

**HİSTAMİNE BAĞLANAN PEPTİTLERİN FAJ  
GÖSTERİM YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**IDENTIFICATION OF HISTAMINE BINDING PEPTIDES  
BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY**

**HAFİZE ÖZ**

**DOÇ. DR. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

## ÖZET

### HİSTAMİNE BAĞLANAN PEPTİTLERİN FAJ GÖSTERİM YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Hafize ÖZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

Ocak 2021, 68 sayfa

Gıdalarda en çok rastlanılan biyojenik aminlerden biri olan histamin, toksikolojik etkilerinden dolayı halk sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle gıdalardaki histamin seviyesinin hızlı ve hassas tayini, insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır. Biyolojik tanıyıcı ajan olarak histamin spesifik enzimlerin veya antikorların kullanıldığı biyoanaliz kitleri ve biyosensörler histaminin hızlı, hassas ve kolay tayinine olanak sağlamaktadır. Ancak histamin gibi düşük moleküler ağırlığa sahip immün cevap oluşturmayan hedeflere karşı antikor üretiminin oldukça zor olması uygulanabilirliği azaltmaktadır. Biyolojik tanıyıcı moleküllerin üretimlerinin zahmetli ve maliyetli olmasının yanında çevresel koşulların değişmesiyle aktivitelerini kolayca kaybetmeleri, yapay tanıyıcı ajanların geliştirilmesini ve biyoanalizlerde kullanılmasının önünü açmıştır. Faj gösterim teknolojisi ile çeşitli hedef moleküllere seçici olarak bağlanan yapay tanıyıcı moleküller geliştirilebilmektedir. Günümüzde faj gösterim teknolojisi,

düşük moleküler ağırlıklı birçok organik moleküle seçici olarak yüksek afinite ile bağlanan peptit ligandların belirlenmesinde kullanılabilir.

Tez çalışmasında, faj gösterim yöntemi kullanılarak gıda kaynaklı kimyasal intoksikasyon etmeni olan histamine spesifik bağlanan peptitlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 12mer faj gösterim peptit kütüphanesi, BSA-histamin immobilize edilmiş kuyucuklara eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Ardından yıkama işlemi ile bağlanmayan fajlar uzaklaştırılmış ve bağlanan fajlar kuyucuklardan geri alınmıştır. Bağlanan fajlar çoğaltılarak aynı seçim döngüsü üç defa tekrarlanmıştır. Son seçim döngüsünde histamine benzer yapıda olan histidin amino asiti ilave edilerek histidine bağlanan fajların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle histamine bağlanan birbirinden farklı peptit dizilimi taşıdığı düşünülen 41 adet faj klonu izole edilmiştir. Faj klonlarının histamine gösterdikleri afinite, faj-ELISA yöntemi ile incelenmiş ve yüksek afinite gösterdiği belirlenen 7 faj klonuna ait DNA'lar izole edilmiş ve peptit dizilimleri belirlenmiştir. Dizi analizi sonucunda en yüksek afiniteye sahip ve birbirinden farklı sekansta olan 4 peptit (HBF5, HBF10, HBF14 ve HBF26) sentezlenmiş ve bağlanma özelliklerine ait termodinamik özellikleri izotermal titrasyon kalorimetrisi kullanılarak belirlenmiştir. SGFRDGIEDFLW peptit dizilimine sahip HBF10 ve IPLENQHKIYST dizilimine sahip HBF26 peptitlerinin histamine yüksek afinite gösterdiği gözlenmiş, histamine yapıcı benzer olan histidin amino asitine ise her iki peptitin de afinite göstermediği görülmüştür. HBF26 dizilimine sahip peptite ait dairesel dikroizm spektrskopisi kullanılarak incelenmiştir. HBF10 peptitinin suda çözünürlüğü düşük olduğundan dairesel dikroizm spektrumu elde edilememiştir. Çalışma sonunda faj gösterim yöntemi kullanılarak belirlenen HBF10 ve HBF26 peptitlerinin histaminin tayinine yönelik çeşitli biyoanaliz ve biyosensör sistemlerinde kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda güvenliği, Histamin, Faj gösterim yöntemi, Peptit ligandlar, Biyoanaliz

# **ABSTRACT**

## **IDENTIFICATION OF HISTAMINE BINDING PEPTIDES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY**

**Hafize ÖZ**

**Master of Science, Department of FOOD ENGINEERING**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER**

**Jan 2021, 68 pages**

Histamine, one of the most frequently found biogenic amines in foods, threatens public health due to its high toxicity. Therefore, rapid, and sensitive quantification of histamine in food samples has vital importance in terms of human health and food safety. Bioassays and biosensors, in which histamine specific enzymes or antibodies are used as biological recognition agents, allow rapid, sensitive, and easy detection of histamine. However, the difficulties in the production of antibodies against low molecular weight targets such as histamine, reduces their applicability. The laborious and costly production of biological recognition molecules and easy loss of their activity due to changes in environmental conditions, bring up the development of artificial recognition agents and their use in bioassays. Therefore, there is an urgent need for the development of histamine binding artificial recognition agents to be used in bioassays. Phage display technology has been used frequently in the selection and development of novel recognition agents that show affinity to various target molecules. Today, phage display technology is used to identify

peptide ligands that bind selectively to many low molecular weight organic molecules with high affinity.

In this study, it was aimed to identify peptides that bind specifically to a food-borne chemical intoxication agent, histamine, using the phage display method. For this purpose, the 12mer phage display peptide library was added to BSA-histamine immobilized microtiter well and incubated. Then the non-binding phages were discarded by washing and the bound phages were eluted from the wells. The same panning cycle was repeated for three times after amplification of the bound phages. In the last panning cycle, histidine binding phages were eliminated by adding the histidine amino acid, which has a similar structure to histamine for enhancing the selectivity of the histamine binding phages. Thus, 41 phage clones thought to have different peptide sequences that bind to histamine, were isolated. The affinity of phage clones to histamine was examined by the phage-ELISA method and DNAs belonging to 7 phage clones showing high affinity were isolated and peptide sequences were determined. Following the sequence analysis, 4 peptides (HBF5, HBF10, HBF14, and HBF26) with the highest affinity and different sequences were synthesized and the thermodynamic properties of their binding properties were determined by using isothermal titration calorimetry. It was observed that HBF10 peptides with SGFRDGIEDFLW peptide sequence and HBF26 with the sequence of IPLENQHKIYST showed high affinity for histamine, and both peptides did not show an affinity for histidine amino acid, which is similar in structure to histamine. The secondary structures of the HBF26 peptide were examined using circular dichroism spectroscopy. The circular dichroism spectrum could not be obtained due to the low solubility of the HBF10 peptide in water. At the end of the study, it is thought that the HBF10 and HBF26 peptides determined by using the phage display method have the potential to be used in various bioassay and biosensor systems for the determination of histamine.

**Keywords:** Food safety, Histamine, Phage Display, Peptide Ligands, Bioanalyses

## TEŞEKKÜR

İlk olarak tez çalışmamın her aşamasında görüşlerini, tecrübelerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen, karşılaştığım her sorunda yanımda olan değerli danışmanım Doç.Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e teşekkür etmek istiyorum. Yanında geçirdiğim her yıl ile çalışma ve araştırma azmimi arttırdığı ve bu zamana kadar bana sağladığı çalışma imkanları ile yoluma ışık tuttuğu için kendisine minnettarım.

Araştırma ve çalışma süreleri boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım her türlü ilgi ve yardımlarının yanında harika arkadaşlıklarından dolayı laboratuvar çalışma arkadaşlarım, FCD Lab. üyeleri, dostum Nurdan ERSÖZ, Merve ÇANGA, Merve ERMAN, Nazım Sergen MISIRLI ve Berfin Ece ŞEN' e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışma hayatımı daha neşeli kıldıkları ve gücüm azaldığında bana destek oldukları için kendimi çok şanslı hissediyorum.

Tecrübelerini ve dostluklarını esirgemeyen sayın hocalarım Ar. Gör. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU ve Uz. Meltem ZENCİR'e çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün sayın öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve personellerine, sağladıkları bütün desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmamı yaptığım süre boyunca kendimi tükenmiş hissettiğim her an yanımda olan, tüm süreçleri benim için kolaylaştıran, güç veren, aldığım kararlarda arkamda olan, sabrı ve sevgisi sonsuz canım teyzem Rabia ÖZ, amcam Cemal ÖZ ve Fatma YAVUZ'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her an ve her koşulunda yanımda olduklarını bildiğim, anlayış, sevgi ve şefkatleri olmadan asla başaramayacağım aileme, sevgili annem Şaziye ÖZ, babam Ünal ÖZ, ağabeyim Kemal ÖZ ve kardeşlerim Sümeyye ÖZ ve Salih ÖZ'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü (Yüksek Lisans) Burs Programı ve Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi FHD-2018-16861 ve FHD-2019-18311 no'lu Hızlı Destek Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Hafize ÖZ

Ocak 2021, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyojenik Aminler.....	4
2.2. Histamin .....	6
2.2.1 Histamin İnsan Sağlığına Etkileri .....	7
2.2.2. Histamin Tayin Yöntemleri.....	9
2.3. Faj Gösterim Yöntemi .....	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	20
3.1. Materyal .....	20
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler.....	20
3.1.2. İzotermal Titrasyon Kalorimetresi .....	20
3.1.3. Dairesel Dikroizm Spektroskopisi .....	21
3.1.4. Mikroplaka Okuyuculu UV- Spektrofotometre .....	21
3.2. Metot 22	
3.2.1. Faj Gösterim Yöntemi ile Histamine Afinite Gösteren Faj Klonlarının Seçilmesi .....	22
3.2.2. Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.3. Seçilen Peptitlerin Histamin ile Etkileşiminin İncelenmesi .....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Histamine Afinite Gösteren Peptitlerin Seçilmesi.....	28
4.1.1. Faj Gösterim Kütüphanesinden Faj Klonlarının Seçilmesi ve Faj-ELISA ...	28
4.1.2 Seçilen Faj Klonlarının Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	30

4.2. Histamin-peptit etkileşiminin termodinamik özelliklerinin incelenmesi.....	34
4.2.1. Peptit-Histamin Kompleksinin Termodinamik Özellikleri ve Bağlanma Kinetiği .....	34
4.2.2. Seçilen Peptitlerin İkincil Yapı Analizi .....	41
5. YORUM.....	45
6. KAYNAKLAR .....	52
EKLER.....	65
EK 1- CD Spekturumlarına Ait Hesaplanmış Eğriler.....	65
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	67
ÖZGEÇMİŞ .....	68



