelen yüksek konsantrasyonda (1M) kullanılan tamponlardan doğmaktadır.

Kültürler deney 1'le benzeşik olarak hazırlanmıştır. Büyük farklılık büyüme medyasının pH'nın stabilizasyonu için tampon içeriklerine başvurulmuş olmasıdır. Farklı pH değerleri (3, 4, 5 ve 6), krabrolin içeren protein salgılarını ve aktivitelerinin seviyesi, *P. pastoris* x-33 suşunun büyüme davranışları üzerindeki etkilerini araştırmak için seçilmiştir. Bu deneyde her bir pH denemesi için bir erlen kullanılmıştır (toplamda 4 erlen). pH'yı ayarlamak için 1M asetat tampon türevleri kullanılmıştır. Genel olarak deneylerde pH 5 ve 6'yı elde etmek için fosfat tamponu kullanılmıştır (deney 4-6).

Bununla beraber 1M'lık bir tampon molaritesinin, büyüme eğrisi üzerine bakıldığında, büyüme davranışı üzerinde engelleyici bir etkisi olduğu sonucuna varılabilir fakat bu deneyde büyüme grafiği incelendiğinde pH 3'de büyütülen

kültürdeki hücre yoğunluğunun diğer pH değerlerinde yetiştirilenlere göre gözle görülür bir farklılık olduğunu söyleyebiliriz. Tabii ki bu etki, yüksek konsantrasyondan ya da pH 3'ün rekombinant protein üretimi ve hücrenin büyümesi için uygun olmadığından olabilir. Fakat bunun doğru olup olmadığını söyleyebilmek için daha fazla deneme yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak bu deneyde herhangi bir inhibisyon zonu gözlenememiştir. Olası nedenler yukarıda açıklanmıştır.



Şekil 3.6 Deney 2 için krabrolin aktivitesinin belirlenmesi. Bu şekil deney 1'de olduğu gibi hazırlanmış protein solüsyonunun belirli oranlarda (20-55 μ L) petri üzerinde açılan kuyucuklara aktarılması ile oluşan sonuçları göstermektedir. Burada kullanılan çözeltinin yoğunluğu 0.286 mg/ μ L dir orta kısımda negatif kontrol için deney 1'de olduğu gibi %0.01 TFA kullanılmıştır. Burada örnek olarak pH 6'da büyütülmüş hücre örneklerinden elde edilen proteinden elde edilen sonuçlar gösterilmişse de pH 3, 4 ve 5 için de sonuçlar aynıdır yani herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

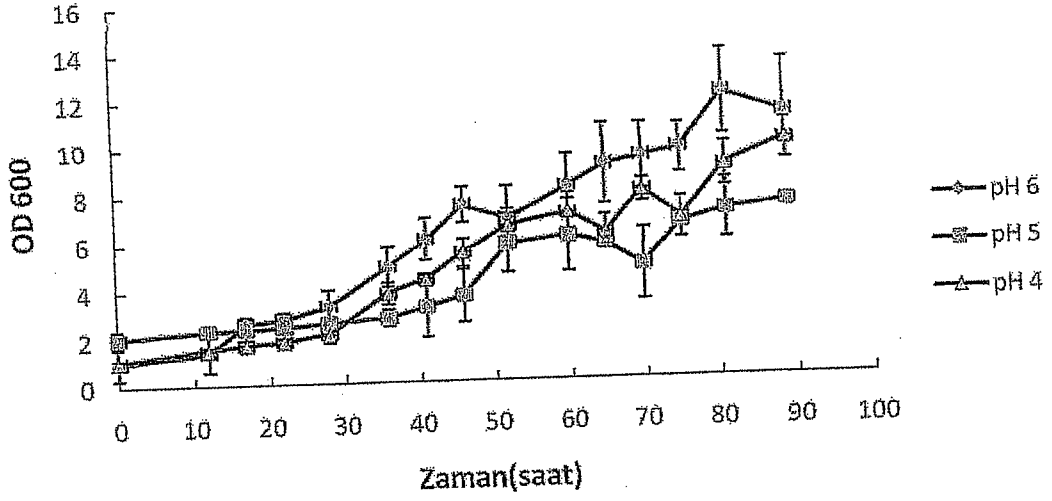
3.4 Tampon Optimizasyonu

Üçüncü deney serisi bir önceki deneyde yüksek konsantrasyonda tampon kullanılması ve bunun sonucunda da muhtemelen protein aktivitesinin ve hücre

büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu için bir nevi tekrar niteliği taşımaktadır. Bu deneyde tampon konsantrasyonu 100mM'a düşürülmüştür. Buradaki amaç konsantrasyonun inhibisyona neden olup olmadığını teyit etmek ve sadece pH'nın rekombinant krabrolin proteini üzerindeki etkisini gözleyebilmektir. Bu deneyde her bir pH için 4 erlenle çalışılmıştır. Diğer deneyden farklı olarak pH 3'ün başarı olasılığı düşük olduğu için bu deneyden çıkarılmıştır.

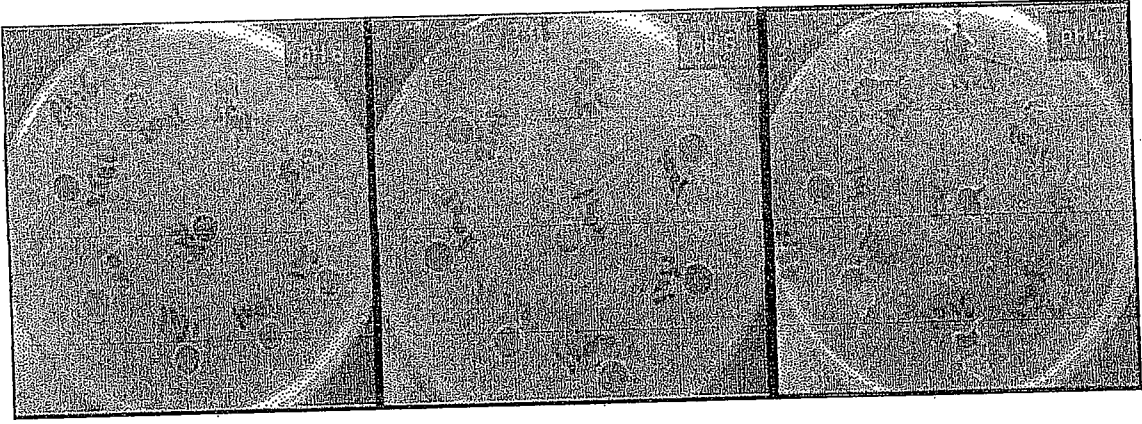
Ayrıca diğer bir kritik faktör olarak protein ekspresyonunu arttırmak için gaz değişikliğini ve havalandırmayı arttırmak bu deneyden itibaren düşünülmüştür. Bunun için diğer 2 deneyde kullanılan normal erlen yerine literatür kaynaklarında da havalandırmayı %20 oranında arttırdığı düşünülen özel set yüzeyli erlen (buffle flask) erlenler kullanılmaya başlanmıştır [102]. Respirasyonel büyüme ve metabolizma için oksijenin genel önemi yanında çalkalamalı erlen kültürleri oksijen-limitli koşulların oluşmasına neden olur ki geniş çaplı üretimlerin yapılabildiği fermenter kültürlerde daha fazla miktarda üretimin olmasının nedenlerinden biri de oksijen gibi önemli değişkenlerin devamlı olarak ortama girebilmesi ya da kontrolüdür.

P. pastoris'in farklı pH'lardaki büyüme grafiği



Şekil 3. 7 Farklı pH koşulları altındaki büyüme kültüründeki *P. pastoris* için büyüme eğrisi. Zaman aralıkları tablo 2.1'e göre düzenlenmiştir. Toplam süre 99 saat olup her bir pH değeri için 4 erlenle çalışılmış ve test edilmiş ve standart sapma eğrileri oluşturulmuştur. Deney 2'ye kıyasla farklı pH'lerdeki büyümede bir artış meydana gelmiş fakat deney 1'le kıyaslandığında büyümenin doğal bir seyir izlediği görülmektedir.

Her üç pH değeri için büyüme davranışı 1. deneyle benzerlik göstermiştir. pH 5 için hücre yoğunluğu diğer iki pH değerine göre nispeten düşük olmuştur. Diğer yandan yapılan 2. deneydeki gibi büyük farklılıklar oluşmamıştır. Hücre yoğunluğunun artışına rağmen (2. deneye göre) kristallendirme-basamağından-sonra krabrolin aktivitesi net olarak gözlenememiştir. Net olarak dememizin sebebi inkübasyondan sonra incelenen petrielerin bazılarında zon izleri gözlenmiş fakat standart inkübasyon süresi içerisinde bu zonlar kaybolmuştur.



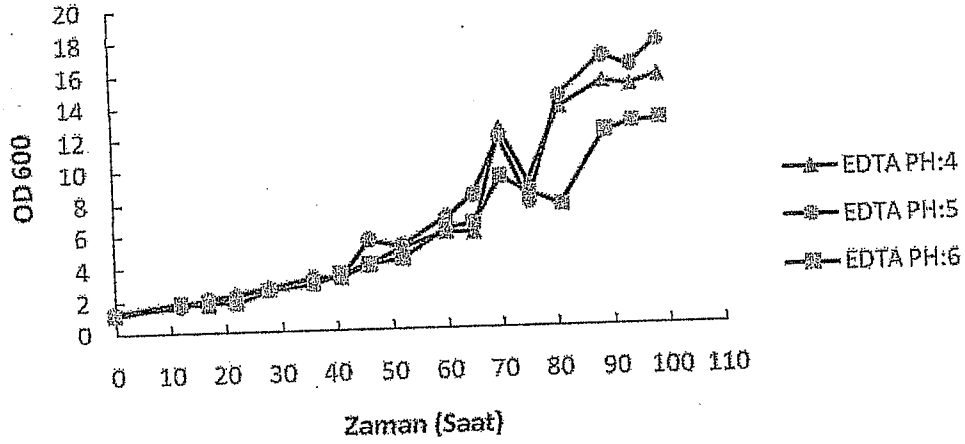
Şekil 3. 8 Deney 3 için krabrolin aktivitesinin belirlenmesi. Bu şekiller değişik pH'ler için 0.286 mg/ μ L yoğunluğa sahip protein solüsyonlarından elde edilen sonuçları göstermektedir. Hiçbir örnekte inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Buda krabrolin aktivitesini inhibe eden başka bir faktörün halen sonuçları etkilediğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, krabrolin ekspresyonunu ve aktivitesini etkiliyor olan diğer faktörlerin varlığına işaret etmektedir. Bu faktörlerden biri de sıklıkla literatürde tartışılan proteazların varlığıdır [98]. Bir sonraki deney serisinde de bu sorunun üstesinden gelmek için nasıl bir yaklaşım getirilebileceği üzerinde durulmuştur.

3.5 Proteazların İnhibe Edilmesi İçin Spesifik Olmayan İnhibitörlerin Kullanılması

3. Deney'de yapılan pH değişikliğine rağmen krabrolin aktivitesinde önemli bir değişiklik görülemediği üzerine 4. Deneyin yapılmasına karar verilmiştir. Bu deney boyunca düşük krabrolin aktivitesinden dolayı sınırlayıcı faktörler belirlenmeye ve açıklanmaya çalışılmıştır. Bu faktörler ekspresyon veya aktivite üzerindeki negatif ya da pozitif etkilerine göre elenebilirler ya da artırılabilirler. Bu faktörlerden biri de literatürde sıklıkla üzerinde söz edilen proteazlardır [87, 98]. Proteolizisi kontrol etmek için zaten standart olarak düşük sıcaklık (20°C) ta inkübasyon yapılmaktaydı fakat bu deneyde bunun yanında farklı olarak protein stabilitesini arttırmak ve proteazları inhibe eden içeriklerde proteazları kontrol etmek için EDTA kullanılmıştır.

EDTA'lı kültürde farklı pH'lardaki büyüme eğrileri



Şekil 3. 9 Medya katkısı olarak EDTA'nın kullanıldığı farklı pH koşulları altında büyüme kültüründeki *P. pastoris* için büyüme grafiği. Metanol induksiyonu için zaman aralıkları ve ölçümleri tablo 2.1'e göre yapılmıştır. Toplam zaman 99 saattir. EDTA'nın eklenmesi son hücre yoğunluğu ve yüksek büyüme oranının yakalanmasında etkileyici bir faktör olarak görülmektedir. pH 6 için $OD_{600} = 13$ değeriyle deney 1'le benzerlik göstermektedir. pH 4 ve 5 için, hücre yoğunluğu biraz daha yüksek ölçülmüştür ($OD_{600} = 15$ ve 18). Bu deneydeki her bir pH deneyi bir örnek ile temsil edilmektedir. Böylece deney 5 (şekil 2.10 ve 2.11) bu deney için bir pozitif kontrol niteliği taşımaktadır.