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Histidin dekarboksilaz enzimi ile katalizlenen histamin oluşum reaksiyonu ...	6
Şekil 2.2. Filamentöz M13 bakteriyofajı.....	14
Şekil 2.3. Filamentöz M13 bakteriyofajının hücre içine girişi.....	15
Şekil 2.4. Faj gösterim peptit kütüphanesinin <i>in-vitro</i> seçim döngülerinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.5. Faj ELISA basamaklarının şematik gösterimi. ....	18
Şekil 3.1. Faj gösterim peptit kütüphanesi ile histamin spesifik faj seçiminin şematik gösterimi.....	23
Şekil 4.1. Lineer peptit kütüphanesinden serbest histamin ile elüsyon sonucu seçilen faj klonlarının faj-ELISA sonunda elde edilen absorbans değerleri.....	29
Şekil 4.2. Lineer peptit kütüphanesinden glisin-HCl elüsyonu sonucu seçilen faj klonlarının faj-ELISA sonunda elde edilen absorbans değerleri.....	30
Şekil 4.3. A) Serbest histaminin HBF5 peptiti ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. B) Serbest histaminin HBF14 peptiti ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları.....	35
Şekil 4.4. A) Serbest histaminin HBF10 peptiti ile titrasyonu ile elde edilen İTK termogramları. B) Histamin-HBF10 peptidi bağlanmasına ait grafik ve termodinamik özellikler .....	36
Şekil 4.5. A) Serbest histaminin HBF26 peptitleri ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. B) Histamin-HBF26 peptidi bağlanmasına ait grafik ve termodinamik özellikler .....	37
Şekil 4.6. Serbest histidin- HBF10 peptit titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları.....	40
Şekil 4.7. Serbest histidin- HBF26 peptit titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları.....	41
Şekil 4.8. Serbest histamine, HBF26 peptidine ve histamin ile etkileştirilmiş HBF26 peptidine ait CD spektrumları .....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İzole edilen fajlara ait OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> değerleri. ....	31
Çizelge 4.2. Faj- ELISA yöntemi ile seçilen faj klonlarının değişken bölgelerine ait peptit sekansları .....	32
Çizelge 4.3. Histamine afinite gösteren peptitlerin fizikokimyasal özellikleri.....	33
Çizelge 4.4. Histamine-peptit interaksiyonunun termodinamik özellikleri (K; bağlanma katsayısı, $\Delta G$ ; Gibbs serbest enerjisi, $\Delta H$ ; bağlanma entalpisi, $\Delta S$ ; bağlanma entropisi ve n bağlanma stokiyometrisi ) .....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\Delta H$	Entalpi değişimi
$N$	Bağlanma stokiyometrisi
$K_a$	Bağlanma sabiti
$\Delta G$	Gibbs serbest enerjisindeki değişim
$\Delta S$	Entropi değişimi
$\lambda$	Dalga boyu
$c$	Konsantrasyon
$T$	Sıcaklık
$R$	Evrensel gaz sabiti
$A$	Absorbans
$\epsilon$	Molar zayıflama katsayısı
$l$	Işığın örnek içinden geçtiği yolun uzunluğu
OD	Optik yoğunluk

## Kısaltmalar

BA	Biyojenik amin
BAİ	Biyojenik amin indeksi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
UPLC	Ultra-performans sıvı kromatografisi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
İTK	İzotermal titrasyon kalorimetresi
CD	Dairesel dikroizm
DNA	Deoksiribo nükleik asit
UHT	Ultra yüksek ısı
IgE	İmmünoglobulin E
AOAC	Resmi Analitik Kimyacılar Derneği (Association of Official Analytical Chemists)
RIA	Radyoimünoassay
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
LB	Luria Broth besiyeri
HRP	Horseradish peroksidaz
BSA	Bovine Serum Albumin
PEG	Polietilen glikol
HCl	Hidoklorik asit
IPTG	İsopropilthiogalaktosid
X-gal	5-Bromo-4-kloro-3-indolyl-beta-D-galaktopiranosid
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfoniasit)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
NaI	Sodyum İyodür

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
NaCl	Sodyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monopotasyum fosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum Fosfat
DMSO	Dimetil sülfoksan
NKOS	Normalize Karekök Ortalamadan Sapma
H1R	H1 reseptörü
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance)
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer (Molecularly Imprinted Polymer)

# 1. GİRİŞ

Histamin, histidin dekarboksilazın katalitik aktivitesi yoluyla histidin amino asitinden sentezlenen; insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından oldukça önemli bir biyojenik amindir. Gıda işlenmesi ve paketlenmesi hijyenik koşullarda yapılmadığında ve uygun depolama koşulları uygulanmadığında, histamin toksik seviyelere yükselebilmektedir. Yüksek miktarda histamin içeren gıda maddelerinin tüketilmesi insanlarda gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir. Ayrıca histamin seviyesi, gıda kalitesi ve/veya toksikolojisi hakkında bilgi vermektedir. Günümüzde histamin tayini çoğunlukla, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ultra-performans sıvı kromatografisi (UPLC) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmektedir. Bahsedilen teknikler ile histamin tayini hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir, fakat analiz maliyetlerinin yüksek ve analiz sürelerinin uzun olması bu yöntemlerin en önemli dezavantajları olmuştur. Bu nedenle histamin molekülünün tespitine yönelik hızlı, hassas ve uygulaması kolay yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda geleneksel yöntemlere alternatif olarak biyoanaliz kitleri ve biyosensörlerin geliştirilmesine dair çalışmalar yapılmaktadır. Bu uygulamalar düşük maliyeti, hızlı olması, uygulanma kolaylığı, vasıflı personellere ve hacimli enstrümanlara ihtiyaç duyulmaması sebebiyle histamin tayinine yönelik önemli bir tespit yöntemi olmuştur. Uygulamalarda histamin molekülüne spesifik enzimler veya antikorlar biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Bu biyolojik tanıyıcı ajanlar histamin tayini için seçici ve hassas yöntemlere olanak tanımışlardır. Ancak, antikorların saflaştırması ve üretim aşamaları, yoğun iş gücü ve yüksek maliyetin yanı sıra uzun zaman almaktadır. Bunun yanında histamin gibi küçük moleküllere, haptenlere, karşı yüksek özgüllük ve afiniteye antikorlarının üretimi, küçük boyutları ve basit yapılarından dolayı sahip oldukları düşük immünojenisiteyi nedeniyle zordur. Bunun yanında üretilen antikorlar serbest histamin için düşük afinite göstermektedir. Karşılaşılan zorluklara ek olarak enzim ve antikorlarda görülen bir başka sorun ise sıcaklık, pH veya iyonik kuvvet gibi çevresel şartların değişmesiyle aktivitelerini çok kolay kaybetmeleridir.

Bu nedenle, bu durum, ‘sentezlenebilen’ biyomoleküllerin (yapay tanıyıcıların) biyoanaliz sistemlerinde tanıyıcı ajan olarak kullanımlarını gündeme getirmiştir. Rekombinant proteinler, aptamerler, moleküler baskılanmış polimerler ve peptit ligandlar, hedef moleküle gösterdikleri afinitenin ve seçiciliğin yanı sıra, ucuz, hızlı ve hayvan dostu üretimleri sayesinde biyoanalizler için önem kazanmışlardır.

Farklı dizilimdeki peptitlerin fajların kılıf proteinleri üzerinde oluşturulduğu, faj gösterim kütüphaneleri, peptit ligandların seçim aşamasında kolaylık sağlamak ve düşük maliyetle yüksek miktarlarda üretilmektedir. Faj kütüphaneleri kullanılarak seçilen peptitler biyosensör uygulamalarında yüksek kullanım potansiyeline sahiptir.

Tez kapsamında, faj gösterim teknolojisinden yararlanılarak, tamamen rastgele yapılardan oluşturulmuş ve yüksek miktarda polipeptit çeşitliliği gösteren faj gösterim peptit kütüphanelerinden yararlanılmış ve gıda güvenliği ve gıda kalitesinin belirlenmesi açısından önemli bir ajan olan histamine yüksek afinite gösteren faj klonları seçilmiştir. İzole edilen faj klonlarının bağlanma özellikleri faj-ELISA yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, faj gösterim peptit kütüphanesinden seçilen ve histamine yüksek afinite gösterdiği belirlenen faj klonlarının DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve peptit dizimleri belirlenmiştir. Sekansları belirlenen peptit ligandlar (doğrusal yapıda ve 12 amino asit uzunluğunda) katı faz yöntemiyle sentezlenmiştir.

Çalışmanın son kısmında, histamin – peptit etkileşimleri termodinamik ve yapı-fonksiyon ilişkileri açısından incelenmiştir. Bu doğrultuda, izotermal titrasyon kalorimetresi (İTK) sistemi peptit-histamin kompleksinin oluşum mekanizmasının ve termodinamik özelliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Belirlenen peptite ait ikincil yapı analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla dairesel dikroizm (Circular dichroism, CD)

spektroskopisi kullanılmıştır. Bağlanma ile peptitlerde meydana gelen konformasyonel değişimler incelenmiştir.

Tez çalışmasının sonucunda, histamin gibi küçük moleküllere seçici bağlanan peptit ligandların, faj gösterim yöntemiyle seilebilmesinin mümkün olduğu grlmştir. Sentezlenen peptit liganların ileriki çalışmalar ile biyoanaliz ve biyosensör uygulamalarında tanıyıcı ajan olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca peptit ligandların bağlanma bölgelerinin modifiye edilmesi ile hedef moleküle daha yüksek afinite göstermesinin ilerleyen çalışmalar ile mümkün olabileceği düşünülmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyojenik Aminler

Biyojenik aminler (BA), biyolojik aktivite gösteren düşük molekül ağırlıklı organik bazlardır [1]. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardaki normal metabolik aktivitenin bir sonucu olarak oluşturulabilir, bozulabilir ve genellikle amino asitlerin dekarboksilasyonu ile üretilirler [2]. Amino asit dekarboksilasyonu, gıdalardaki aminlerin en yaygın sentez yoludur ve aromatik aminler, bir gıdayı toksik hale getirebilirler [3].

BA'ler balık, et, meyve ve sebze gibi çeşitli gıdalarda bulunabilir. Özellikle fermantasyon işlemleri uygulanması veya mikrobiyolojik bozulma sonucu gıdalarda yüksek BA seviyeleri gözlenebilmektedir. [4]. BA'leri içermesi muhtemel gıdalar arasında balık, balık ürünleri, et ürünleri, yumurtalar, peynirler, fermente edilmiş sebzeler ve soya fasulyesi ürünleri, bira ve şaraplar bulunmaktadır [5]. Gıdalarda ortaya çıkan en önemli BA'ler histamin, putresin, kadaverin, tiramin, triptamin, p-feniletıl, spermin ve spermidindir [6].