İlaveler (EDTA, BSA ve kazamino asit gibi), kültür deneyleri için önemli rol oynamaktadırlar. Dördüncü deney serisinde EDTA bir katkı olarak seçilmiştir. EDTA'nın belli enzimler için ve proteazlar için inhibisyon gösterebildiği bilinmektedir [103]. pH-değişiklikleri henüz proteaz aktivitelerinden dolayı etkileri net olarak gözlenememiştir.

EDTA'nın kullanımı (son konsantrasyon 10mM) krabrolin aktivitesi ve yüksek hücre yoğunluğu açısından düşünüldüğünde bu deneyde önemli bir gelişme göstermiştir. Hücre yoğunluğu pH 6 için OD_{600} 'de 13'e, pH 4 ve 5 için OD_{600} değerleri 15 ve 18'lere kadar yükselmiştir. Bu değerler genel olarak EDTA'nın kullanılmadığı deney 1,2 ve 3'e göre daha yüksektir. Bununla beraber ekspre olmuş protein dengesi ile karşılaştırıldığında önemli derecede hücre büyümesi üzerinde bir etki meydana çıkarmamıştır. Kayda değer krabrolin aktivitesi kültür için EDTA'nın kullanımı ile elde edilmiştir.

Minimal inhibisyon zonu salgılanmış proteinleri içeren solüsyonların en düşük hacmi için buraya kadar bir gelişme kaydedilememiştir. 0,143 mg/ μ L. için pH 6'da minimal zon 25 μ L.'de başlamış ve çap ise 10 mm. olarak kaydedilmiş, 0,286 mg/ μ L. için ise minimal zon 15 μ L.'de başlamış ve 11 mm. olarak ölçülmüştür. pH 5 için 0,143mg/ μ L. ve 0,286 mg/ μ L. konsantrasyonlarında sırasıyla minimal zon 20 μ L.'de 5 mm, 30 μ L.'de 8mm ve 15 μ L. minimal zon 4 mm. olarak ölçülmüştür.

pH 4 için örnek ölçümü yapılamamıştır. Hücre yoğunluğu ufak farklılıklar gösterirken (OD_{600} 15 ve 18) pH 5 ve 6 için büyük bir değişiklik minimal zon açısından bulunamamıştır.

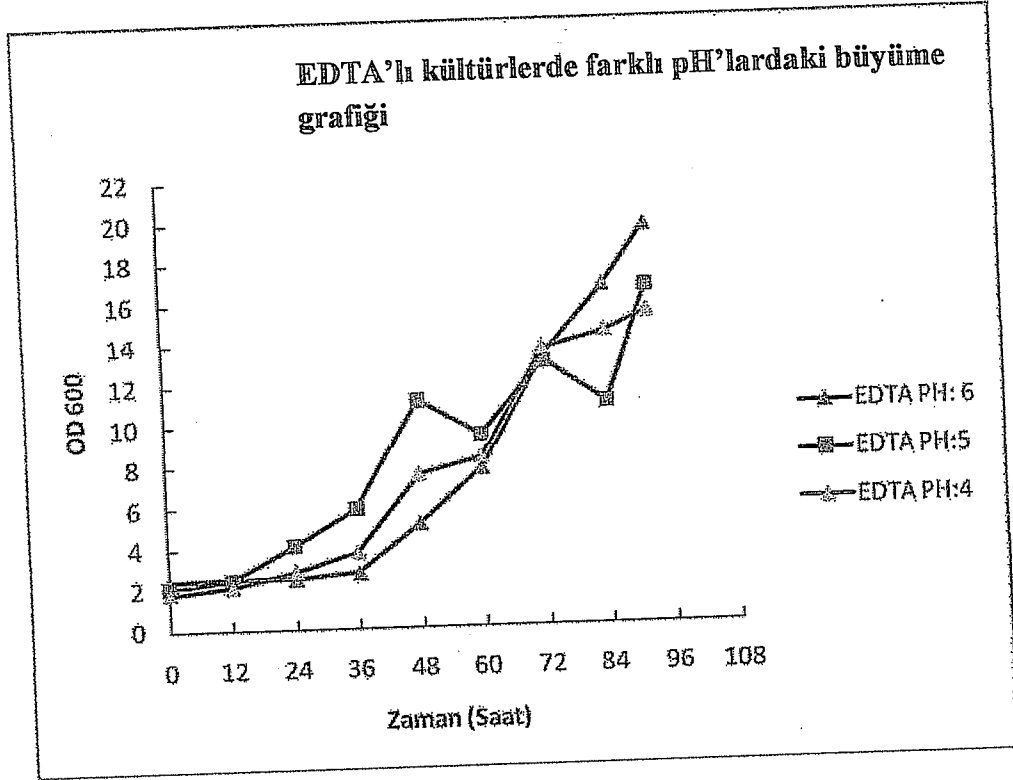
pH'nın hücre büyümesi üzerinde muhtemel bir etkisi olabilir fakat en öncelikle EDTA'nın kullanılmasıyla engelleyici aktivite elde edilmiştir. Set yüzeyli erlen kültürlerde deney 5'de araştırılmıştır.

3.6 Proteazların inhibisyonu için BSA'nın Denenmesi

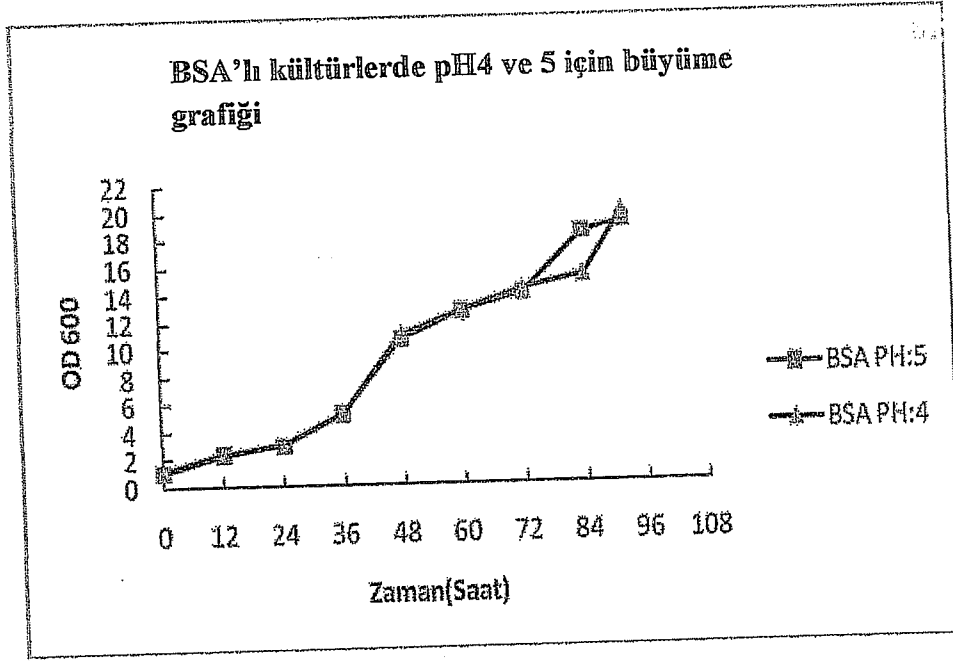
Deney 5'in amacı deney 4'de elde edilmiş sonuçların yeniden elde edilmesi ve optimizasyonudur. Bu deneyde pozitif sonuçların alınabilmesi için EDTA'dan farklı olarak BSA (sığır serum albümin) de kullanılmıştır. BSA'nın burada kullanılış amacı EDTA ile aynı olup proteazların aktivitesini inhibe etmektir. Bu deneyde 3 erlen EDTA için ve 2 erlen BSA için kullanılmış ve kültüre sokulmuştur.

Ek olarak zaman aralıkları ve metanol miktarı değiştirilmiş metanol indüklenme zamanı 12 saatte bir olarak sabitlenmiş ve her 12 saatte bir 1 mL. metanol kullanılmıştır. Dahası toplam zaman olan 99 saate ek olarak 72. saatte kültürlerden örnek alınmış ve bu iki zaman aralığında aktivite farkının olup olmadığı gözlenmeye çalışılmış, böylece ideal aktivite zamanının belirlenmesi amaçlanmıştır.

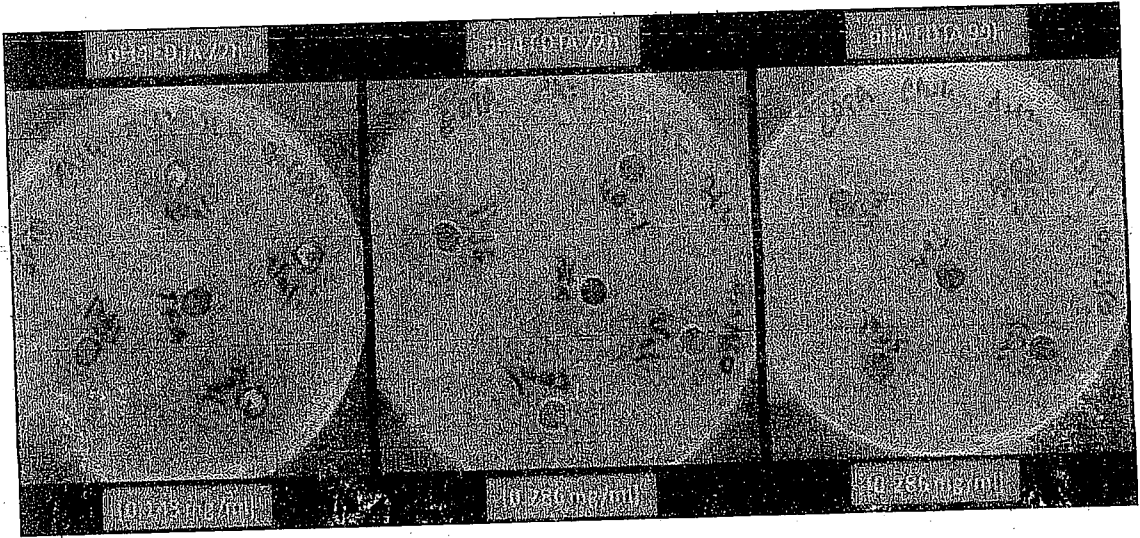
Aşağıdaki şekillerde EDTA ile pH 4, 5 ve 6 ile büyütülen kültürlerin ve BSA ile pH 4 ve 5'de büyütülen kültürlerin büyüme grafikleri verilmiştir.



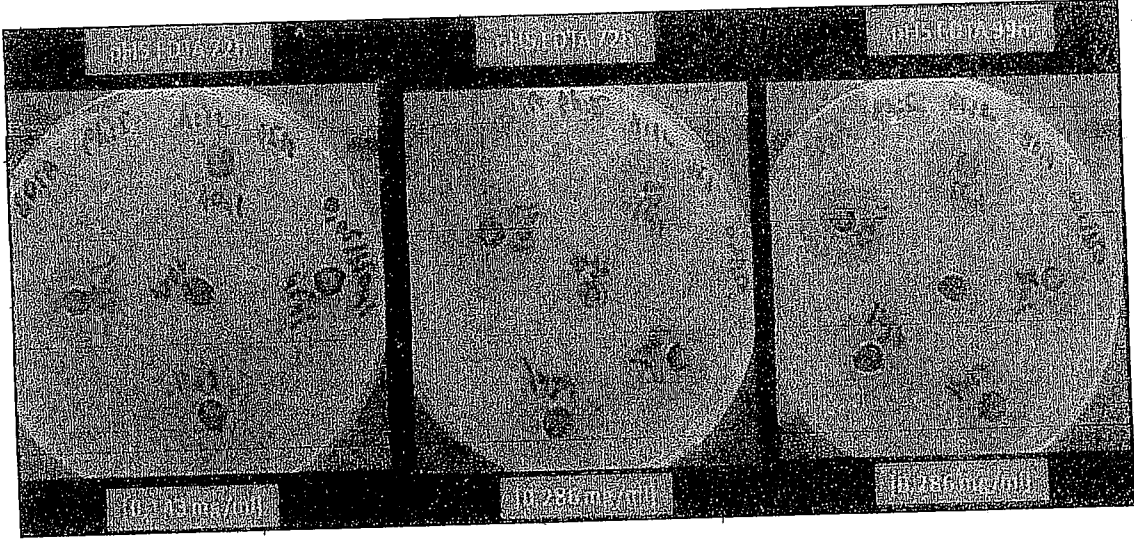
Şekil 3. 10 Medya katkısı olarak 10mM EDTA'nın kullanıldığı ve pH 4, 5 ve 6'da büyüyen *P. pastoris* kültürü için büyüme grafiği. Metanol indüksiyon zamanı ve metanol miktarı tablo2.1'den farklı olarak, her 12 saatte bir 1 mL metanol kültüre eklenmiştir. Kültür toplam 99 saat sonra toplanmış fakat 72. saatte kontrol için örnek alınmıştır. Deney 5'deki büyüme gidişatı deney 4'le yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Farklı pH koşulları altındaki kültürlerde yine önemli bir farklılık gözlenmemiştir.