Fermente olmayan gıdalarda, BA'lerin belirli bir seviyenin üzerinde bulunması, istenmeyen mikrobiyal aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, amin seviyesi, mikrobiyal bozulmanın bir göstergesi olarak kullanılabilir [7]. Bununla birlikte, gıdalardaki biyojenik aminlerin mevcudiyeti, bozulma organizmalarının büyümesi ile ilintili olmamaktadır, çünkü bu mikroorganizmaların hepsi dekarboksilaz-pozitif değildir [8]. Aminoasit dekarboksilazlar, bakteriler arasında geniş çapta dağılmamış olsa da, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* ve laktik bakteri *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi birçok türün bir veya daha fazla amino asitin dekarboksilasyonunu yapabildiği bilinmektedir [9].

Gıdalardaki biyojenik aminleri hedefleyen çalışmalar genellikle iki yönü kapsamaktadır: gıda kalitesi ve/veya toksikolojisi [10]. BA seviyesi gıdaların kalitesi hakkında bilgi vermektedir [11]. Putresin, kadaverin, histamin ve tiramin toplamından oluşan biyojenik amin indeksi (BAİ), et ve et ürünlerinin kalitesinin belirlenmesi için önerilmektedir [12].

Hernández-Jover ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışma ile etin kalite aralık indekslerini belirlemiştir. Buna göre, BAI  $<5 \text{ mg kg}^{-1}$  iyi kalitede taze eti, 5 ila 20  $\text{mg kg}^{-1}$  arasında ilk bozulma belirtileri olan ancak kabul edilebilir eti, 20 ila 50  $\text{mg kg}^{-1}$  düşük kalitede eti ve  $>50 \text{ mg kg}^{-1}$  ise bozulmuş eti göstermekte olduğunu önermiştir [13]. Bununla birlikte BA indeksi esas olarak ürünün doğası (taze, konserve, değiştirilmiş atmosfer, fermente edilmiş, vb.) ile ilgili birçok faktöre de bağlıdır [11]. Örneğin, BA indekslerinin taze et ve et ürünlerinde, ısı işlem görmüş ürünlerde fermente ürünlere göre daha tatmin edici olduğu kanıtlanmıştır [12]. Proseslerinde birçok farklı faktör (olgunlaştırma, starter, katkı maddeleri vb.) içermesinden dolayı fermente ürünlerdeki BA konsantrasyonu, taze ve pişmiş et ürünlerine göre daha yüksek seviyelerde bulunmaktadır [2, 14-16]. Biyojenik amin oluşumunun, varlığının ve konsantrasyonunun izlenmesi kalite ve güvenlik nedenleriyle önemli olduğu gibi, BA'lerin sınıflandırılması gıda üreticileri için de önem arz etmektedir [17].

Bu düşük moleküler ağırlıklı organik bazlar, yüksek miktarlarda alınmadıkça, katabolizmaları için doğal mekanizmalar inhibe edilmedikçe veya genetik olarak yetersizlik olmadıkça, bireyler için herhangi bir tehlike oluşturmamaktadır [18]. Fakat yüksek konsantrasyonlarda BA içeren gıdaların tüketimi sağlık tehlikeleriyle ilişkilendirilmiştir [11]. Biyojenik aminlerin toksik etkilerini, monoamin oksidaz inhibitörü ilaçlar veya alkol arttırmaktadır [18].

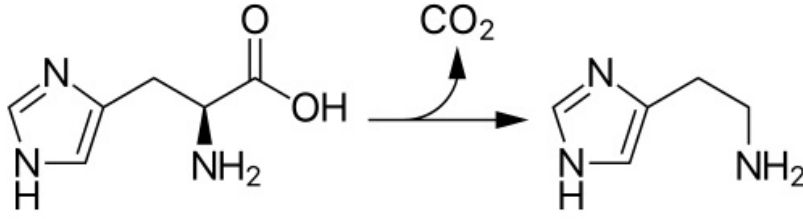
Biyojenik aminlerin neden olduğu en yaygın gıda kaynaklı zehirlenmeler histamin içermektedir. Histamin zehirlenmesi, aynı zamanda, ton balığı, uskumru ve sardalya gibi balıkların tüketimi ile ilgili "scombroid balık zehirlenmesi" olarak da adlandırılır [2].

Balıklardan sonra peynir, histamin zehirlenmesiyle ilişkili en sık rastlanan gıda maddesidir ve ilk bildirilen vaka, 1967 yılında Hollanda'da Gouda peynirinin tüketimi ile meydana gelmiştir [19].

Gıda ham maddelerinden tüketimine gelinceye kadar potansiyel tehlikesi bulunan gıdalarda amin oluşumunun izlenmesi için etkili yöntemlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2.2. Histamin

Histamin, 4- (2-aminoetil) imidazol, L-histidin aminoasitinin dekarboksilasyonundan meydana gelen birincil amindir [20] (Şekil 2.1). Histamin, birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan ve aynı zamanda alerji ve inflamasyonun önemli bir aracı olan nörotransmitterlerden biridir [21]. Ancak, vücutta histaminin kritik bir seviyenin üzerine çıkması sağlık sorunlarına neden olmaktadır [3].



Şekil 2.1. Histidin dekarboksilaz enzimi ile katalizlenen histamin oluşum reaksiyonu

Eksojen histaminin en önemli kaynağını gıdalar oluşturmaktadır [20]. Gıdalarda histamin, fermentasyon veya bozulma sırasında, histidin amino asitinin mikrobiyal transformasyonu ile oluşmaktadır [2]. Histamin üreten bakteriler, histidin dekarboksilaza sahiptir, bu da L-histidin histamine dönüşümünü katalize etmektedir [22]. Gıda, hijyenik koşullarda işlenip paketlenmediğinde, histamin toksik seviyelere yükselebilmektedir [20]. Bazı yiyeceklerde, özellikle balıklarda ve meyvelerde, histamin oluşumu birçok faktöre; histamin seviyesi kökenine, depolama ve ekim koşullarına zamana, sıcaklığa ve mevcut mikroorganizmaların türüne ve miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [23]. Örneğin yeni yakalanmış ton balıklarında histamin seviyeleri genellikle düşüktür, yaklaşık olarak  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  in altındadır ve histamin intoleransı olmayan bir birey tarafından tüketilebilmektedir [24]. Ancak çok düşük sıcaklıkta ( $0-2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 5 günlük depolamadan sonra kısa süreli uygun olmayan saklama süresi bile histamin içeriğini arttırabilmekte ve bu nedenle sağlık sorunlarına neden olabilmektedir [25].

Histamin, balık ve balık ürünleri, süt ürünleri, et ürünleri, fermente sebzeler, şarap ve bira gibi birçok gıdada bulunabilmektedir [2, 26, 27]. Peynir ya da balık yedikten sonra histamin zehirlenmesi ortaya çıkabilmektedir [28, 29]. Tüm insanlar histamine karşı

hassastır ve etkileri semptomların ciddiyetine bağlı olarak intolerans veya intoksikasyon olarak tanımlanabilir [30].

Gıdalardaki biyojenik amin oluşumu, mikrobiyal büyümeının sınırlandırılmasıyla, geleneksel olarak soğutma ve dondurma işlemleri ile engellenmiştir. Bu yaklaşım yeterli veya uygulanabilir olmadığında ise hidrostatik basınç uygulaması, ışınlatma, kontrollü atmosfer paketleme, gıda katkı maddeleri ve baharat eklenmesi gibi alternatif yöntemlerle biyojenik amin oluşumunun önlenmesi veya seviyelerinin düşürülmesi sağlanabilmektedir. Histamin molekülü, fermantasyon için başlangıç kültürlerine eklenen bakteriyel amin oksidazlar, diamin oksidazlar veya amin negatif bakteriler tarafından da parçalanabilmektedir [31]. Ancak, histamin bir kez oluştuğundan sonra, pişirmek, konserve yapmak veya dondurmak gibi yöntemleri kullanmak histamin seviyesini azaltmaz [32], çünkü bu bileşik ısıya dayanıklı olmakta [9, 33] ve hatta eğitimli panelistler tarafından organoleptik olarak tespit edilememektedir [34].

Süt ve süt ürünleri, gıdaların yanlış işleme sırasında histamin içeriğinin istenmeyen artışını göstermek için iyi birer örnek olarak verilebilir. Taze süt normalde çok düşük seviyelerde histamin içerdiği halde, ticari olarak satılan pastörize veya UHT sütleri taze süte göre biraz daha yüksek seviyede histamin içermektedir. Sütün fermantasyonu sırasında, histamin seviyesinde bir artış meydana gelmekte ve ekşi kremada 7 ppm olan histamin miktarı, yoğurttta biraz daha yüksek seviyelere ulaşabilmektedir. Son olarak, peynir üretiminde, histamin içeriğinin artması sıkça meydana gelmekte ve bu da eskitilmiş peynirlerde maksimum 2500 ppm histamin seviyesine ulaşmaktadır [6].

### **2.2.1 Histaminin İnsan Sağlığına Etkileri**

Histamin zehirlenmesi, yüksek seviyede histamin içeren gıdaların tüketilmesiyle oluşan bir kimyasal intoksikasyondur. Özellikle, balık zehirlenmelerinin en yaygın etmeni olarak görülmektedir [35].

İnsanların diyetindeki histamin varlığı genellikle kayda değer bir sonuç vermemektedir. Çünkü insanların gastrointestinal sisteminden histamin etkili bir şekilde absorbe edilememektedir. Fakat bazı durumlarda gıda kaynaklı histamin, bağırsak bariyerini

geçmektedir. Kan dolaşımına yeterli miktarda histamin girmesi durumunda histamin intoksikasyonu meydana gelebilmektedir [17]. İnsan metabolizmasında, amin oksidaz ve amin metiltransferaz enzimlerinin rol aldığı bir detoksifikasyon sistemi ile biyojenik aminlerin vücutta birikmeleri engellenmektedir. Ancak, düşük amin oksidaz aktivitesi görülen bireylerde histamin içeren gıdaların tüketilmesi olumsuz etkilerin görülmesine neden olmaktadır [6]. Ayrıca, etanol ve bazı ilaçların histamin detoksifikasyonunda görev alan enzimlerin inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır [36]. Çok yüksek miktarda histamin alımında, sağlıklı bireylerde dahi detoksifikasyon sistemi histamini elimine etmekte yetersiz kalmaktadır [37]. Eğer detoksifikasyon sistemi, alınan histamini ortadan kaldıramazsa, spesifik reseptörlere bağlanmakta ve genellikle IgE'nin aracılık ettiği gıda alerjilerine benzer semptomlara neden olmaktadır [29].

Yüksek miktarda histamin içeren yiyeceklerin tüketilmesinden sonra, inkübasyon periyodu birkaç dakika ila birkaç saat arasında değişmektedir [29,30]. Histamin birikimi, alerjik bir reaksiyonu taklit ederek çok sayıda semptomu neden olabilmektedir. Nüfusun yaklaşık %1'i histamin intoleransı göstermekte ve bu bireylerin %80'i orta yaşlarda bulunmaktadır [38]. Vücuttaki yüksek histamin seviyesi baş ağrısına, vertigoya, bulantıya, kusmaya, hipotansiyona, aritmiye ve anafilaksiye (alerjik şok) neden olabilmektedir [36, 39].

Çoğu ülke gıdalardaki histamin seviyelerini düzenlenmemekte ve histamin zehirlenmesi olayı meydana geldiğinde uyardırmayı gerek görmemektedir. Bundan dolayı histamin zehirlenmesinin oluşumunu tahmin etmek zordur [40]. Sağlıklı bireylerde 50 mg'ın veya 0.75 mg kg<sup>-1</sup> vücut ağırlığının oranının üzerinde histamin alımında sağlık üzerinde olumsuz etkiler görülmeye başlanırken [39], histamin intoleransı olan bireylerde ise bu miktar çok daha düşüktür [41].

Ülkemizde histaminin kabul edilebilir en yüksek değeri balıklarda 100 mg kg<sup>-1</sup>, şarapta ise 10 mg kg<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir [42]. Bu sınırlar Avrupa Birliği düzenlemeleriyle benzerlik gösterirken, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise histamin için limit değer 50 mg kg<sup>-1</sup> olarak kabul edilmektedir [43, 44]. Ancak, çok yüksek histamin seviyeleri görülen, süt ürünleri ve fermente et ürünleri gibi diğer gıdalar için ise kesin bir sınır değeri

bulunmamaktadır. Yukarıda belirtilen gerçeklere dayanarak, histamin tespitinin gıda endüstrisi ve gıda güvenliği açısından kritik önem arz ettiği sonucuna varılmaktadır.

### **2.2.2. Histamin Tayin Yöntemleri**

Gıda güvenliğinin sağlanması ve gıda kalitesinin belirlenmesinde özellikle yüksek risk taşıyan gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucu oluşan histamin molekülünün hızlı ve hassas bir şekilde tayin edilmesi kritik önem taşımaktadır [45, 46]. Bununla birlikte, histamin intoleransı görülen bireylere uygulanan histamin içermeyen diyetin sağlanabilmesi için özellikle düşük miktarlardaki histaminin tespit edilebilmesi gerekmektedir.

Gıda numunelerindeki histamin analizlerinin çoğu, modern analitik kimyanın ilk günlerinde kurulmuştur ve bu öncü çalışmalar kolorimetrik veya florometrik analize dayanmıştır [47]. Yapılan ilk kolorimetrik analiz çalışması 1955 yılında gerçekleştirilmiş olup, histaminin bir aromatik diazo bileşiği ile reaksiyona sokulması ve ürünün 495 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır [48]. Gerçekleşen bu reaksiyonun çok spesifik olmaması nedeniyle farklı çalışmaların yapılması gerekmiştir. İlerleyen yıllarda kolorimetrik [46, 49] ve florometrik analizler [50, 51] geliştirilmiş fakat numunenin renk yoğunluğunun bir histamin standardı ile görsel karşılaştırması gerektirmesi, yarı kantitatif olması ve belirli bir konsantrasyonun ötesinde kullanılamaması nedeniyle çok tercih edilmemektedir.

Günümüzde gıda örneklerindeki histamin tayini çoğunlukla sıvı kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile histamin tayininde, histaminin gıda matrisinden ekstraksiyonunu takiben derivatizasyon işlemiyle histamine floresans veya kromofor özellik kazandırılarak tayin gerçekleştirilmektedir [52, 53].

Ayrıca histamin tespitinde ultra-performans sıvı kromatografi (UPLC) yöntemi [54] ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi tekniği [55] de gıdalardaki histamin tayini için kullanılmaktadır. Bahsedilen teknikler ile histamin tayini hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir fakat analiz maliyetlerinin yüksek ve analiz sürelerinin uzun

olması, kromatografik yöntemlerin yerine yeni yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir.

Resmi Analitik Kimyacılar Derneği' nin (AOAC, Association of Official Analytical Chemists) deniz ürünleri için önerdiği referans metotta ise histamin molekülü içeren ekstrakt iyon-değiştirici kolonda ayrılmakta ve floresans histamin türevleri oluşturularak florometre ile saptanmaktadır [56]. Bu yöntemde analiz maliyetleri daha düşük olsa da analiz süresi uzun sürmekte ve deneyimli personel gerektirmektedir. Bu nedenle, histaminin hızlı ve hassas tayininin gerçekleştirilebilmesi için otomasyona uygun yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Spesifik bir IgE (immünoglobulin E) ve alerjenik maddeler tarafından uyarıldıktan sonra mast hücrelerinden salınan histaminin ölçümüne dayanan bir alerji testinin in vitro modeli bildirilmiştir [57]. Salınan histamin vücut sıvıları içinde taşınmaktadır. Bu nedenle plazma ve idrar gibi vücut sıvılarında histamin tayini ve teşhisi alerji araştırmalarında önem arz etmektedir [58]. Histaminin belirlenmesi için alerji teşhisi ve çeşitli alerji alanlarındaki araştırmalar ile ELISA ve radyoimmünoassay (RIA) yöntemi gibi teknikler geliştirilmiştir. Ancak, bu yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Örneğin ELISA yöntemi yüksek analitik verim sağlasa da yıkama, bağlı ve serbest antijenin ayrılması, vb. gibi zahmetli ve zaman alıcı adımlar büyük dezavantajları oluşturmaktadır. Bu yöntemin bir başka dezavantajı ise bir immüno plaka üzerindeki immüno reaksiyonun yavaş difüzyon sürecine sahip olması ve daha uzun bir inkübasyon süresi gerektirmesidir. Bu difüzyon süreci, immüno plakaların titretilmesiyle geliştirilebilmektedir, ancak bu bazen antikor veya antijen konjugatının fiziksel olarak immüno plakanın yüzeyinden desorbe edilmesine yol açmaktadır. RIA yöntemi söz konusu olduğunda ise, bir antikorun veya radyoaktif bir türle etiketlenmiş bir antijen konjugatının ayrılması radyolojik güvenlik sorunları ortaya çıkarmaktadır [59].

Geleneksel yöntemlere alternatif olarak biyoanaliz kitleri ve biyosensörler, maliyeti, hızlı olması, uygulanma kolaylığı, vasıflı personellere ve hacimli enstrümanlara ihtiyaç duyulmaması sebebiyle histamin tayinine yönelik geliştirilmektedir [60]. Bahsedilen tayin yöntemlerinde çoğunlukla biyolojik tanıyıcı ajan olarak histamin molekülüne spesifik enzimler [38, 61, 62] veya antikorlar [63-65] kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen

analizlerdeki bu biyolojik tanıyıcı ajanların yüksek seçicilikleri ve hassasiyetleri vardır. Fakat bu ajanların saflaştırılması ve üretim işlemlerinde birçok zorluk ile karşılaşmaktadır. Günümüzde biyoanalizlerde sıklıkla kullanılan monoklonal antikolar (yüksek seçiciliğe sahip), oldukça pahalı ve zaman alıcı bir teknik olan hibridoma yöntemiyle üretilmektedir. Hayvanların immünizasyonu ile elde edilen poliklonal antikor üretimi monoklonal antikor üretimine kıyasla daha ucuz olsa da spesifik antikoların eldesi için daha ileri düzeyde saflaştırma ve izolasyon aşamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Hem enzimlerde hem de antikolarda sıcaklık, pH veya iyonik kuvvet gibi çevresel şartların değişmesiyle aktivitelerini çok kolay kaybetmeleri, karşılaşılan problemlerden birkaçıdır [66]. Bununla birlikte, histamin gibi küçük moleküllere, haptenlere, karşı yüksek özgüllük ve afinite ile antikolarının üretimi, küçük boyutları ve basit yapılarından dolayı sahip oldukları düşük immünojenisite nedeniyle zordur [67].

Bugüne kadar histamin için çeşitli immünolojik testler geliştirilmiştir. Guesdon ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, BSA-histamin için birleştirme ajanı olarak 1,4-benzokinon kullanılmış ve histamine karşı monoklonal antikolar farelere bağımsızlık kazandırılarak elde edilmiştir. Elde edilen antikolar kullanılarak histamin seviyesi ELISA ile ölçülmüştür [68]. Çoğu immünolojik test histamin türevlerine afinite gösteren antikolara dayanmaktadır; süksinile edilmiş histamin, p-benzokinon – histamin konjugatı, kloroetil-nitrosoüre-histamin konjugatı gibi. Fakat bu antikolar serbest histamin için düşük afinite göstermektedir [69].

2017 yılında yapılan bir çalışma ile ticari antikolar kullanarak serbest histamin için biyoçip geliştirmenin zorlukları ele alınmıştır [67]. Bunun için piyasada bulunun altı farklı antikor incelenmiş ve kullanılan antikolardan yalnızca ikisinin serbest histamine düşük afinite ile bağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca antikor çalışmalarının tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu görülmüş ve bu nedenle son zamanlarda özellikle ticari antikoların karakterizasyonu, özgüllüğü ve çapraz reaktivitesi hakkında tartışmalar ortaya çıkmıştır. Antikor karakterizasyonu için yüksek bir talep olmasına rağmen, mevcut antikoların partiden partiye değişkenliğini karakterize etmek ekonomik açıdan uygun değildir [70].



İmmobilize edilen yarışmacı haptten ile immünizasyon için kullanılan hapttenin kimyasal yapısı, test geliştirilmede önemli bir role sahiptir. Heterolog testlerde, bağışıklık kazandıran ve yarışmacı hapttenler yapıları açısından farklılık gösterirken, homolog testlerde hapttenler aynıdır; bu tür heterolog testlerin duyarlılığının, homolog testlerden daha iyi olduğu rapor edilmiştir [67]. Ancak histamine spesifik afinite gösteren antikor elde etmek için türevlendirilmiş birçok histamin konjugatı sentezleyen Luo ve ark., histamin gibi son derece basit yapıdaki hapttenler için heteroloji kavramını oluşturmanın zor olduğunu bildirmiştir [71]. Üretilen antiserumların hiçbiri serbest histamini tanımadığından ve son test yapısı histamin türevlendirilmesi adımı gerektirdiğinden, test hassasiyetindeki iyileşme, sadece bir heterolog yarışmacı haptten ile gösterilebilmiştir.