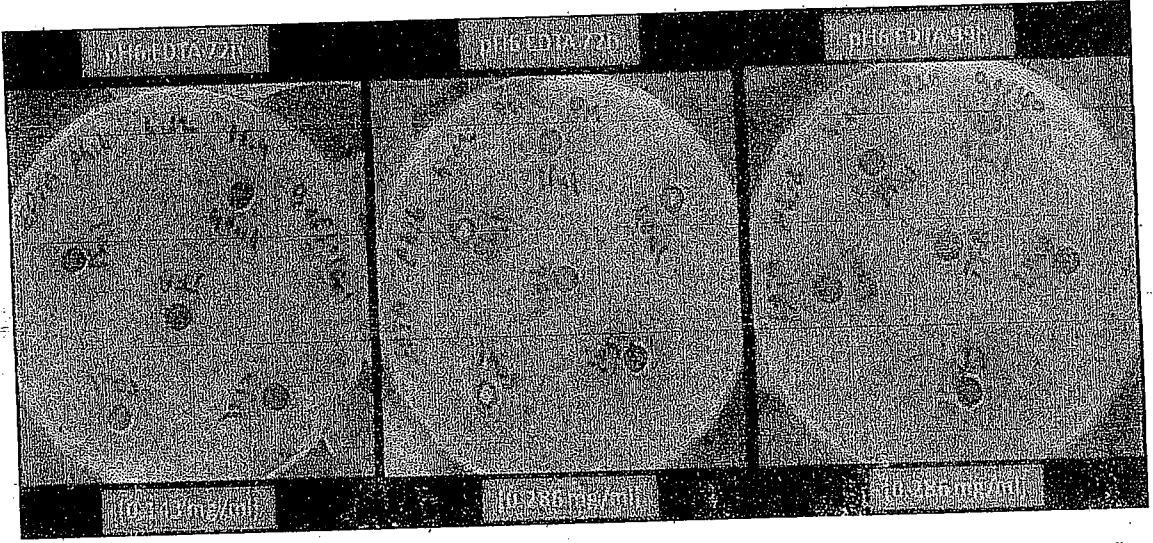
Şekil 3.11 Medya katkısı olarak %1 BSA katılmış ve pH 4 ve 5 de yetiştirilen *P. Pastoris* kültürünün büyüme grafiği. Metanol induksiyon zamanı ve toplama zamanı EDTA ile yapılan deney ile aynıdır (şekil 3.10). Burada hücre yoğunluğu BSA kullanılmayan çalışmalara göre biraz daha yüksek bulunmuştur fakat buna rağmen pH 4 ve 5 arasında kayda değer bir farklılık gözlenememiştir.



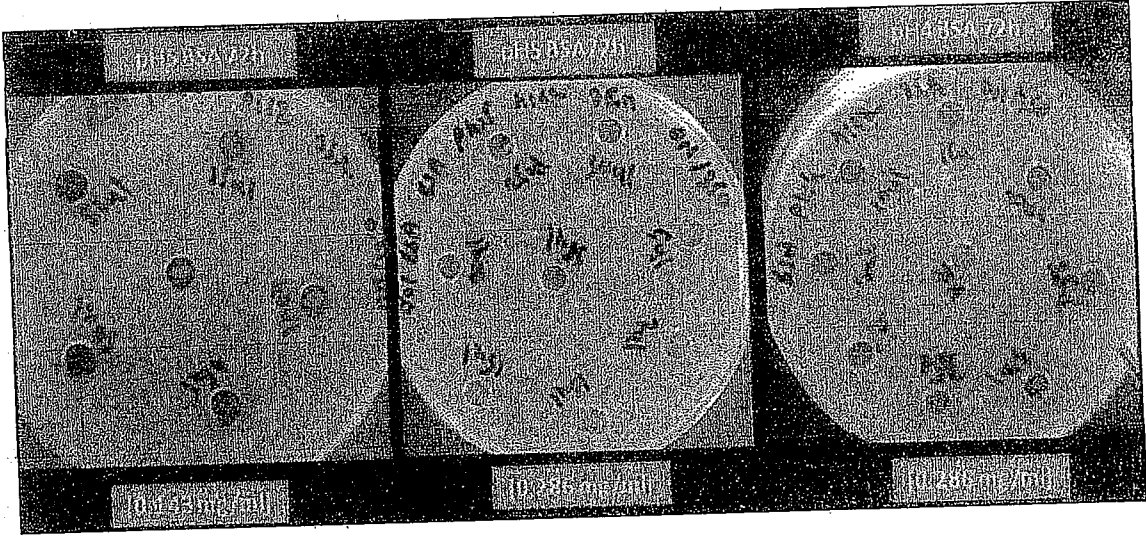
Şekil 3.12 pH4 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları. Yukarıdaki şekilde EDTA'lı kültürden pH 4 de büyütülmüş kültürden oluşan örneklerin gösterdikleri aktiviteler görülmektedir. Krabrolin içeren salgılanmış protein ile hazırlanmış protein çözeltisi 2 farklı konsantrasyonlarda ve farklı hacimlerde (20-55) petrilereki kayucuklara aktarılmıştır. Bunlar sırasıyla 0.143 (sol) ve 0.286 (orta) mg/ μ L ve aynı konsantrasyondaki 99 saat sonrasında alınan örnekten çıkan sonuç (sağ) büyük inhibisyon zonları 72 saat sonrasında elde edilmiş (1. ve 2. petri) ve bu sonuç 99 saat sonrasında alınan örneklerde (petri 3) devam etmiştir. Minimal zon 6 mm çap ile 20 μ L 0.143 mg / μ L'de başlarken 0.286 mg / μ L'de ise 5 mm çap ile 10 μ L'de başlamıştır. (burada resimler gösterilmemiştir)



Şekil 3.13 pH 5 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları. İki farklı konsantrasyonda protein solüsyonları petrilere aktarılmıştır; 0.143 mg / μ L (sol) ve 0.286 mg / μ L (orta ve sağ). Farklı hacimlerde (20-55 μ L) denenmiş ve petrilerin ortalarına negatif kontrol olarak 20 μ L %0,01 TFA solüsyonu kullanılmıştır. Büyük inhibisyon zonları, 72. saat sonra alınan örneklerde başlamış (petri 1 ve 2) ve 99. saat sonra alınan örneklerde (petri 3) de korunmuş ve minimal zon çapları sırasıyla 25 μ L için 10 mm 0.143 mg / μ L'de, 5 μ L için 5 mm 0.286 mg / μ L'de ölçülmüştür (resimler gösterilmemiştir).



Şekil 3.14 pH 6 için Deney 5'e ait sonuçlardan bazıları. Buradaki örneklerde 2 farklı konsantrasyonla 0.143 mg / μ L (sol) ,0.286 mg / μ L (orta ve sağ) ve farklı hacimlerle (20-55 μ L) temsil edilmektedir. Negatif kontrol olarak standart olarak kullanılan 20 (sol) %0.01 TFA petrilerin merkezindeki kuyucuklara konulmuştur. Diğer pH'larda olduğu gibi bu pH değeri içinde büyük inhibisyon zonları elde edilmiştir. Bu zonlar 99. saat için 50 (sol) de başlamış ve zon çapı 10 mm olarak 0.143 mg / μ L de, 0.286 mg / μ L konsantrasyonda ise 30 μ L'de 10 mm zon çapı ölçülmüştür (petri resimleri gösterilmemiştir).



Şekil 3.15 %1 BSA'lı kültürde büyütülmüş *P. pastoris*'den elde edilen krabrolin aktivitesinin tayini ve deney 5'e ait bazı sonuçlar. Bu resimler BSA'lı kültür ortamında farklı pH (pH4 ve pH 5) koşulları altında büyütülmüş kültürlerden elde edilen protein aktivitelerini göstermektedir. Bu deneyde de 2 farklı konsantrasyonda (0.143 ve 0.286 mg / μ L) ve farklı hacimlerle (20-55 μ L) çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak petrilerin merkez kuyucuklarına standart olarak kullanılan 20 μ L %0.01TFA solüsyonu aktarılmıştır. Büyük inhibisyon zonları bu deneyde de 72 saatte elde edilmiştir (99. saatte elde edilen örnekler laboratuvar çalışmaları sırasında kaybolmuştur). Minimal inhibisyon zonları 72 saat için pH 5'de 35 μ L için 6 mm 0.143 mg / μ L de (petri 1) ve 20 μ L 12 mm zon çapı 0.286 mg / μ L de (petri 2) ölçülmüştür. pH 4 için ise 0.143 mg / μ L de 30 μ L de 7 mm ve 0.286 mg / μ L için 20 μ L de 10 mm (petri 3) zon çapı ölçülmüştür.

Bu deney serisinde zaman aralıklarının 12 saate ayarlanması deney sürecinin kontrolünü kolaylaştırmış ve hata payını asgari düzeye indirmiştir. Yeni metanol induksiyon zamanından kaynaklanan herhangi bir dengesizlik gözlenmemiştir. Öte yandan deney 5 serisinde yüksek seviyede krabrolin aktivitesi elde edilmiştir. Buna ek olarak 72. saat noktası önceki değişmeyen ve standart olarak sürdürülen 99 saatlik deney süresine alternatif olması ve böylece deney süresinin azaltılması yönünde bir adım olarak düşünülmüş ve bu iki süre arasındaki değişimler izlenmeye ve yorumlanmaya çalışılmıştır. Bu deney için verilen özette olduğu gibi henüz metanol zamanının ve miktarının değişiminden kaynaklanan etkiler teyit edilmemiştir.

72. saatler için BSA ve EDTA kullanımından kaynaklanabilecek herhangi bir önemli farklılık gözlenmemiştir. Diğer yandan BSA'lı kültürde pH 5'de 0.143 mg / μ L.'de maksimum inhibisyon zonu 55 μ L.'de 8 mm olarak ölçülmüş,

EDTA'lı kültürde 40 µL.'deki inhibisyon zonu BSA'nın 55 µL.'de vermiş olduğu zon çapına eşitken 55 µL.'de 15 mm. olarak ölçülmüştür.

Minimal inhibisyon zonlarıyla alakalı olarak; 0.286 mg /µL. için 10mM EDTA'lı kültürden elde edilen protein solüsyonunun 40 µL.'si 13 mm inhibisyon zonu gösterirken BSA'lı kültürden elde edilen protein solüsyonundan alınan 20 µL. ise hemen hemen benzer ebatta 12mm inhibisyon zonu göstermiştir. 0.143 mg/µL.'de hemen hemen benzer çapta minimal inhibisyon zonları elde edilmiştir. Bu benzerlik 99 saatlik zaman noktasındaki örnekler içinde söylenebilir.

Farklı pH'ler ile ilgili olarak da söylenebilecekler ise; farklı pH koşulları altında bırakılan kültürlerde kayda değer bir farklılık gidişatı deney 4'de olduğu gibi gözlenememiştir. Krabrolin aktivitesi açısından en iyi sonuçlar pH 4'de EDTA'lı kültürden elde edilmiştir. Bu sebepten dolayı deney 6'da EDTA'nın kullanılması uygun görülmüştür.

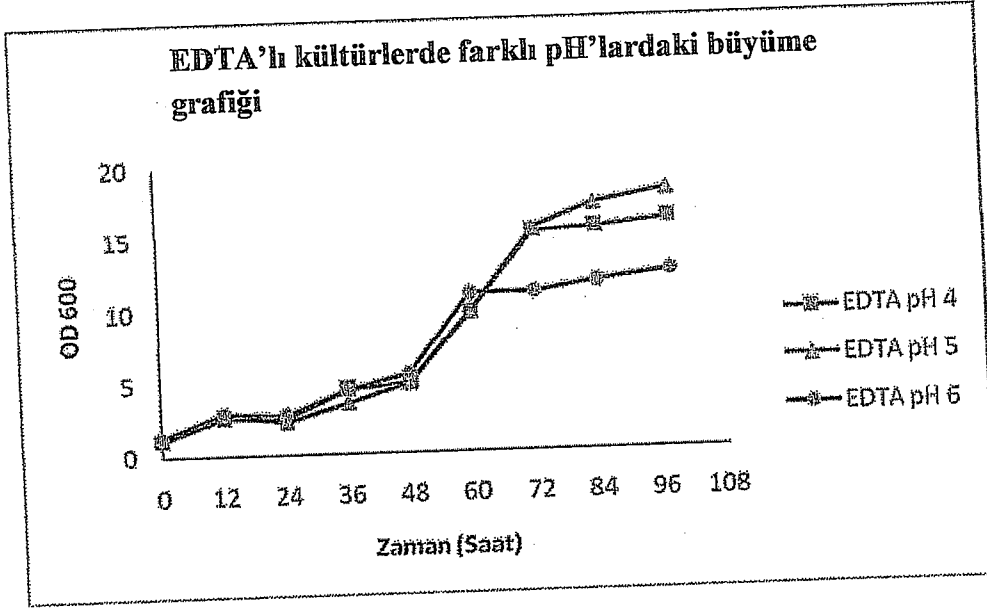
3.7 Havalandırmanın Arttırılması için Alüminyum Folyo Kullanılması

Deney 6 serisi, deney 5'deki pozitif sonuçlar için teyit edici ve genişletici olarak geliştirilmiştir.