Kullanılan yöntemlerin çoğu, gıdalardaki histamin miktarı hakkında bilgi sağlamak için geleneksel tekniklere dayanmasına rağmen, biyosensör yaklaşımına dayalı alternatif yöntemler son yıllarda gündeme gelmiştir. Bu durumda, biyosensör ve biyoanaliz uygulamalarında 'sentezlenebilen' biyomoleküllerin tanıyıcı ajan olarak kullanılması önem kazanmıştır. Son zamanlarda enzimatik olmayan biyosensörlere dair mevcut araştırma faaliyetleri, biyosensörlerin analitik performansını ve sağlamlığını iyileştirmek amacıyla ağırlıklı olarak nanoteknoloji ve moleküler baskılamaya odaklanmaktadır [47].

Aptamerler, moleküler baskılanmış polimerler (Molecularly Imprinted Polymer, MIP) ve peptit ligandlar, hedef moleküle gösterdikleri afinitenin ve seçiciliğin yanı sıra, ucuz, hızlı ve hayvan dostu üretimleri sayesinde biyoanalizler için önem kazanmışlardır. 2018 yılında yapılan bir çalışmada yüzey plazmon rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) bazlı bir fiber optik histamin sensörünün üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş [72], 2020 yılında ise histamin molekülü için hassas ve seçici bir nanopartikül kaplı MIP kullanılarak SPR çipi geliştirilmiştir [73]. Histamin tayinine yönelik geliştirilen yeni analiz sistemlerinde MIP'ler sıkça kullanılmakla birlikte [74-76], histamine spesifik geliştirilen aptamer veya peptit ligandlara ait çalışma bulunmamaktadır.

Günümüzde, biyoanalizlerde peptit ligandların tanıyıcı ajan olarak kullanılması yaygınlaşmıştır. Bunun en önemli nedeni belli uzunluğa sahip peptitlerin üretiminin kolay olmasıdır. Peptit ligandlar bakteri hücrelerinde rekombinasyon yöntemiyle veya *in-vitro*

koşullarda üretilebilmektedir. Peptit ligandların en önemli avantajlarından biri de farklı modifikasyonlar ile çeşitli birçok biyoanalizlerde kullanılabilirliği ve farklı çevre koşullarında aktivite gösterebilmeleridir.

Faj gösterimi, hedef moleküle afinite gösteren kısa peptit ligandlarının seçimi için güçlü bir araçtır. Faj gösterim yöntemi ilk başlarda esas olarak proteinlere ligandların tanımlanması için kullanılmaktaydı fakat bu tekniğin kapsamı son yirmi beş yılda önemli ölçüde genişlemiştir. Günümüzde faj gösterim teknolojisi, doğal ve biyolojik polimerler ve çeşitli düşük moleküler ağırlıklı organik moleküller dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki hedeflere seçici olarak yüksek afinite ile bağlanan peptit ligandların tanımlanması için giderek daha fazla uygulanmaktadır [77].

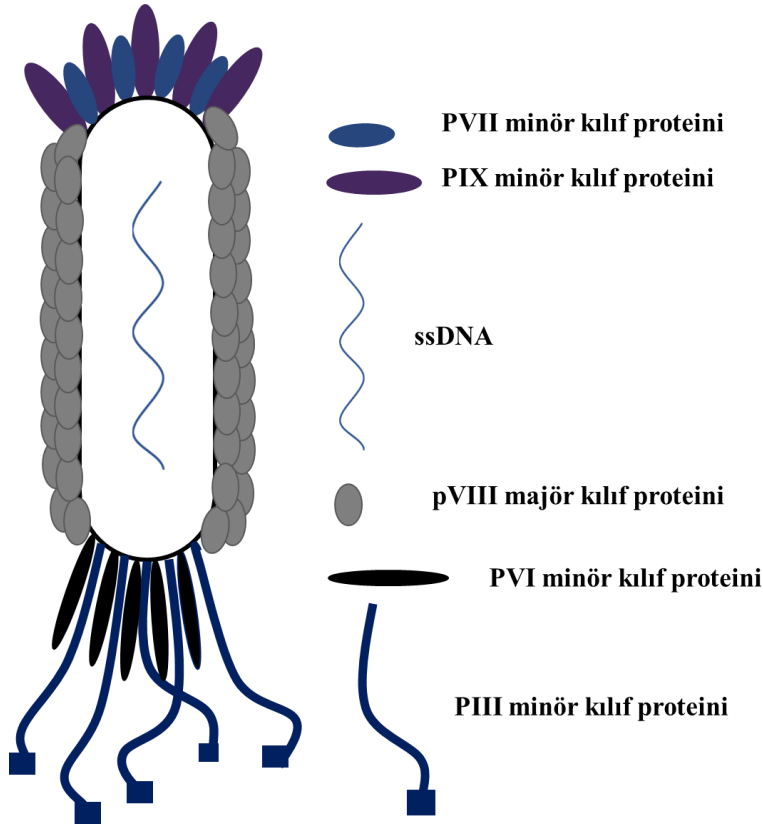
Peptit ligandlar birçok nedenden dolayı ilgi çekmektedirler. Bu tür peptitlerin, ilgili substrata seçici olarak ve yüksek afinite ile bağlanma yeteneğine sahip olması, nanopartiküllerin veya biyomoleküllerin konjugasyonuna veya immobilizasyonuna izin vermekte ya da genel olarak malzeme arayüzlerindeki etkileşimleri kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlıklı organik maddelere seçici olarak bağlanan peptit ligandların gösterimi, sensör yüzeylerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

### **2.3. Faj Gösterim Yöntemi**

Faj gösterim teknolojisi, herhangi bir hedef molekülü algılayabilme kapasitesine sahip rekombinant protein veya peptitlerin filamentöz fajların yüzeyinde sunulmasına dayanmaktadır [78]. Faj gösterimi güçlü bir kombine teknolojidir; milyarlarca peptit, antikor veya protein arasında, ilgilenilen bir ligandı bağlayan ender varyantların tanımlanmasını sağlamaktadır [79, 80]. Geliştirilen teknoloji kapsamında, peptitleri kodlayan DNA parçaları, filamentöz fajın kılıf proteinini kodlayan gen dizilimine eklenmektedir.

Faj gösterim teknolojisinde *E. coli'* nin Ff ailesine ait filamentli fajı; uç pH değerlerine, deterjanlara ve yüksek sıcaklığa karşı dirençleri olmasından dolayı yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [81]. Faj gösterim yönteminde en yaygın olarak kullanılan M13 filamentözdür ve beş farklı proteinden oluşan 6000-8000 baz dairesel genomlu bir kılıfa

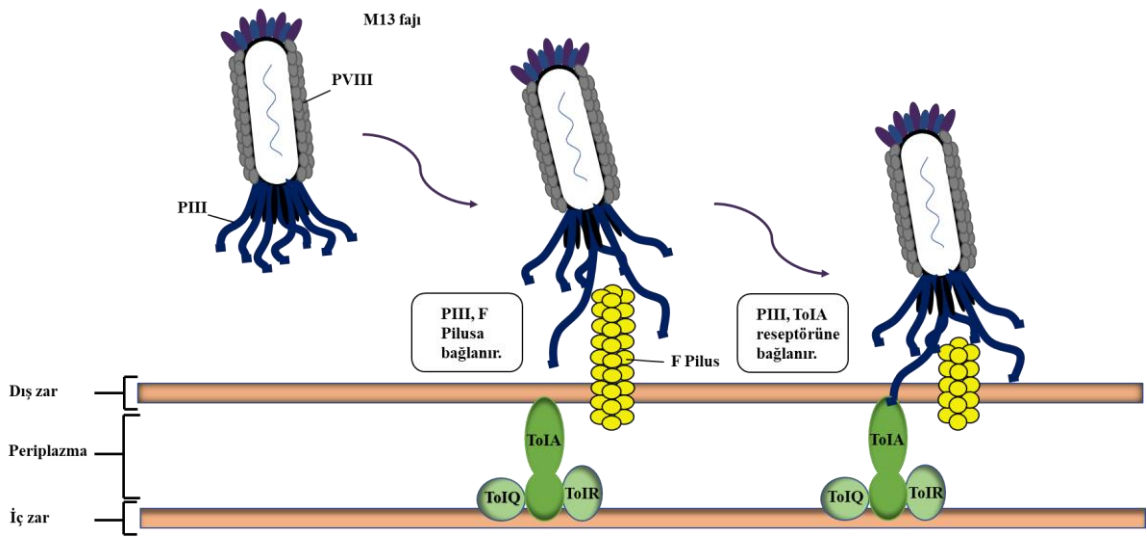
yerleştirilmiş esnek çubuk şeklinde bir yapıya sahiptir; T4, T7 ve  $\lambda$  fajları ise nadir olarak kullanılmaktadır [78, 82]. Binlerce kopyadan oluşan majör kılıf proteini (pVIII), fajın uzunluğu boyunca yer almaktadır. Faj partikülünün bir ucunda 5 kopyadan oluşan pIII ve pVI minör proteinler bulunurken, diğer ucunda 3-5 kopyadan oluşan pVII ve pIX kılıf proteinleri bulunmaktadır [83] (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Filamentöz M13 bakteriyofajı

Faj gösterimi için en yaygın kullanılan proteinler pIII ve pVIII'dir. Hem pIII hem de pVIII kılıf proteinleri, fajı bakteri membranına yönlendiren N-terminal sinyal sekansı içermektedir. pIII kılıf proteini, yaklaşık 406 amino asit uzunluğundadır ve enfeksiyon sırasında faj-konakçı etkileşiminden sorumludur [83]. Faj gövdesini oluşturan pVIII kılıf proteini ise sadece 50 amino asit uzunluğundadır [84]. Filamentöz faj enfeksiyonu iki basamaktan oluşmaktadır; tanımlama ve translokasyon. Filamentöz fajlar türlerine göre (M13, İke vb.) bakteri hücre duvarlarında bulunan F, N, P pilusları vb. gibi farklı piluslara spesifiklik göstermektedir [85]. Ff bakteriyofajı, *Escherichia coli*'yi F-pilusun ucuna bağlanarak enfekte etmektedir [86]. İnfeksiyon, F pillusun ucuna pIII kılıf proteininin N-terminal bölgesinden bağlanması ile başlamakta ve ardından kılıf proteinleri

çözünmektedir, bunu faj DNA'sının bakteri hücresinin sitoplazmasına girmesi izlemektedir [80]. Faj, *E. coli*'nin F' pilusunun ucuna, pili proteininin N-terminali yoluyla bağlanır. Ardından konakçıya ait TolA proteini depolimerize olmaya başlar (Şekil 2.3.). *E. coli* hücresinde kopyalanan faj DNA'sı, plazmid benzeri kopyalanabilir forma dönüştürülmektedir. Bu sayede, pIII ve pVIII minör proteinlerinin ekspres edilebilmesi için kalıp-şablon görevi üstlenmektedir. Konakçı hücreden çıkışları sırasında, fajların bu tek zincirli DNA'ları, tekrardan viral kılıf proteinleri ile sarılmaktadır [83].



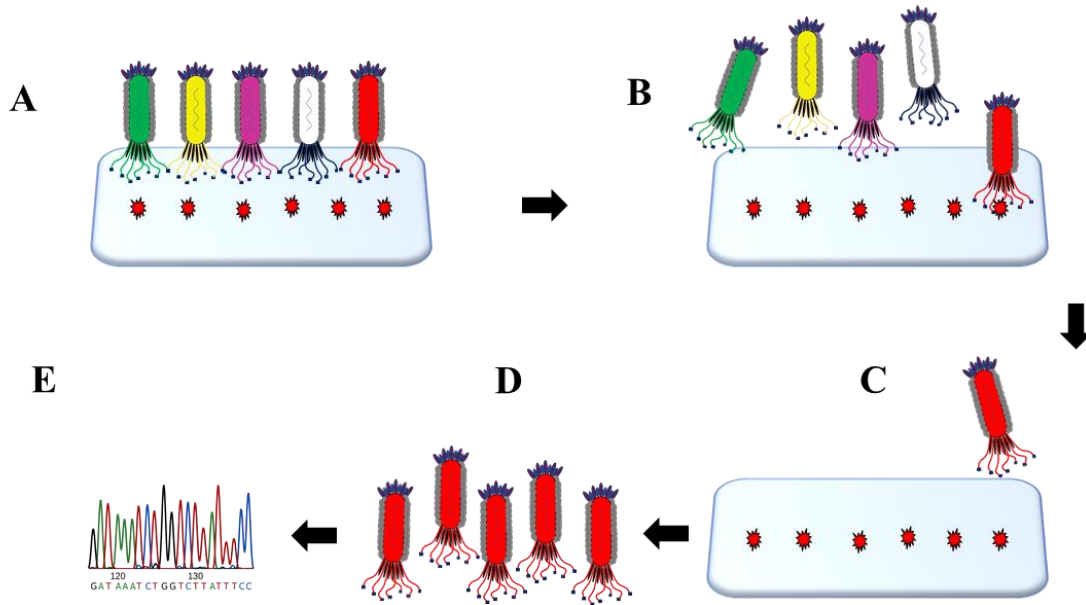
Şekil 2.3. Filamentöz M13 bakteriyofajının hücre içine girişi.

Faj kütüphanesi içinden hedefe karşı özgünlük gösterenlerin seçimi, "biopanning" olarak adlandırılan proses ile gerçekleştirilmektedir. Bu seçim işleminin tekrarlanması sayesinde ise hedef molekülü algılama yeteneğine sahip fajlar, dolayısıyla peptitler elde edilebilmektedir [87-89]. Biopanning işlemi, seçim ve amplifikasyon olmak üzere birbirini takip eden iki ana adımdan oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Seçim döngüsünde, birinci biopanning döngüsüne ilk giren faj popülasyonu kullanılarak tarama hedefine bağlanan faj klonlarına ait zenginleştirilmiş bir çıktı alt popülasyonu üretilmektedir. Seçim adımı, kütüphanenin hedef ile inkübasyonunu, bağlanmamış fajların çoklu yıkama yoluyla uzaklaştırılmasını ve uygun bir elüsyon yöntemi kullanılarak hedefe bağlanan fajların geri kazanılmasını içermektedir. Amplifikasyon ise, seçilen fajları çoğaltmak için bakteri hücrelerini enfekte eden çıktı faj alt popülasyonunu devreye sokmakta ve ikincil bir odaklanmış kütüphane oluşturmaktadır. Bu ikincil kütüphane, bir sonraki biyolojik

tarama turu için bir girdi popülasyonu görevi görmektedir. Amplifikasyon, her turda hedef bağlayıcı faj klonlarının sayısını arttırmaktan sorumludur [90].

Son biopanning döngüsü sonucunda, nihai çıktı popülasyonundaki en bol klonların hedef yapıya spesifik afinite gösteren peptit dizilerini barındırdığı varsayılmaktadır. Sonuç olarak birkaç tur biopanning işlemi ile, oldukça çeşitli bir kütüphaneyi, hedefe özel bağlayıcıların küçük bir alt popülasyonuna daraltmak mümkün olmaktadır [91].

Faj gösteriminde, görüntülenen her peptit fiziksel olarak kendisini kodlayan diziye bağlıdır. Bu nedenle, ayrı ayrı faj klonlarının DNA dizilimlerinin belirlenmesi, peptitleri gösteren amino asit dizilerinin çıkarılabilmesine olanak sağlamaktadır. Rastgele peptit kütüphanelerinin taranmasında hedef, plastik yüzeyler (çok kuyulu plakalar) veya manyetik boncuklar üzerinde hareketsiz hale getirilmiş bir molekül (bir enzim, reseptör, antikor vb.) olabilir. Bazen hedef, kültürlenmiş hücrelerin yüzeyinde bulunmakta [92] ve hatta bir kütüphaneyi *in-vivo* olarak taramak da mümkün olmaktadır [93].



Şekil 2.4. Faj gösterim peptit kütüphanesinin *in-vitro* seçim döngülerinin şematik gösterimi.

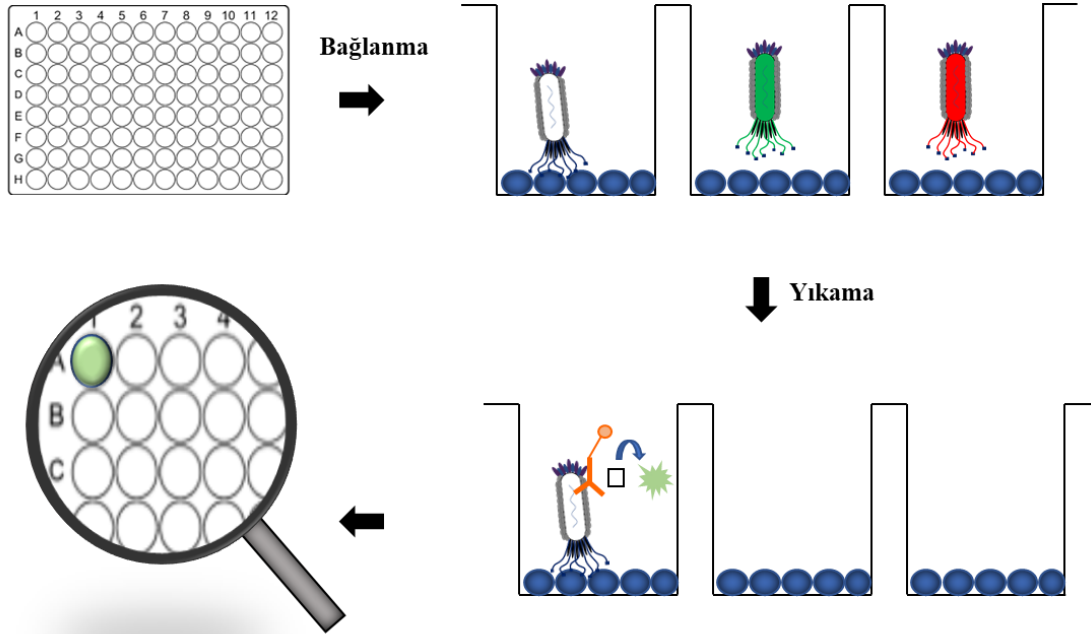
Şekil 2.4' te bir hedefe karşı faj gösterim kütüphanesinin in-vitro seçim döngüleri şematik olarak gösterilmiştir. A basamağı farklı dizimdeki peptitlere sahip çeşitli faj klonlarını göstermektedir. B basamağında faj kütüphanesi hedef molekül ile inküde edilmiş ve bazı fajlar moleküle bağlanmaktadır. C basamağında, birkaç yıkama ile bağlanmamış fajlar uzaklaştırılmakta ve hedefe bağlanan fajlar geri kazanılmaktadır. D basamağında geri kazanılan fajlar, bakteriyel kültürü enfekte ederek çoğaltılmıştır. E basamağında ise peptitlerin sekansını belirlemek için amplifiye edilmiş faj klonlarının DNA sekanslaması yapılmaktadır.

Elde edilen fajların afinitelerini belirlemek için, ELISA, Western blot, akış sitometrisi ve immün sito- / histokimya gibi çeşitli tarama yöntemleri kullanılmaktadır. ELISA, faj gösterim teknolojisinde tarama işlemi sırasında en yaygın olarak kullanılan test yöntemidir [94]. ELISA, belirli bir örnekte antijen (proteinler, peptitler, hormonlar vb.) veya antikorun varlığını saptamak için antikorları ve enzimleri içeren, renk değişikliği datalarını kullanan biyokimyasal bir testtir. Sıvı fazdaki antijen, genellikle mikrotiter kuyucuklara hareketsizleştirilmekte ve antijenin spesifik bir antikora bağlanmasına izin verilmektedir. Bu antijen daha sonra ikincil, enzim bağlı bir antikor tarafından tespit edilmektedir. Enzim için kromojenik bir substrat, antijen varlığını gösteren görünür bir renk değişikliği veya floresan vermektir. Kalitatif veya kantitatif ölçümler, bu tür kolorimetrik okumalara göre değerlendirilebilmektedir [95] (Şekil 2.5.).

Şekil 2.5.'te antijen mikrotiter kuyuların duvarlarına bağlanmaktadır. Faj klonları antijen kaplı kuyulara gönderildiğinde, spesifik olan fajlar antijene bağlanmaktadır. Kantitatif veya kalitatif olarak antijeni tespit edebilecek bir renk değişikliği üreten enzime konjuge antikor ve substrat eklenerek, absorbans değeri ölçülebilmektedir.

Faj gösterim teknolojisi, reseptörler, enzimler, antikorlar ve toksinler gibi çeşitli hedef moleküllere ve ayrıca inorganik yüzeylere ve organik moleküllere afinite gösteren yeni tanıma ajanlarının seçimi ve geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [96-98]. Bu tekniğin en büyük gücü, genetik olarak tasarlanmış protein veya peptit varyantlarını ayrı ayrı kullanmak yerine standart ve hızlı moleküler biyoloji yöntemlerini kullanarak faj yüzeyinde görüntülenen çok çeşitli eksojen peptitleri veya proteinleri üretmesidir [99]. Peptit kütüphaneleri bir hedefe bağlanma açısından hızlı bir şekilde taranabilmekte ve bu

'seçiciler' sonunda DNA dizilemesi yoluyla tanımlanabilmektedir [78]. Farklı dizimdeki peptitlerin fajların kılıf proteinleri üzerinde oluşturulduğu, faj gösterim kütüphaneleri, peptit ligandların seçim aşamasında sağladığı kolaylıklardan ve düşük maliyetle yüksek miktarda üretilebildiğinden, diğer peptit kütüphanelerine kıyasla daha sık kullanılmaktadırlar [66].