10 mM EDTA ile kültürasyon ilk koşul olarak yeniden üretim için seçilmiş ve bir sonraki adım olarak %1 BSA'nın kullanımı planlanmıştır fakat deneyler için verilen sürenin yeterli olmayışından dolayı planlanan 7. deney yapılamamıştır.

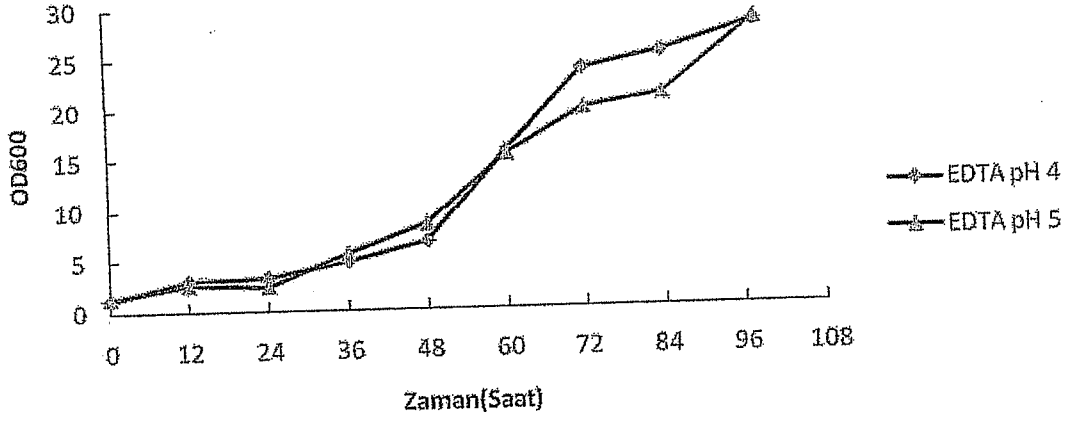
Bir önceki deneylerde kontrol edilen ve ayarlanan 10 mM EDTA'lı 5 adet çalkalamalı erlen kültür hazırlanmıştır. Bu deneyde, gaz alışverişinin arttırılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için deneylerde kullanılan su geçirmez tıpa

yerine alüminyum folyo ile erlenlerin üzeri kapatılmıştır. Hazırlanan 5 erlenin 3 tanesi bu etkinin görülebilmesi için alüminyum folyo ile diğer 2'si ise normal olarak kullanılan tıplarla kapatılmıştır.

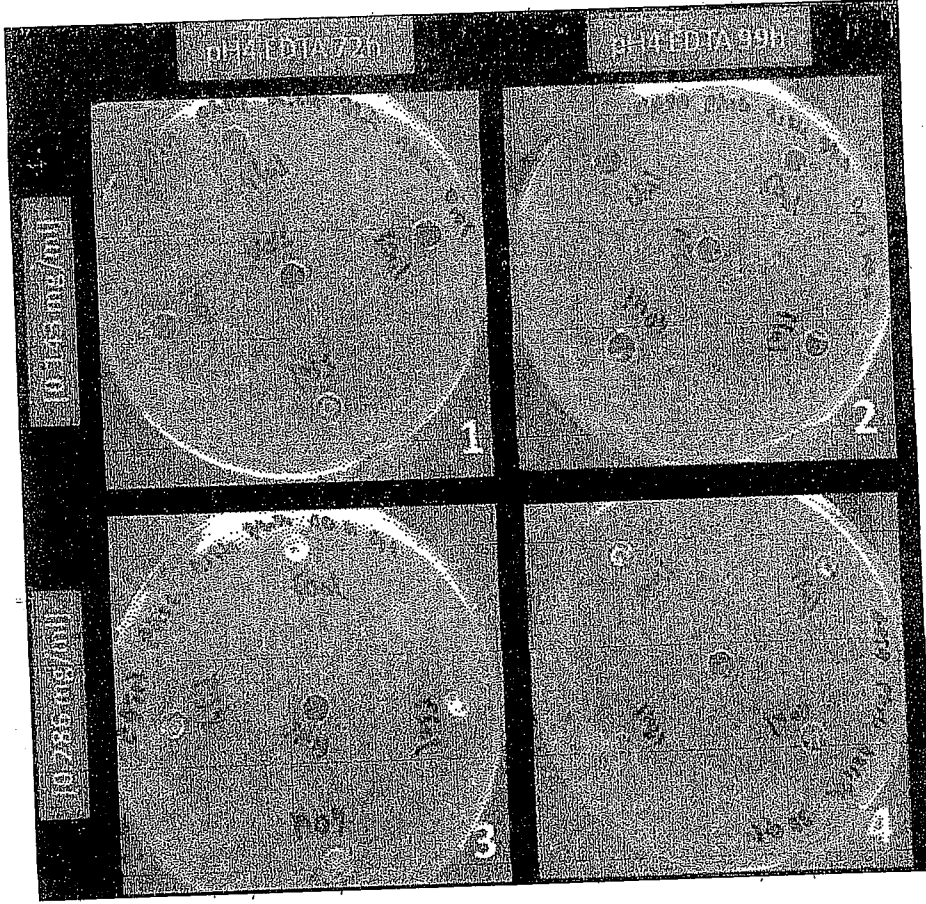


Şekil 3.16 10 mM EDTA'lı pH 4,5 ve 6 da büyütölm *P. pastoris* kültürleri için büyüme eğrileri. Metanol indüksiyonu her 12 saat için 1 mL olarak yapılmıştır. Büyüme gidişatı benzer koşulların olduğu noktalarda deney 5 ile uygunluk göstermiştir. Bütün pH koşulları altında yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmıştır (pH 4 için $OD_{600} = 16$, pH 5 için $OD_{600} = 18$ ve pH 6 için az bir düşüş ile $OD_{600} = 12$).

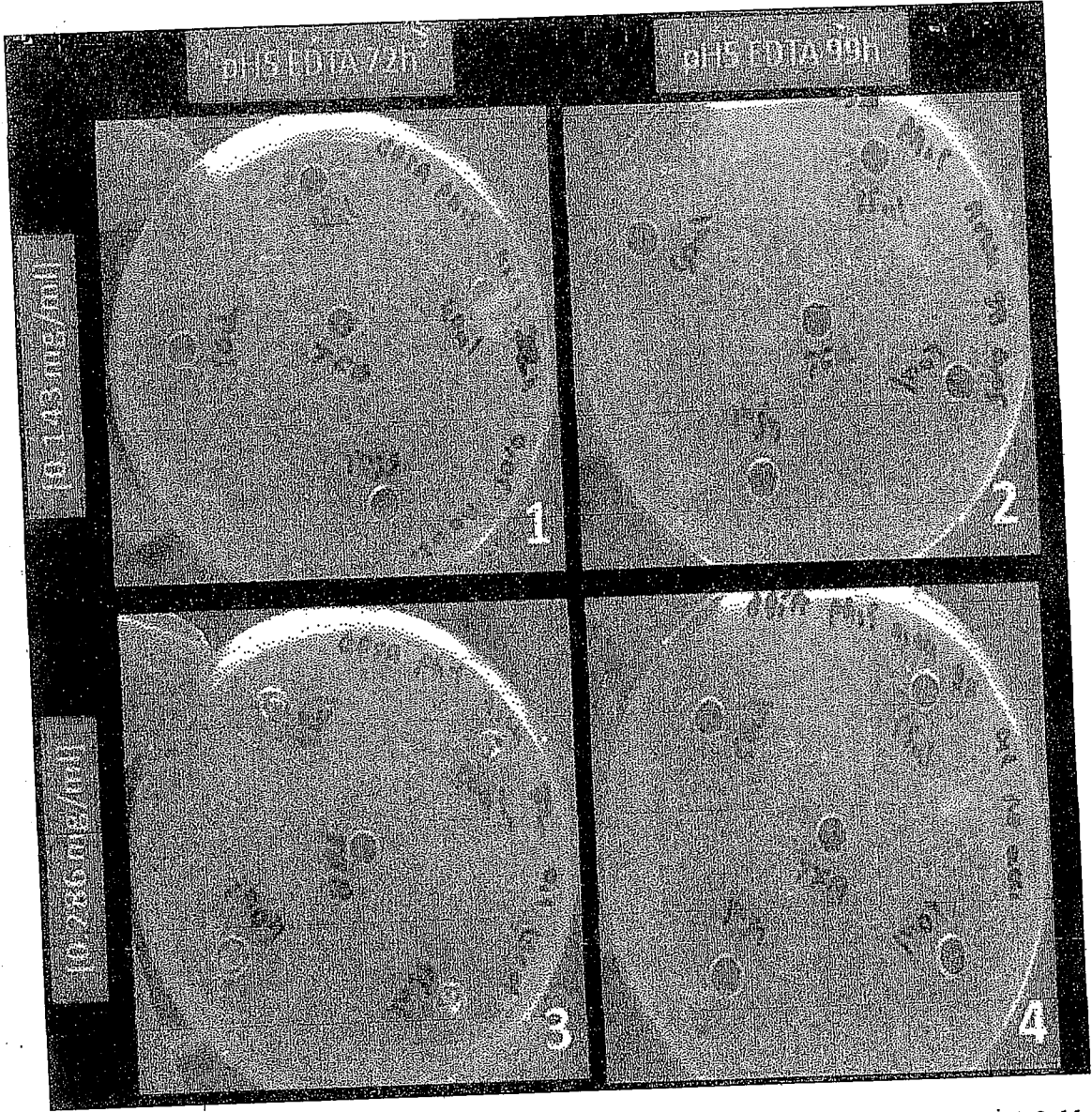
EDTA 'lı kültürlerde farklı pH'lardaki büyüme grafiği



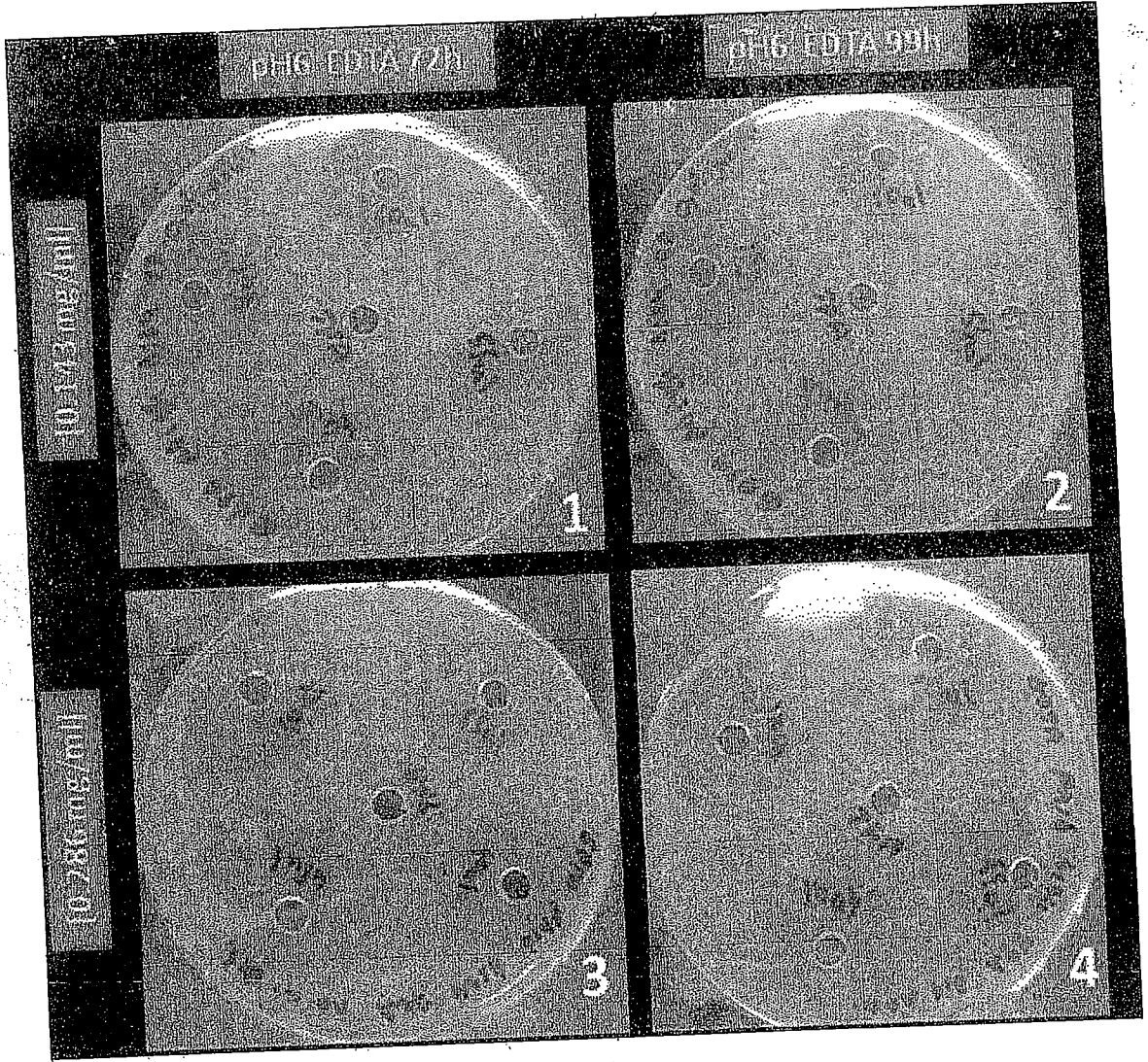
Şekil 3.17 Alüminyum folyo kullanılmış erlenlerde kültüre alınan *P. pastoris*'in büyüme eğrisi. Büyüme davranışı her iki kültür için önemli derecede fark göstermiş ve OD₆₀₀ değerleri 30'lara ulaşmıştır.



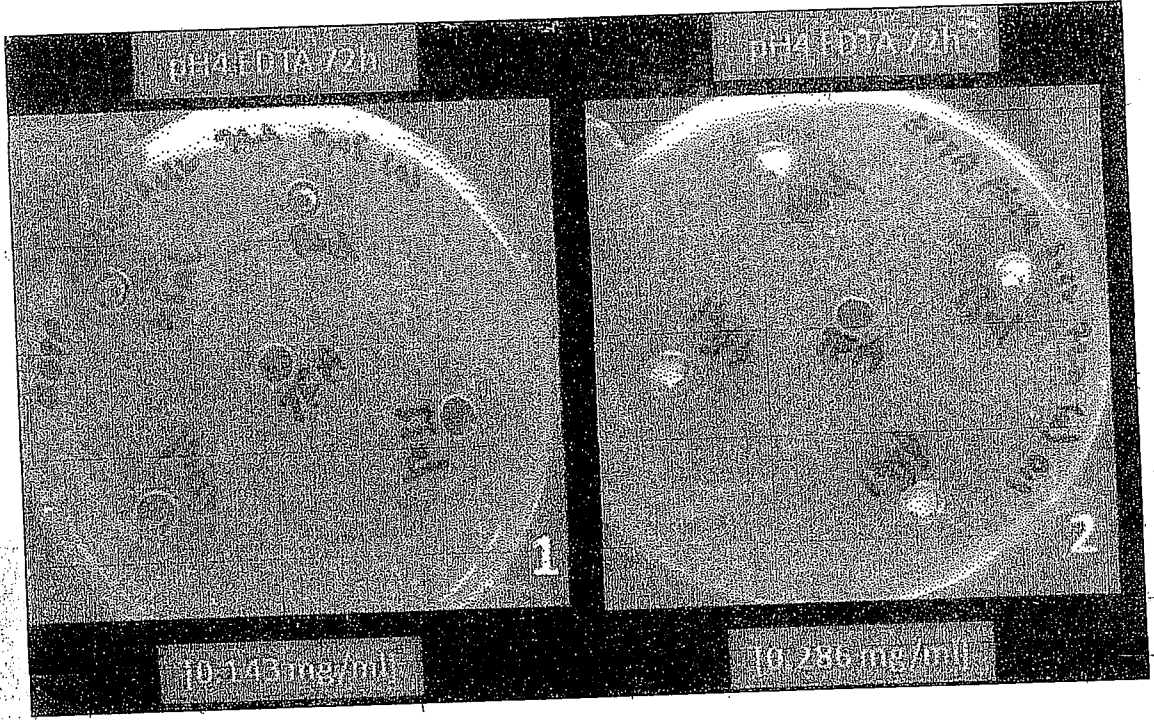
Şekil 3.18 Deney 6'dan pH 4 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları. İki farklı konsantrasyonda bu deney gerçekleştirilmiş ve yine farklı hacimlerle (5–55 μL) aktivite gözlemlenmiştir. Yukarıda bu deneyden elde edilen sonuçların bazıları gösterilmiştir. 0.143 mg / μL (1 ve 2) ve 0.286 mg / μL (3 ve 4) şekilde gösterilen petrilerdeki kuyulara 30–55 μL arasında hacim de protein solüsyonu uygulanmıştır. Petri merkezlerine %0.01TFA uygulanmıştır. Minimal inhibisyon zonları tablo 3.1'de gösterilmiştir. Burada 72. ve 99. saatlerdeki maximum inhibisyon zonları gösterilmiştir.



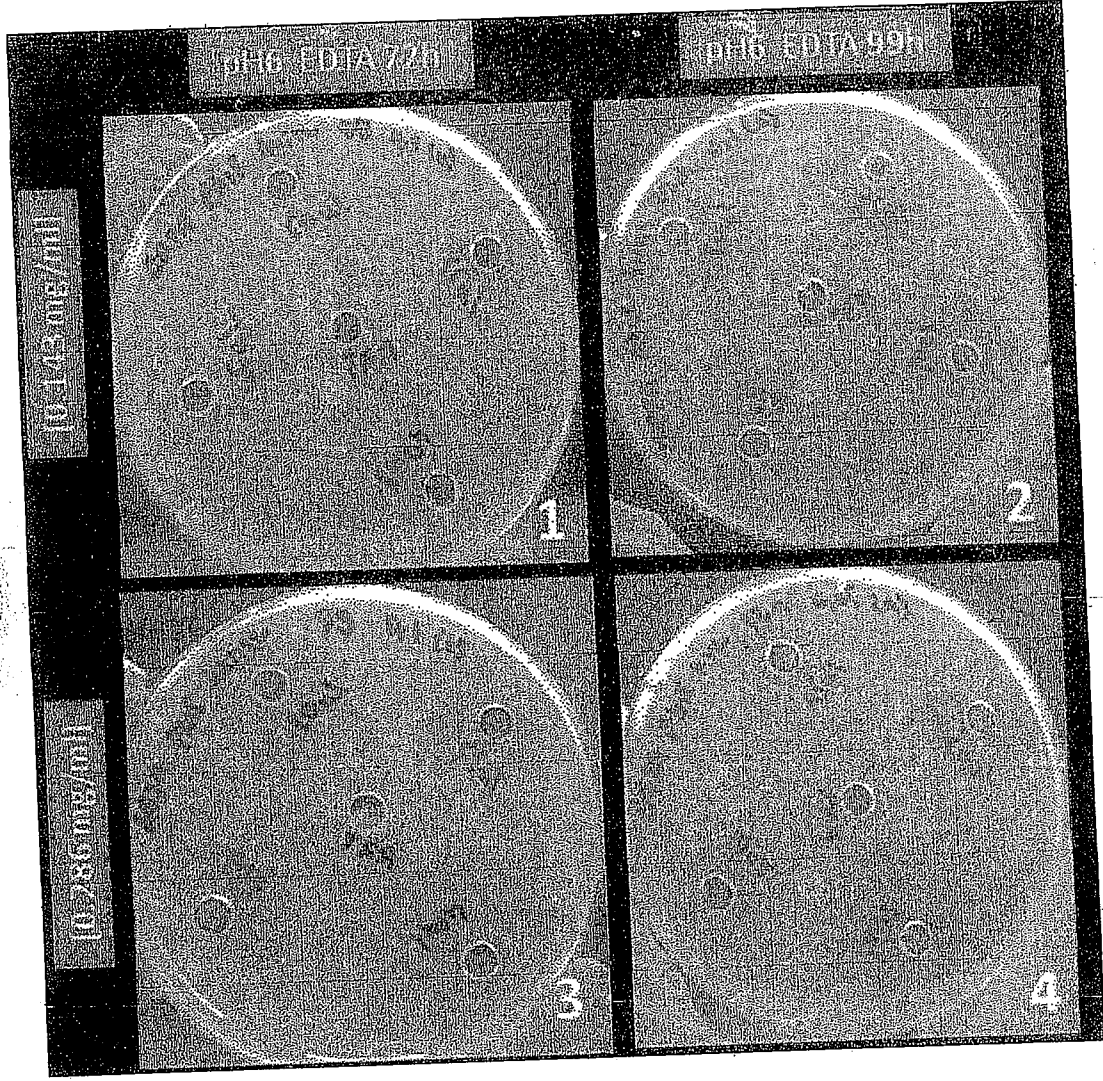
Şekil 3.19 Deney 6'dan pH 5 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları. İki farklı konsantrasyonda bu deney gerçekleştirilmiş ve yine farklı hacimlerle (5–55 μL) aktivite gözlemlenmiştir. Yukarıda bu deneyden elde edilen sonuçların bazıları gösterilmiştir. 0.143 mg / μL (1 ve 2) ve 0.286 mg / μL (3 ve 4) şekilde gösterilen petrilerdeki kuyulara 30–55 μL arasında hacim de protein solüsyonu uygulanmıştır. Petri merkezlerine %0.01TFA uygulanmıştır. Minimal inhibisyon zonları tablo 3.1'de gösterilmiştir. Burada 72. ve 99. saatlerdeki maximum inhibisyon zonları gösterilmiştir.



Şekil 3. 20 Deney 6'dan pH6 için seçilen bazı petrilerin krabrolin aktivite sonuçları. İki farklı konsantrasyonda bu deney gerçekleştirilmiş ve yine farklı hacimlerle (5-55 μL) aktivite gözlemlenmiştir. Yukarıda bu deneyden elde edilen sonuçların bazıları gösterilmiştir. 0.143 mg / μL (1 ve 2) ve 0.286 mg / μL (3 ve 4) şekilde gösterilen petrilerdeki kuyulara 30-55 μL arasında hacim de protein solüsyonu uygulanmıştır. Petri merkezlerine %0.01TFA uygulanmıştır. Minimal inhibisyon zonları tablo 3.1'de gösterilmiştir. Burada 72. ve 99. saatlerdeki maximum inhibisyon zonları gösterilmiştir. pH 6 için EDTA'lı kültürde elde edilen sonuçlar incelenen koşullar ve parametreler ile ulaşılmış en büyük aktiviteledir.



Şekil 3. 21 Deney 6'dan seçilen 2 petrinin krabrolin aktivitesi. Kültürler, 10 mM EDTA kullanılarak pH 4 de büyütülmüştür. Protein solüsyonları 2 farklı konsantrasyonda hazırlanmış ve değişik hacimlerde petrilere uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak petrilerin merkez kuyucuklarına 20 µL %0.01 TFA kullanılmıştır. Minimal inhibisyon zonları tablo 3.1 de gösterilmiştir. Yukarıdaki resimlerde ise 72. saat için maximum inhibisyon zonları görülmektedir.



Şekil 3.22 Deney 6'dan seçilen bazı örneklerin krabrolin aktivitesi. Kùltürler, 10 mM EDTA kullanarak pH 6'da büyütülmüştür. Ayrıca havalandırmayı arttırmak düşüncesiyle tıpa yerine alüminyum folyo kullanılmıştır. Protein solüsyonları 2 farklı konsantrasyonda hazırlanmış ve değişik hacimlerde petrilere uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak petrilerin merkez kıyucuklarına 20 µL %0.01 TFA kullanılmıştır. Minimal inhibisyon zonları tablo 3.1'de gösterilmiştir. Yukarıdaki resimlerde ise 72 ve 99. saatler için maximum inhibisyon zonları görölmektedir.

Tablo 3.1 Deney sonuçlarının genel bir görünümünü. Bu tablo deney 1-6'ya ait parametreleri ve uygulanmasına başvuru koşulları (ilk sıra) göstermektedir. Krabrolin aktivitesi (son kolon) minimal ve maximum inhibisyon zonu esas alınarak tahmin edilmiştir (maximum inhibisyon zonları tablo içinde gösterilmemiş ve her bir deney için tanımlanmamıştır. En yüksek krabrolin aktivitesi 6.1, 6.2, 6.4 ve 6.5 numaralı deneylerde gözlemlenmiştir ve bu deneylerde 10 mM EDTA ve 100 mM tampon kullanılmıştır.