Şekil 2.5. Faj ELISA basamaklarının şematik gösterimi.

Bununla birlikte küçük organik moleküller, faj gösterim yönteminde hedef materyal olarak nadiren kullanılmıştır [77]. Faj gösterim yöntemleriyle tanımlanan spesifik peptitlerin, küçük organik moleküllerden olan trinitrotoluen, dinitrotoluen gibi nitroaromatik patlayıcı bileşiklere bağlandığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir [100-102]. Başka bir araştırmada, Tanaka ve diğerleri, bir faj gösterim peptit kütüphanesi kullanarak uçucu organik bileşikler (VOC'ler) bağlayan peptitleri başarıyla taramış ve benzaldehit tanıma peptit probu geliştirmiştir [103]. Van Dorst ve arkadaşları, kanserojen organik molekül olarak bilinen poliklorlu bifenil (PCB) özgü fajları tanımlamışlar ve fajlar ve PCB arasındaki bağlanma etkileşimini karakterize etmek için SPR sensör çip yüzeyi başarılı bir şekilde kullanılmıştır [104].

Sawada ve diğerklerinin yapmış olduğu bir çalışmada ise küçük organik moleküllerden olan naftaline bağlanan peptitleri seçmek ve sentezlemek için 12-mer faj gösterim peptit kütüphanesi kullanmış ve seçilen peptitin zamana karşı immobilize naftaline bağlanması, SPR lmleri ile başarıyla tespit edilmiştir [105]. Seçilen peptitin, referans moleküller olarak benzen, antrasen ve piren gibi yapısal olarak benzer diğer moleküllere bağlanması incelenmesi için de SPR lmleri alınmıştır. Analiz sonucunda peptitin naftaline bağlanma sabiti ( $K_a$ ) değeri,  $1.41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Naftalin için  $K_a$  değeri, benzeninkinden 34 kat, antrasen ve piren için olanlardan en az 100 kat daha büyük olduğu bulunmuştur. Seçilen peptitin, diğer tüm moleküllerin peptitle etkileşime girmek için aynı fonksiyonel grupları içermesine rağmen, benzen halkalarının sayısındaki farklılıkları ayırt ettiği bildirilmiştir. Peptitin bağlanma etkinliğinin, benzen, antrasen ve piren gibi yapısal olarak benzer diğer moleküllere kıyasla hedef moleküle daha güçlü bir afinite ile bağlandığı bildirilmiştir [105]. Sonuç olarak, en basit polisiklik aromatik hidrokarbonlardan olan naftalini tanıyan kısa 12-mer peptitlerin, faj gösterim peptit kütüphanesi kullanılarak taranabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile kısa peptitlerin, son derece basit kimyasal yapılarla sahip kk organik moleküllerdeki kk farklılıkları tanıyabildiği gösterilmektedir.

Faj gösterim peptit ktpheneleri kullanılarak kk organik moleküllere seçici olarak bağlanan peptitlerin seçilebilmesi histamin gibi düşük molekül ağırlıklı bir moleküle karşı peptit ligand geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır [105]. Seçilen peptitlerin SPR gibi biyosensör uygulamalarında da başarı ile analiz edilebildiği görülmektedir.

Hapten tasarımı, antikor üretimindeki zorluklar ve kk moleküller için immünolojik testin geliştirilmesi gerekmeksizin, kk moleküllere seçici ve yüksek afinite ile bağlanan peptit ligandların retilbilmesi önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca, faj gösterim yöntemi ile seçilen kk moleküllere afinite gösteren peptitlerin, biyosensör uygulamalarında başarı ile kullanılması, histamin için seçilen peptitlerin ileriki çalışmalarda histamin tayinine yönelik biyosensör ve biyoanalizlerde kullanılabileceğini göstermektedir.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Çalışmada faj gösterim yönteminin uygulanması için, New England Biolabs Inc. (Ipswich, A.B.D.) firmasından, 12 mer M13 faj gösterim kütüphanesi ve *Escherichia coli* ER2738 konakçı organizması kullanılmıştır. Bakteri gelişimi için kullanılan LB besiyeri Merck KgaA (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Horseradish peroksidaz (HRP) işaretli monoklonal M13 antikoru Abcam Plc. (Cambridge, İngiltere) firmasından alınmıştır. BSA-histamin, Fitzgerald (MA, Amerika Birleşik Devletleri) firmasından temin edilmiştir. Bovin serum albumini (BSA), gliserol, Tween 20, polietilen glikol-8000 (PEG), glisin, hidroklorik asit, isopropilthiogalaktosid (IPTG), 5-Bromo-4-kloro-3-indolyl-beta-D-galaktopiranosid (X-gal), 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfoniasit) (ABTS), EDTA, NaI, hidrojen peroksit ve çalışmada kullanılan tampon çözeltiler için Tris, NaHCO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, ABD) firmasından temin edilmiştir. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi Baker (Hollanda) firmasından sağlanmıştır.

##### 3.1.2. İzotermal Titrasyon Kalorimetresi

Seçilen peptitlerin histamin molekülüne gösterdikleri afinitelerin belirlenmesi ve peptit-histamin interaksiyonunun incelenmesi amacıyla Malvern Panalytical (Malvern, Birleşik Krallık) firmasından MicroCal ITC200 mikrokaleorimetresi kullanılmıştır. İTK, çok çeşitli biyomoleküler etkileşimlerin kantitatif çalışmalarında kullanılan bir tekniktir.

Cihaz, biyomoleküler bağlanma olayı sırasında salınan veya emilen ısıyı doğrudan ölçmeye dayanmaktadır. İTK, termostatlı kılıfla çevrili, paslanmaz çelik hücreden oluşan bir referans hücresi ve bir numune hücresi, karıştırma cihazı olarak da çalışan bir enjeksiyon şırıngası ve bilgisayar kontrollü termostatik ısı dedektörleri ve geri bildirim sistemlerini kapsamaktadır. Mikrokaleorimetrenin görevi bu iki hücreyi tamamen aynı sıcaklıkta tutmaktır. Bağlanma meydana geldiğinde dedektörler, hücreler arasındaki sıcaklık farkını algılar ve ısıtıcılara geri bildirim vererek bu farkı telafi eder ve hücreleri eşit sıcaklığa döndürür. Titrasyon işlemi numune hücresi içerisinde gerçekleşmektedir.

Çözeltinin homojen karışmasını sağlayan paslanmaz çelik bir pervane yazılım tarafından kontrol edilmektedir. Cihaz, titrant çözeltinin koyulduğu bir şırıngaya sahiptir ve şırınga numune hücreğine yerleştirilerek pompa yardımı ile titre edilmektedir. Enjeksiyon hızı yazılım tarafından kontrol edilmektedir. Bağlanma sonucunda belirlenen ısı değişimleri eş zamanlı olarak işlenmekte ve İTK'ye bağlı monitör aracılığıyla izlenmektedir. Deney sonucunda ortaya çıkan tüm veriler Malvern Panalytical firmasından sağlanan MicroCal ITC-ORIGIN yazılımı kullanılarak işlenmiş ve reaksiyon için termodinamik parametreler ile bağlanma katsayıları hesaplanmıştır.

### **3.1.3. Dairesel Dikroizm Spektroskopisi**

Faj gösterim yöntemi kullanılarak seçilen peptitlerin ikincil yapılarının belirlenmesi amacıyla CD ölçümleri alınmıştır. Bu amaçla JASCO CD (Easton, A.B.D) firmasına ait J-815 spektropolarimetre kullanılmıştır. CD spektroskopisi, yapısal asimetri nedeniyle ortaya çıkan sağ polarize ışığa karşı sol polarize ışığın absorpsiyonundaki farklılıkları ölçmektedir. Düzenli bir yapının olmaması sonucunda CD yoğunluğu sıfır olurken, düzenli bir yapı hem pozitif hem de negatif sinyalleri içerebilen bir spektrum ile sonuçlanır. Çalışmada, uzak-UV spektral bölge (190-250nm) taranarak, JASCO CD Spectra Manager II yazılımı aracılığıyla peptitlerin ikincil yapıları belirlenmiştir.

### **3.1.4. Mikroplaka Okuyucu UV- Spektrofotometre**

Spektrofotometrik mikroplakalarda ELISA deneyi sonrası ortaya çıkan kolorimetrik değişimine ait UV/Vis okumalarının yapılması amacıyla BioTek Instruments, Inc. (Winooski, Vermont, ABD) firmasına ait ELx808 UV-ELISA okuyucu kullanılmıştır. Cihaz 380 – 900 nm dalgaboyu arasında okuma yapabilmektedir. Faj-ELISA sonucunda meydana gelen renk değişimine ait absorbans değerleri 405 nm dalgaboyunda, KC Junior yazılım programı kullanılarak belirlenmiştir.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Faj Gösterim Yöntemi ile Histamine Afinite Gösteren Faj Klonlarının Seçilmesi