Deney No.	Melanin İncikelyon zamanı	pH (Tampon)	Katkılar	İncikelyon Zamanı (h)	Toplama Zamanı (h)	Hücre Yoğunluğu (OD600)	Minimal İnhibisyon Zon Çapı (0.280mg/ml)	Minimal İnhibisyon Zon Çapı (0.280mg/ml)	Aktivite
2.1	Tablo	pH 5 (1M asetat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
2.2	Tablo	pH 5 (1M asetat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
2.3	Tablo	pH 4 (1M asetat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
2.4	Tablo	pH 5 (1M asetat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
3.1	Tablo	pH 6 (100 mM fosfat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
3.2	Tablo	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)		99 h	99 h	11	zon yok	zon yok	
3.3	Tablo	pH 4 (100 mM asetat tamponu)		99 h	99 h	9	zon yok	zon yok	
4.1	Tablo	pH 6 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	99 h	99 h	15	25µl 2mm	45µl 2mm	↑
4.2	Tablo	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	99 h	99 h	18	20µl 5mm 30µl 8mm	15µl 4mm	↑↑
5.1	Tablo	pH 5 (100 mM asetat tamponu)	EDTA	99 h	99 h	15	40µl 5mm	40µl 5mm	
5.2	12 h	pH 6 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	13 19	20µl 5mm (72h) 50µl 10mm (99h)	10µl 2mm (72h) 30µl 10mm (99h)	↑↑
5.3	12 h	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	17 16	40µl 6mm (72h) 25µl 10mm (99h)	40µl 13mm (72h) 45µl 5mm (99h)	↑↑
5.4	12 h	pH 4 (100 mM asetat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	15 15	40µl 15mm (72h) 20µl 6mm (99h)	15µl 5mm (72h) 10µl 5mm (99h)	↑↑↑
5.5	12 h	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	BSA	72 h 99 h	72 h 99 h	23 19	35µl 6mm (72h)	20µl 22mm (72h)	↑↑↑
5.6	12 h	pH 4 (100 mM asetat tamponu)	BSA	72 h 99 h	72 h 99 h	13 20	30µl 7mm (72h)	20µl 10mm (72h)	↑↑
6.1	24 h	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	11 17	5µl 5mm (72h) 5µl 4mm (99h)	5µl 10mm (72h) 3µl 15mm (99h)	↑↑↑
6.2	24 h	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	15 18	40µl 10mm (72h) 40µl 18mm (99h)	35µl 20mm (72h) 25µl 4mm (99h)	↑↑↑
6.3	24 h	pH 4 (100 mM asetat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	15 16	40µl 2mm (72h) 45µl 3mm (99h)	45µl 1mm (72h) 40µl 1mm (99h)	↑↑↑
6.4	12 h	pH 5 (100 mM fosfat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	20 28	5µl 20mm (72h) 5µl 4mm (99h)	15µl 6mm (72h) 15µl 3mm (99h)	↑↑↑
6.5	12 h	pH 5 (100 mM asetat tamponu)	EDTA	72 h 99 h	72 h 99 h	25 29	25µl 20mm (72h)	10µl 2mm (72h)	↑↑↑

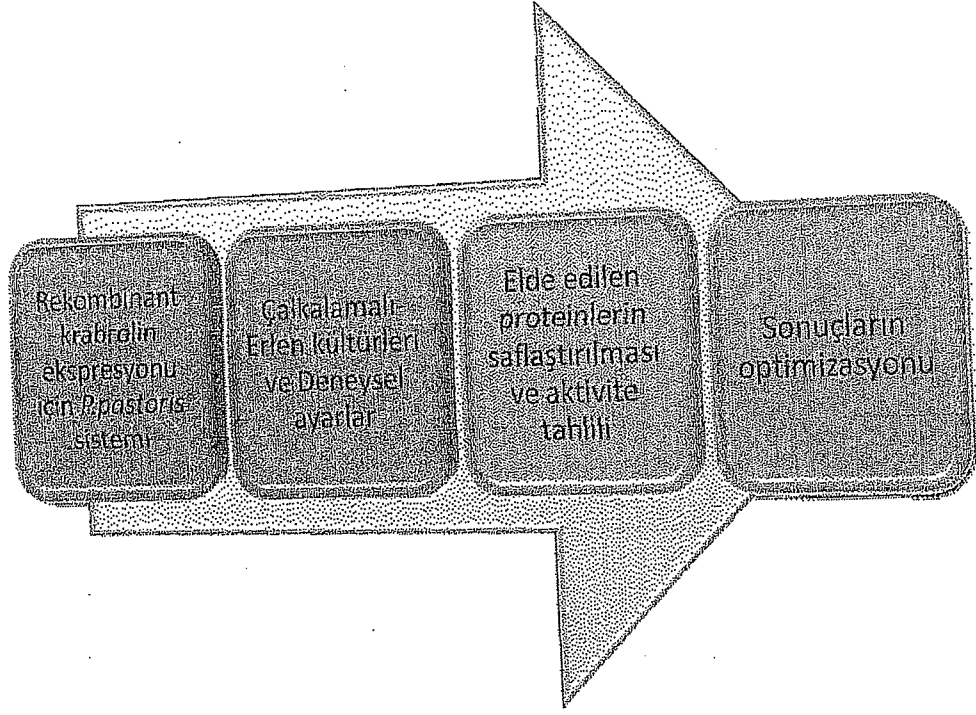
4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan bu çalışma çalkalamalı kültür sisteminde *P. pastoris* kullanarak rekombinant krabrolin ekspresyonunun optimizasyonunun araştırılması üzerinedir. Krabrolin, son yıllarda keşfedilen ve büyük bir tedavi potansiyeline sahip molekül gurubu olan AMP'lerin bir üyesidir. AMP'ler konukçu bağışıklık savunmasında önemli rol oynayan ve çoğu organizmanın savunma sisteminin bir parçasıdır. Geleneksel antibiyotiklere rağmen AMP'lere karşı direnç, birkaç mikroorganizma türünde bulunan doğal direnci saymazsak şimdiye kadar gözlenememiştir.

AMP'lerin kimyasal sentezi mümkündür bu yüzden geniş ölçekteki üretimler için faydasız ve nispeten pahalı olmaktadır. Bu nedenden ötürü ökaryotik sistemler, rekombinant AMP'lerin üretimi için uygun alternatif bir sistem olarak düşünülmektedir. Ökaryotik sistemler, AMP'lerin sitotoksik etkilerinden etkilenen ve post transkripsiyonel gerekleri yeterince karşılayamayan *E.coli* gibi bakteriyel sistemlere göre de çok avantajlıdır. Birçok uygulamada kullanılmış ve rekombinant protein üretiminin başarılı olduğu ökaryotik sistemlerden biri de *P. pastoris*'dir. Bu yüzden bu çalışmada, rekombinant krabrolin ekspresyonunun optimizasyonu için umut verici bir aday olan pPICZ α -A krabrolin ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş *P. pastoris* x-33 suşu kullanılmıştır.

İlaç gelişimi üzerine devam eden çalışmaların veya AMP'lerin hareket mekanizması yanında bu projede onların üretim süreçleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Bunun için en uygun krabrolin ekspresyonu, yüksek oranda krabrolin miktarı ve aktivitesinin eldesi için uygun koşullar ve ilgili süreç parametreleri üzerinde araştırma yapmak için bir seri kontrol deneyleri tasarlanmış ve analiz edilmiştir. Sonuçlar bir üst üretim sistemleri için işe yarar olabilir.



Şekil 4.1 *P. pastoris* (x-33)'de rekombinant krabrolin ekspresyonunun optimizasyonu için deneysel dizaynın şematik sunumu.

Önceden tanımlandığı gibi her bir ekspresyon sistemi için ve yeni rekombinant proteinlerin fermantasyon ve ekspresyonu için süreç ile ilgili parametreler ve koşullar ayrı ayrı ayarlanmış ve araştırılmış olmalıdır. Krabrolinin ekspresyonu için parametreler önceki çalışmalar ve literatürden türetilmiş ve daha önceden sunulmuş işlemlerin (şekil 1-22) optimize edilmesi ve geliştirilmesi için onların potansiyelleri deneysel çalışmalarla ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Optimizasyon için seçilen parametreler, sıcaklık, pH, havalandırma, erlen türü, metanol miktarı ve zamanı, farklı deney zamanı (72 ve 99 saat gibi) ve ayrıca EDTA, BSA gibi kültür için katkı maddeleridir.

Medya türü, sıcaklık, kültür hacmi, *P. pastoris* suşu ve deneysel süreç tüm deneyler boyunca baştan sona kadar değişmeden kullanılmıştır. Bunun yanında pH, havalandırma, metanol miktarı ve zamanı, medya katkısı ve toplama zamanı gibi parametreler, *P. pastoris*'in miktarını ve büyüme hızının ve krabrolin aktivite ve miktarının artırılması için, bu parametrelerin potansiyelleri değerlendirilmiş ve bazı değişimlerle deneyin gidişatı kontrol edilmeye çalışılmıştır. Deneyler süresince elde edilen krabrolin aktivitelerinden farz edilebilir ki fonksiyonel protein ekspre edilmiştir.

1. Deney belirli parametreler yer değiştirildiği zaman oluşacak etkinin araştırılması ve değerlendirilmesinde temel koşullar için bir dayanak noktası olması, ve optimum deneysel koşulların araştırılması için bir başlangıç noktası olarak tasarlanmış ve iş görmüştür. Bu etkiler, *P. pastoris*'in kültür davranışının değerlendirilmesi ve krabrolin aktivite miktarı ile tanımlanmıştır. 1. Deney'deki temel koşullarda *P. pastoris* yoğunluğu normal fakat krabrolin aktivitesi deney 5 ve 6'ya nispeten düşük çıkmıştır. Bu sonuçlar rekombinant krabrolin aktivitesini arttırmak için bir potansiyel olarak düşünülmüştür. Bunun yanında takip eden deneylerde de krabrolin aktivitesi elde edilen proteinlerin içindeki krabrolin miktarı için bir referans noktası olabilir.

İkinci deney serisi daha önceden bahsedildiği gibi ilkin pH'nın değiştirilmesi ile bu deneydeki tüm kültürlerde çok düşük hücre yoğunluğu ve krabrolin aktivitesinin olmayışı ile özetlenmiştir. Daha sonradan bu durumun kullanılan yüksek konsantrasyondaki (1M) tampondan dolayı medyada yüksek oranda tuzluluğa neden olduğu bunun da büyümeyi inhibe ettiği düşünülmüştür. Bu varsayım elde edilen ve tuz benzeri kristallerin olduğu protein tozunun, diğer deney 1'de elde edilen toza göre farklı olan görünüşünden kaynaklanmaktaydı. pH'nın dengede tutulması bu sonuçlarla direk bağlantılı olmamıştır. Diğer çalışmalardaki protein ekspresyonu üzerindeki pozitif etkilerinden dolayı bir optimizasyon parametresi olarak korunmuştur.

Deney serisi 2'den sonuç alınmaması ve bu durumun kullanılan yüksek konsantrasyondaki tampona bağlanmasından dolayı bu durumu teyit etmek için 3.

deney dizayn edilmiş ve bu deneyde bu sefer 100 mM'lık fosfat ve asetat tamponları pH 4, 5 ve 6'yı elde etmek için kullanılmıştır. Daha önce düzenli olarak kullanılan erlen türünde değiştirilerek kenarlarında tümsek bulunan erlen türleri kullanılmaya başlanarak havalandırmanın artırılması da amaçlanmıştır. Krabrolin aktivitesi için alınan bu kararlara rağmen deney 1'de elde edilen temel seviyedeki aktivite bile elde edilemezken hücre yoğunluğunda ufak bir artış gözlemlenmiştir. Bununla beraber bu durum için bir açıklama bulunamamıştır ve tüm bu deneylerde krabrolin aktivitesini etkileyecek proteazlar gibi başka faktörlerin aktiviteyi etkiliyor olabileceği düşünülmektedir.

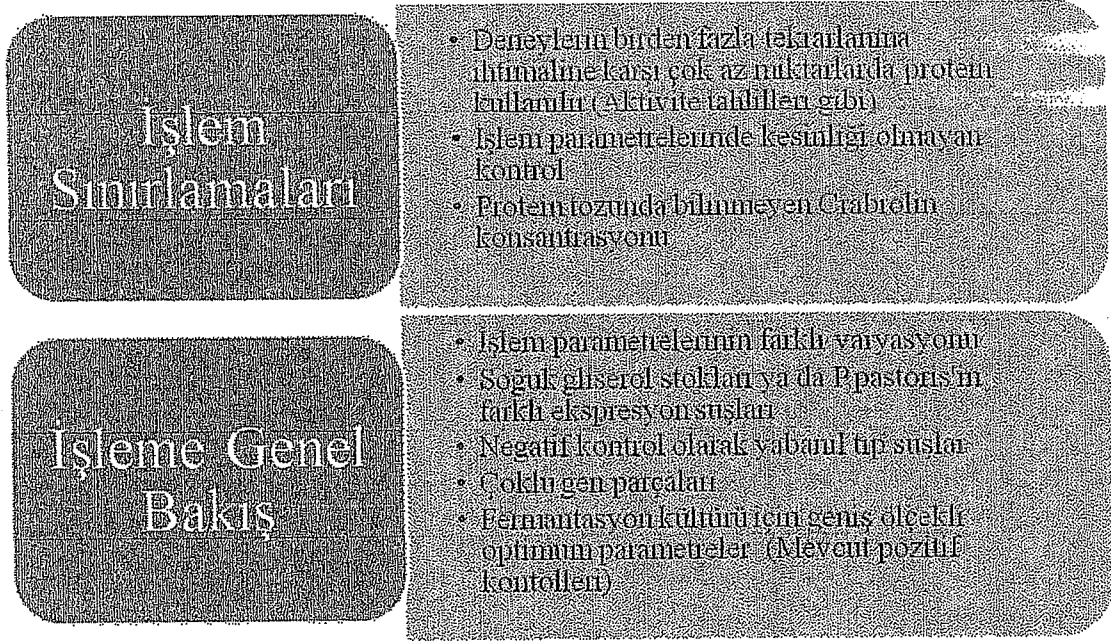
Proteaz aktivitesini kontrol etmek için kültüre deney 4'ten itibaren 10 mM EDTA, deney 5'ten itibaren de %1 BSA kullanılmaya başlanmıştır. Proteazların inhibisyonunun krabrolinin kararlılığını arttıracakı düşünölmüştür. Tüm deneyler boyunca kullanılan parametreler hücre büyümesi üzerinde hiç kayda değer bir etki yapmamış fakat deney 4 ve 5'de krabrolin aktivitesini büyük oranda arttırdığı bulunmuştu. 10 mM EDTA ile çalışılan deneyler ayrıca kullanılmayan deneylere göre hücre yoğunluğu açısından daha yüksekti. Krabrolin aktivitesi üzerindeki etki görünmüş ve deney 4'de elde edilen inhibisyon zonları tüm deneylerle karşılaştırılmıştır.

Deney 4'deki krabrolin aktivitesinin pozitif sonuçlardan dolayı deney 5'te de uzatılmış, yeni bir değişiklik bu deney için denenerek metanol indüksiyon zamanları homojonize edilmiştir. Bu uygulamanın krabrolin aktivitesi ve hücre yoğunluğu üzerine güçlü bir etkisi bulunmuştur. EDTA ve BSA'nın etkisini karşılaştırmak için 3 erlen EDTA için 2 erlen BSA için kültüre alınmıştır. BSA ile yapılan kültürlerde krabrolin aktivitesi biraz daha düşük çıkmıştır.

Deney 6 serisinde deney 5'deki sonuçların devarında teyit için parametrelerde değişiklik yapılmamış fakat gaz değişimini arttıracakı düşüncesi ile alüminyum folyo kullanılmıştır. Bu kullanım hücre yoğunluğu üzerinde güçlü bir etki oluşturmuştur. Bununla beraber şimdiye kadar kültürlerden alınan aktiviteler içinde pH 4 ve 5 için bu deneyde yüksek pH 6 için en yüksek değere ulaşılmıştır. pH'nın bu varyasyonları göstermektedir ki pH'nın tek başına krabrolin aktivitesi

üzerinde görülen önemli bir etkisi bulunmamaktadır. Fakat EDTA'nın kullanımı ile proteazların inhibisyonu (farz edilmekte) [103] ile beraber aktivitenin etkisini arttırmaktadır. Aşağıdaki şekilde daha sonradan yapılabilecek optimizasyon çalışmaları verilmeye çalışılmıştır.

Bununla beraber unutulmamalıdır ki bir kültür sisteminden elde edilen sonuçlar, optimizasyon koşulları bir üst seviyedeki kültür sistemleri için kullanımı



Şekil 4.2 Sürecin kısıtlamaları ve dizayn ile bağlantılı perspektifler ile genel laboratuvar prosedürleri

mümkün olmamakta, yeniden optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada amaçlanan sadece geniş çaplı kültür çalışmalarında kullanabilecek parametrelerin tespiti ve etkileri üzerin ufak bir bilgi sahibi olmak ve incelenen krabrolin proteininin mevcut potansiyelini, biraz olsun göz önüne serebilmektir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Lohner, K., "Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies", *Horizon Scientific Press*: (2001).
- [2] Blondelle, S.E. ve Lohner, K., "Combinatorial Libraries: A Tool to Design Antimicrobial and Antifungal Peptide Analogues Having Lytic Specificities for Structure-Activity Relationship Studies", *Peptide Science*, **55**(1): 74-87 (2000).
- [3] Breithaupt, H., "The New Antibiotics", *Nat Biotech*, **17**(12): 1165-1169 (1999).
- [4] Orsolya, T., "~~Antimicrobial Peptides: New Candidates in the Fight against~~ Bacterial Infections", *Peptide Science*, **80**(6): 717-735 (2005).
- [5] Gudmundsson, G.H. ve Agerberth, B., Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *Journal of Immunological Methods*, **232**: 45-54 (1999)
- [6] Hancock, R.E.W., "Cationic Peptides: Effectors in Innate Immunity and Novel Antimicrobials", *The Lancet Infectious Diseases*, **1**(3): 156-164 (2001).

- [7] Peschel, A. ve Sahl, H.-G., "The Co-Evolution of Host Cationic Antimicrobial Peptides and Microbial Resistance", *Nat Rev Micro*, 4(7): 529-536 (2006).
- [8] Shai, Y., "Mechanism of the Binding, Insertion and Destabilization of Phospholipid Bilayer Membranes by Alfa-Helical Antimicrobial and Cell Non-Selective Membrane-Lytic Peptides.", (*BBA*) - *Biomembranes*, 1462: 55-70 (1999).
- [9] Dathe, M.a.T.W., "Structural Features of Helical Antimicrobial Peptides: Their Potential to Modulate Activity on Model Membranes and Biological Cells.", *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1462(1-2): 71-87 (1999).
- [10] Shai, Y., "Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides", *Biopolymers*, 66(4): 236-248 (2002).
- [11] Gregg, J.M., "Recombiant Protein Expression in Pichia Pastoris", *Molecular Biotechnology*, 16: 23-40 (2000).
- [12] Wilcox, S., "The New Antimicrobials:Cationic Peptides", *Bio Teach J*, 2: (2004).
- [13] Sarmaşık, A., "Antimicrobial Peptides: A Potential Therapeutic Alternative for the Treatment of Fish Diseases", *Turk J Biol.*, 26(4): 201-207 (2002).
- [14] Izadpanah, A. and Gallo, R.L., "Antimicrobial Peptides", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3): 381-390 (2005).
- [15] Miyakawa, Y., Ratnakar, P., Rao, A.G., Costello, M.L., Mathieu-Costello, O., Lehrer, R.I., ve Catanzaro, A., "In Vitro Activity of the Antimicrobial

Peptides Human and Rabbit Defensins and Porcine Leukocyte Protegrin against Mycobacterium Tuberculosis", *Infect. Immun.*, 64(3): 926-932 (1996).

- [16] Wilcox, S., "Cationic Peptides: A New Hope", *The Science Creative Quarterly.*: (2004).
- [17] Zasloff, M., "Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms", *Nature*, 415(6870): 389-395 (2002).
- [18] Hancock, R.E.W. ve Sahl, H.-G., "Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies", *Nat Biotech*, 24(12): 1551-1557 (2006).
- [19] Aboudy, Y., Mendelson, E., Shalit, I., Bessalle, R., and Fridkin, M "Activity of Two Synthetic Amphiphilic Peptides and Magainin-2 against Herpes Simplex Virus Types 1 and 2", *International Journal of Peptide and Protein Research*, 43(6): 573-582 (1994).
- [20] Vanesa, C.A.M. ve Viviana, C., "Antiviral Activity of Antimicrobial Cationic Peptides against Junin Virus and Herpes Simplex Virus", *International journal of antimicrobial agents*, 23(4): 382-389 (2004).
- [21] Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., Holle, R., Salmons, B., Erfle, V., ve Brack-Werner, R., "Antimicrobial Peptides Melittin and Cecropin Inhibit Replication of Human Immunodeficiency Virus 1 by Suppressing Viral Gene Expression", *J Gen Virol*, 79(4): 731-740 (1998).
- [22] Yasin, B., Pang, M., Turner, J. S., Cho, Y., Dinh, N-N., Waring, A. J., Lehrer, R. I., ve Wagar, E. A. "Evaluation of the Inactivation of Infectious Herpes Simplex Virus by Host-Defense Peptides ", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19: 187-194 (2000).

- [23] Cole, A.M., Hong, T., Bro, L.M., Nguyen, T., Zhao, C., Bristol, G., Zack, J.A., Waring, A.J., Yang, O.O., ve Lehrer, R.I., "Retrocyclin: A Primate Peptide That Protects Cells from Infection by T- and M-Tropic Strains of Hiv-1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(4): 1813-1818 (2002).
- [24] Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A.J., Herold, B.C., Wagar, E.A., ve Lehrer, R.I., "{Theta} Defensins Protect Cells from Infection by Herpes Simplex Virus by Inhibiting Viral Adhesion and Entry", *J. Virol.*, **78**(10): 5147-5156 (2004).
- [25] Bastian, A., ve H. Schafer, "Human Alpha-Defensin 1 (Hnp-1) Inhibits Adenoviral Infection in Vitro", *Regul. Pept.*, **101**: 157-161 (2001).
- [26] Daher, K.A., Selsted, M.E., ve Lehrer, R.I., "Direct Inactivation of Viruses by Human Granulocyte Defensins", *J. Virol.*, **60**(3): 1068-1074 (1986).
- [27] Gropp, R., Frye, M., Wagner, T.O.F., ve Bargon, J., "Epithelial Defensins Impair Adenoviral Infection: Implication for Adenovirus-Mediated Gene Therapy", *Human Gene Therapy*, **10**(6): 957-964 (1999).
- [28] Nakashima H., Y.N., Masuda M., Fujii N., "Defensins Inhibit Hiv Replication in Vitro", *AIDS*, **7**: 1128-1128 (1993).
- [29] Sinha, S., Cheshenko, N., Lehrer, R.I., ve Herold, B.C., "Np-1, a Rabbit {Alpha}-Defensin, Prevents the Entry and Intercellular Spread of Herpes Simplex Virus Type 2", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**(2): 494-500 (2003).
- [30] Belaid A., A.M., Khelifa R., Trabelsi A., Jemmali M., Hani K., "In Vitro Antiviral Activity of Dermaseptins against Herpes Simplex Virus Type 1", *ournal of medical virology*, **66**: 229-234 (2002).

- [31] Clarisse Lorina, H.S., Afifa Belaidc, Amira Zairic, Françoise Baleuxd, Hakim Hocinib, Laurent Bélecb, Khaled Hanic ve Frédéric Tangy, "The Antimicrobial Peptide Dermaseptin S4 Inhibits Hiv-1 Infectivity in Vitro.", *Virology*, **334**(2): 264-275 (2005).
- [32] Murakami, a.S.I., "Inhibitory Effect of Tachyplesin I on the Proliferation of Human Immunodeficiency Virus in Vitro.", *Chemotherapy (Basel)*, **37**: 206-211 (1991).
- [33] Murakami T, N.M., Tokunaga F, Miyata T, Iwanaga S., "Direct Virus Inactivation of Tachyplesin I and Its Isopeptides from Horseshoe Crab Hemocytes.", *chemotherapy*, **37**(5): 327-334 (1991).
- [34] Steinstraesser, L., Tippler, B., Mertens, J., Lamme, E., Homann, H.-H., Lehnhardt, M., Wildner, O., Steinau, H.-U., ve Uberla, K., "Inhibition of Early Steps in the Lentiviral Replication Cycle by Cathelicidin Host Defense Peptides", *Retrovirology*, **2**(1): 2 (2005).
- [35] Nakashima, H., Masuda, M., Murakami, T., Koyanagi, Y., Matsumoto, A., Fujii, N., ve Yamamoto, N., "Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of a Novel Synthetic Peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]Polyphemusin II): A Possible Inhibitor of Virus-Cell Fusion", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**(6): 1249-1255 (1992).
- [36] Tamamura, H., A. Otaka, T. Murakami, T. Ishihara, T. Ibuka, M. Waki, A. and Matsumoto, N.Y., ve N. Fujii, "Interaction of an Anti-Hiv Peptide, T22, with Gp120 and Cd4. ", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**(2): 555-559 (1996).
- [37] Andersen, J.H., H. Jenssen, ve T. J. Gutteberg, "Lactoferrin and Lactoferricin Inhibit Herpes Simplex 1 and 2 Infection and Exhibit Synergy When Combined with Acyclovir", *Antiviral Res.*, **58**: 209-215 (2003).

- [38] Andersen, J.H., S. A. Osbakk, L. H. Vorland, T. Traavik, ve T. J. Gutteberg, "Lactoferrin and Cyclic Lactoferricin Inhibit the Entry of Human Cytomegalovirus into Human Fibroblasts", *Antiviral Res.*, 51: 141-149 (2001).
- [39] Drobni, P., "Papillomavirus Binding and Entry. The Heparan Sulfate Receptor and Inhibition by Lactoferrin", Published PhD Thesis, Umea, Sweden. (2005).
- [40] Jenssen, H., J. H. Andersen, L. Uhlin-Hansen, T. J. Gutteberg, ve O. ve Rekdal, "Anti-Hsv Activity of Lactoferricin Analogues Is Only Partly Related to Their Affinity for Heparan Sulfate", *Antiviral Res.*, 61: (2004).
- [41] Krajewski, K., C. Marchand, Y. Q. Long, Y. Pommier, ve P. P. Roller, "Synthesis and Hiv-1 Integrase Inhibitory Activity of Dimeric and Tetrameric Analogs of Indolicidin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 5595-5598 (2004).
- [42] Robinson, WE., McDougall, B., Tran, D., ve Selsted, ME. "Anti-Hiv-1 Activity of Indolicidin, an Antimicrobial Peptide from Neutrophils.", *J. Leukoc. Biol.*, 63: 94-100 (1998).
- [43] Lee, D.G., D. H. Kim, Y. Park, H. K. Kim, H. N. Kim, Y. K. Shin, C. H. ve Choi, a.K.S.H., "Fungicidal Effect of Antimicrobial Peptide, Pmap-23, Isolated from Porcine Myeloid against Candida Albicans. Biochem", *Biophys. Res. Commun.*, 282: 305-310 (2001).
- [44] Tytler, E.M., Anantharamaiah, G.M., Walker, D.E., Mishra, V.K., Palgunachari, M.N., ve Segrest, J.P., "Molecular Basis for Prokaryotic Specificity of Magainin-Induced Lysis", *Biochemistry*, 34(13): 4393-4401 (2002).

- [45] Zasloff, M., "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**(15): 5449-5453 (1987).
- [46] De Lucca, A.J., J. M. Bland, T. J. Jacks, C. Grimm, ve T. J. Walsh, "Fungicidal and Binding Properties of the Natural Peptides Cecropin B and Dermaseptin.", *Med. Mycol.*, **36**: 291-298 (1998).
- [47] De Lucca, A.J. ve Walsh, T.J., "Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**(1): 1-11 (1999).
- [48] Kyoungsoo Parka, D.O., Song Yub Shinb, Kyung-Soo Hahmc and Yangmee Kima, "Structural Studies of Porcine Myeloid Antibacterial Peptide Pmap-23 and Its Analogues in Dpc Micelles by Nmr Spectroscopy. Biochem.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**(1): 204-212 (2002).
- [49] Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Conlon, J.M., Reinert, L.K., Doersam, J.K., Bergman, T., Silberring, J., Lankinen, H., ve Wade, D., "Activities of Temporin Family Peptides against the Chytrid Fungus (*Batrachochytrium Dendrobatidis*) Associated with Global Amphibian Declines", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**(3): 1157-1160 (2003).
- [50] Lehrer, R.I., Szklarek, D., Ganz, T., ve Selsted, M.E., "Correlation of Binding of Rabbit Granulocyte Peptides to *Candida Albicans* with Candidacidal Activity", *Infect. Immun.*, **49**(1): 207-211 (1985).
- [51] Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., ve Lehrer, R.I., "Microbicidal Cationic Proteins in Rabbit Alveolar Macrophages: A Potential Host Defense Mechanism", *Infect. Immun.*, **30**(1): 180-192 (1980).

- [52] Ha, S.C., Min, K., Koo, J.C., Kim, Y., Yun, D.J., Cho, M.J., ve Kim, K.K., "Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of an Antimicrobial Protein from *Pharbitis Nil*", *Acta Crystallographica Section D*, 57(2): 263-265 (2001).
- [53] Koo, J.C., Lee, B., Young, M.E., Koo, S.C., Cooper, J.A., Baek, D., Lim, C.O., Lee, S.Y., Yun, D.-J., ve Cho, M.J., "Pn-Amp1, a Plant Defense Protein, Induces Actin Depolarization in Yeasts", *Plant Cell Physiol.*, 45(11): 1669-1680 (2004).
- [54] Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., van 't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L.C.J.M., Veerman, E.C.I., Amerongen, A.V.N., ve Abee, T., "The Cellular Target of Histatin 5 on *Candida Albicans* Is the Energized Mitochondrion", *J. Biol. Chem.*, 274(11): 7286-7291 (1999).
- [55] Kavanagh, K., ve S. Dowd., "Histatins: Antimicrobial Peptides with Therapeutic Potential", *J. Pharm. Pharmacol.*, 56: 285-289 (2004).
- [56] Kim, D.H., D. G. Lee, K. L. Kim, ve Y. Lee., "Internalization of Tenecin 3 by a Fungal Cellular Process Is Essential for Its Fungicidal Effect on *Candida Albicans*", *Eur. J. Biochem*, 268: 4449-4458 (2001).
- [57] Young-Tae, L., Dae-Hee, K., Jeong-Yong, S., Jae Hoon, C., Bok Leul, L., Younghoon, L., ve Byong-Seok, C., "Structural Characteristics of Tenecin 3, an Insect Antifungal Protein", *IUBMB Life*, 47(3): 369-376 (1999).
- [58] Lee, D.G., H. K. Kim, S. A. Kim, Y. Park, S. C. Park, S. H. Jang, ve K. S. and Hahn, "Fungicidal Effect of Indolicidin and Its Interaction with Phospholipid Membranes", *Biophys. Res. Commun.*, 305: 305-310 (2003).
- [59] Spitznagel, J.K., "Origins and Development of Peptide Antibiotic Research", 1-14 (1997).

- [60] Carpenter, P.L., "Early Development of Microbiology", *Microbiology*: 24-39 (1977).
- [61] Boman, H.G., "Antibacterial Peptides from Insects and Pigs", *Phylogenetic Perspectives in Immunity*: 3-17 (1994.).
- [62] Zeya, H.I. ve Spitznagel, J.K., "Cationic Protein-Bearing Granules of Polymorphonuclear Leukocytes: Separation from Enzyme-Rich Granules", *Science*, **163**(3871): 1069-1071 (1969).
- [63] Fernandez de Caleyá R, G.-P.B., García-Olmedo F, Carbonero P., "Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins in Vitro", *Microbiol*, **23**: 998-1000 (1972).
- [64] Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., ve Odeberg, H., "Purification and Characterization of a Potent Bactericidal and Membrane Active Protein from the Granules of Human Polymorphonuclear Leukocytes", *J. Biol. Chem.*, **253**(8): 2664-2672 (1978).
- [65] Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., Boman, H.G., "Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity", *Nature*, **292**: 246-248. (1981).
- [66] Boman, H.G., "Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review", *Scand J Immunol*, **48**: 15-25 (1998)...
- [67] Boman, H.G., "Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity", *Annual Review of Immunology*, **13**(1): 61-92 (1995).
- [68] Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., and Boman, H. G "Insect Immunity: Attacins, a Family of Antibacterial Proteins from *Hyalophora Cecropia*", *EMBO J*, **2**(4): 571-576 (1983).

- [69] Matsuzaki, K., "Why and How Are Peptide±Lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes", *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 1-10 (1999).
- [70] Yeaman, M., "Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action ve Resistance.", *Pharmacological Reviews*, 55(1): 27-55 (2003).
- [71] <Http://Cmdr.Ubc.Ca/Bobh/Uptake.Html>. 2009.
- [72] Brogden, K.A., "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?", *Nat Rev Micro*, 3(3): 238-250 (2005).
- [73] Powers, J.P.S.a., Hancock, R. E.W., "The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity", *Peptides*, 24(11): 1681-1691 (2003).
- [74] Ziv Oren, Y.S., "Mode of Action of Linear Amphipathic Alpha-Helical Antimicrobial Peptides", *Biopolymers*, 47(6): 451-463 (1998).
- [75] Shai, Y., Oren Z., "From "Carpet" Mechanism to De-Novo Designed Diastereometric Cell-Selective Antimicrobial Peptides", *Peptides*, 22(10): 1629-41 (2001).
- [76] Yeaman, M.R. ve Yount, N.Y., "Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance", *Pharmacol Rev*, 55(1): 27-55 (2003).
- [77] Hancock, R.E.W. ve Scott, M.G., "The Role of Antimicrobial Peptides in Animal Defenses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16): 8856-8861 (2000).
- [78] Gordon, J.Y., Romanowski, E.G., McDermott A.M., "A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs", *Current Eye Research*, 30(7): 505-515 (2005).

- [79] Hancock, R.E.W., "Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics", *Tibtech.*, **16**: 82-87 (1998).
- [80] Hancock, R.E.W., "Peptide Antibiotics", *Lancet*, **349**: 418-422 (1997).
- [81] Hancock, R.E.W., "Therapeutic Potential of Cationic Peptides", *Expert Opin. Investig. Dis.*, **7**: 167-174 (1998).
- [82] Döşler, S Gerçeker, A.A., "Geleceğin Antibiyotikleri: Antimikrobiyal Etkili Katyonik Peptitler", *ANKEM*, **20**(1): 44-54 (2006).
- [83] Papo, N., Shahar, M., Eisenbach, L., ve Shai, Y., "A Novel Lytic Peptide Composed of Dl-Amino Acids Selectively Kills Cancer Cells in Culture and in Mice", *J. Biol. Chem.*, **278**(23): 21018-21023 (2003).
- [84] Krishnakumari, V., "Antimicrobial and Hemolytic Activities of Crabrolin, a 13-Residue Peptide from the Venom of the European Hornet, *Vespa Crabro*, and Its Analogs", *Journal of Peptide Research*, **50**(2): 88-93 (1997).
- [85] <http://www.eurospiders.com/>: (2009).
- [86] Argiolas, A. ve Pisano, J.J., "Isolation and Characterization of Two New Peptides, Mastoparan C and Crabrolin, from the Venom of the European Hornet, *Vespa Crabro*", *J. Biol. Chem.*, **259**(16): 10106-10111 (1984).
- [87] Geoff, P., Cereghino, L., Ilgenb, C., ve James M., "Production of Recombinant Proteins in Fermenter Cultures of the Yeast *Pichia Pastoris*", *Current Opinion in Biotechnology*, **13**(4): 329-332 (2002).

- [88] Daly, R., and Hearn, M. T. W., "Expression of Heterologous Proteins in *Pichia Pastoris*: A Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production", *J. Mol. Recognit*, **18**: 119-138 (2004).
- [89] Fischer, R., Drossard, J., Emans, N., Commandeur, U., ve Hellwig, S., "Towards Molecular Farming in the Future: *Pichia Pastoris*-Based Production of Single-Chain Antibody Fragments", **30 (Pt 2)**: 117-120 (1999).
- [90] Egli, T., Dijken, J.P., Veenhuis, M., Harder, W., ve Fiechter, A., "Methanol Metabolism in Yeasts: Regulation of the Synthesis of Catabolic Enzymes", *Archives of Microbiology*, **124(2)**: 115-121 (1980).
- [91] Gellissen, G., "Heterologous Protein Production in Methylotrophic Yeasts ", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**: 741-750 (2000).
- [92] Cereghino ,J.L., J.M.C., "Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*", *ELSEVIER FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 45-66 (2000).
- [93] Daly, R., Hancock, R.E.W., "Expression of Heterologous Proteins in *Pichia Pastoris*: A Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production", *Journal of Molecular Recognition*, **18(2)**: 119-138 (2005).
- [94] Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., ve Stillman, C.A., "Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia Pastoris*", *Mol. Cell. Biol.*, **9(3)**: 1316-1323 (1989).
- [95] Cereghino, J.L., J.M.C., "Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*", *Fems Microbiology Reviews*, **24**: 45-66 (2000).
- [96] Gellissen, G., "New Yeast Exression Platforms Based on Methylotropic *Hansenula*

Polymorpha and Pichia Pastoris and on Dimorphic Arxula Adeninivorans and Yarrowia Lipolytica - a Comparison", *FEMS Yeast Research*, 5: 1079-1096 (2005).

- [97] Burrowes, O.J., "Recombinant Expression of Pleurocidin C₁na Using the *Pichia pastoris* Expression System", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 4: 374-384 (2005).
- [98] Invitrogen, "A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris (Version M)", <http://www.invitrogen.com>: (2009).
- [99] Sreekrishna, K., "Strategies for Optimal Synthesis and Secretion of Heterologous Proteins in the Methylotrophic Yeast Pichia Pastoris", *Gene*, 190(1): 52-62 (1997).
- [100] [Http://Www.Roche-Applied-Science.Com/Labfaqs/](http://Www.Roche-Applied-Science.Com/Labfaqs/). 2009, Roche. p. 1-372.
- [101] Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S., and Meagher, M.M., "Optimization of Temperature-Glycerol-Ph Conditions for a Fed-Batch Fermentation Process for Recombinant Hookworm (*Ancylostoma Caninum*) Anticoagulant Peptide (Acap-5) Production by Pichia Pastoris", *Enzyme and Microbial Technology*, 24(7): 438-445 (1999).
- [102] McDaniel, L.E. and Bailey, E.G., "Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures", *Appl. Environ. Microbiol.*, 17(2): 286-290 (1969).
- [103] Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.-T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., and Birkenberger, L.A.,

"Strategies for Optimal Synthesis and Secretion of Heterologous Proteins in the Methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*", *Gene*, 190(1): 55-62 (1997).