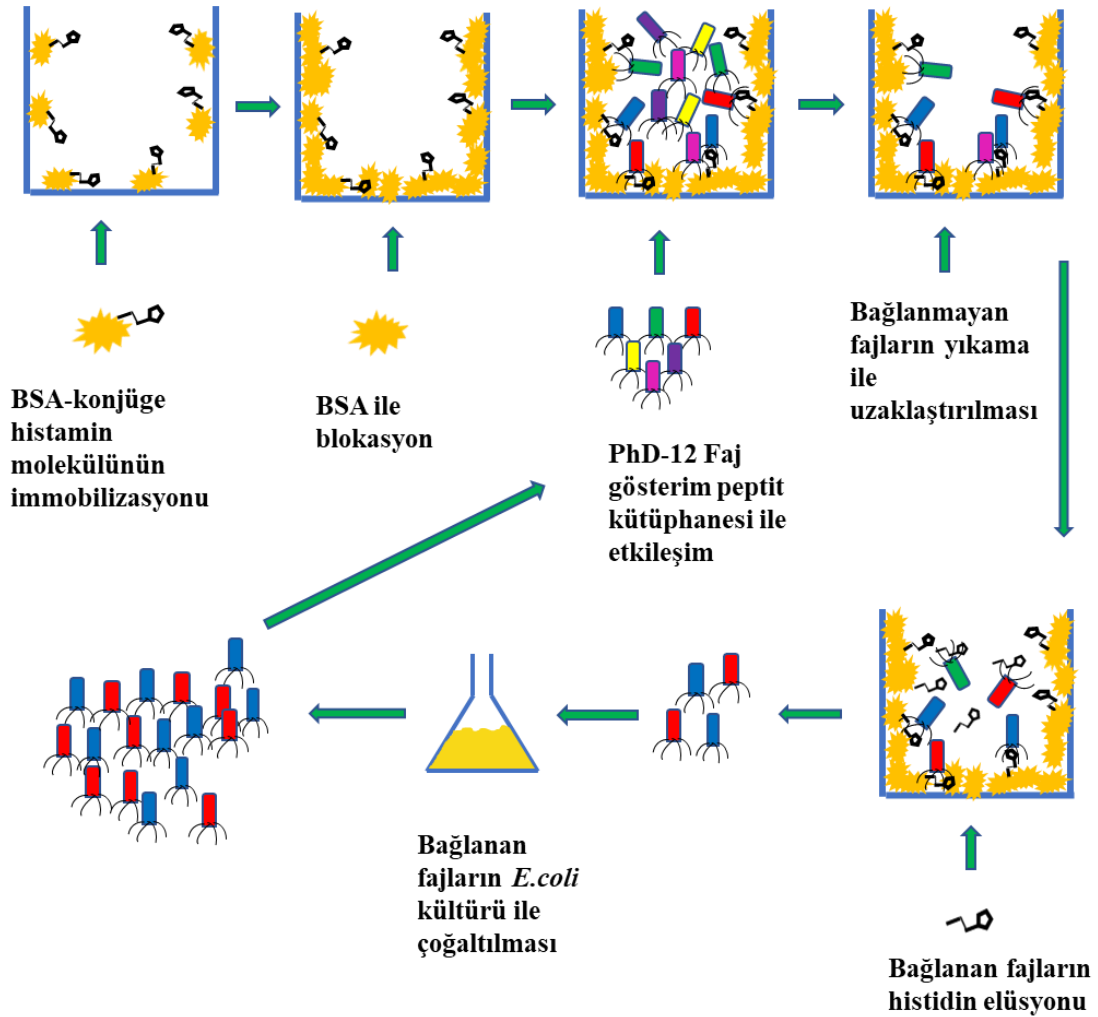
#### 3.2.1.1. Faj Gösterim Kütüphanesinden Faj Klonlarının Seçilmesi

Histamine bağlanan faj klonlarının seçilmesi amacıyla  $10^{14}$  pob mL<sup>-1</sup> faj içeren 12mer M13 faj gösterim kütüphanesi kullanılmıştır (Şekil 3.1.). M13 fajı, hücre lizisine neden olmadan enfekte konakçı içinde çoğalabilme avantajına sahiptir. Öncelikle 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH:8.6) tamponu içerisinde, derişimi 100 µg mL<sup>-1</sup> olacak şekilde BSA-histamin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 150 µL mikrotiter plaka kuyucuklarına ilave edilmiş ve 4 °C' de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu sayede BSA-histaminin kuyucukların yüzeyine immobilize olması sağlanmıştır. BSA-histamin çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar bloklama tamponu (0.1 M NaHCO<sub>3</sub> , pH 8.6 , 5 mg mL<sup>-1</sup> BSA) ile doldurulup 1 saat 4 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bloklama çözeltisi boşaltılmış ve immobilize olmayan blokasyon tamponununun uzaklaştırılması için kuyucuklar altı kez hacimce %0.1 Tween 20 içeren TBS tamponu (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl) ile yıkanmıştır.

Faj kütüphanesinden alınan 10 µL çözelti 100 µL'ye tamamlanarak BSA-histamin immobilize edilen kuyucuğa eklenmiştir. 1 saat boyunca oda sıcaklığında düşük hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmayan fajlar kuyucuktan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 10 kez %0.1 Tween 20 içeren TBS tamponu ile yıkanmıştır. Kuyucuklara bağlanan fajların ortamdan alınması için kuyucuğa 100 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda serbest histamin eklenerek, fajların yarışmalı olarak serbest histamin molekülüne bağlanması sağlanarak ortamdan alınmıştır.

Ortamdan alınan fajlar, faj kütüphanesi ile sağlanan, *E. coli* kullanılarak bir sonraki döngüde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır. Çoğaltma işlemi için elde edilen fajlar 20 mL bakteri içeren besiyerine eklenmiş 4.5 saat boyunca 37°C'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür 12000 g'de 10 dk santrifüj edilerek bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Supernatant yeni bir tüpe alınarak üzerine %20'lik PEG ve 2.5 M NaCl içeren çözelti eklenmiş ve 4°C'de 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında PEG içeren çözelti 12000 g'de 30 dk santrifüjlenerek fajların çökmesi sağlanmıştır. Pellet 1mL TBS tamponuna alınmış ve

fajların tekrar çöktürülmesi için çözeltiye PEG-NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Buzda 1 saat inkübasyonun sonunda tekrar santrifüj edilmiş ve pellet 200 µL TBS tamponunda çözdürülmüştür. Son kez çözünmeyen kalıntıların uzaklaştırılması için mikrosantrifüj yapılmıştır. Çoğaltılan fajları içeren supernatant bir sonraki döngüde kullanılmak amacıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Çoğaltma işlemi sonrası faj titresinin belirlenmesi çift tabaka agar yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Faj gösterim peptit kütüphanesi ile histamin spesifik faj seçiminin şematik gösterimi

Birinci döngü sonunda elde edilen fajlar bir sonraki seçim döngüsünde kullanılmıştır. İkinci ve üçüncü seçim döngüsünde de birinci seçim döngüsünün prosedürü

uygulanmıştır. Yalnızca yıkama çözeltisi olarak kullanılan TBST tampon çözeltisindeki Tween 20 miktarı %0.5'e yükseltilmiştir.

Histidin amino asiti, histamin molekülüne oldukça benzer bir yapıya sahiptir. Üçüncü seçim döngüsünde yıkama işleminden sonra histamine daha seçici olan faj klonlarının seçilmesi amacıyla, bağlanan fajların ortamdaki alınma basamağından önce ortama  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonunda histidin çözeltisi eklenmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuktaki çözelti uzaklaştırılmış ve yıkama işlemi uygulanarak histidine bağlanan fajlar elimine edilmiştir. Kuyucuklara bağlanan fajların ortamdaki alınması için kuyucuğa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonda serbest histamin eklenmiş ve fajların histamin molekülüne bağlanması sağlanarak ortamdaki alınmıştır. Ayrıca kuyucukta kalan tüm fajların alınması için glisin-HCl tamponu (pH 2.2) ile 5 dk inkübe edilmiş ve pH değeri tekrar 7.2'ye ayarlanmıştır. Panning işlemi sonrasında hedef molekülü algılayan faj klonlarının izolasyonu için son panning döngüsünden sonra tek plak izolasyonuna gidilmiştir.

### **3.2.1.2. Faj Klonlarının İzolasyonu**

Üçüncü seçim döngüsünden sonra çıkan faj klonları izole edilmiştir. Bu amaç ile  $200 \mu\text{L}$  LB besiyerinde çoğaltılan *E.coli*'ye  $10 \mu\text{L}$  faj dilüsyonlarından eklenmiş ve 5 dk inkübe edilmiştir. Karışım  $45^\circ\text{C}$ 'de bekletilen  $5 \text{ mL}$  katı LB besiyerine eklenerek vortekslenmiştir. Ardından IPTG-Xgal içeren katı besiyerlerinin üzerine dökülmüştür. Besiyerleri  $37^\circ\text{C}$ 'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gözlenen mavi renkli plaklardan 41 adet seçilmiş ve her bir plak LB sıvı besiyerine alınmıştır. Fajların sıvı besiyerine difüze olması amacıyla  $4^\circ\text{C}$ 'de bir gece bekletilmiştir. Seçilen bu fajları çoğaltmak amacıyla *E.coli* kültürü kullanılmış ve faj titreleri belirlenmiştir.

### **3.2.1.3. Seçilen Faj Klonlarının Bağlanma Özelliklerinin Faj-ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi**

Saflaştırılan faj klonlarının titresi yukarıda anlatıldığı şekilde artırılmış ve histamine bağlanan faj klonlarının bağlanma özellikleri faj-ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla ELISA plate kuyucuklarına  $0.1 \text{ M NaHCO}_3$  pH 8.6 tamponunda hazırlanan BSA-histamin çözeltisinden  $100 \mu\text{L}$  eklenmiş ve  $4^\circ\text{C}$ 'de bir gece boyunca bekletilerek immobilize edilmiştir. BSA-histamin çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra,

kuyucuklar bloklama tamponu ile doldurulup 4 °C’ de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından bloklama çözeltisi de uzaklaştırılmış ve kuyucuklar altı kez %0.5 Tween 20 içeren TBS tamponu ile yıkanmıştır. Her biri yaklaşık  $10^{10}$  pob mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda farklı faj klonları kuyucuklara ilave edilmiş ve 1.5 saat oda sıcaklığında düşük hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Ardından bağlanmayan fajlar uzaklaştırılmış ve kuyucuklar altı kez %0.5 Tween 20 içeren TBS tamponu ile yıkanmıştır. Kuyucuklara HRP işaretli anti-M13 antikor 100 µL ilave edilmiş ve 1.5 saat düşük hızda inkübe edilmiştir. Bağlanmayan antikor çözeltisi uzaklaştırılmış ve kuyucuklar altı kez %0.5 Tween 20 içeren TBS tamponu ile yıkanmıştır. 50 mM sodyum sitrat tamponunda (pH 4.0) 0.22 mg mL<sup>-1</sup> ABTS hazırlanmış ve substrat çözeltisi için 2mL ABTS ve 3.4 µL %30’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisinden, kuyucuklara 100 µL ilave edilmiş ve 30 dakika düşük hızda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 405 nm’deki absorbans değerleri UV-ELISA okuyucu cihazı ile belirlenmiştir.

### **3.2.2. Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.2.1. Faj Klonlarından DNA İzolasyonu ve Peptit Sekanslarının Belirlenmesi**

Histamine bağlandığı belirlenen faj klonlarının DNA’larını izole etmek amacıyla, çoğaltma işlemi yapılmıştır. Seçilen fajlar 20 mL bakteri içeren besiyerine eklenmiş ve 4.5 saat boyunca 37°C’de karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür 10 dk santrifüj edilerek bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Supernatant yeni bir tüpe alınarak üzerine %20’lik PEG ve 2.5M NaCl içeren çözelti eklenmiş 4°C’de 1 gece inkübe edilmiş ve çözelti santrifüj edilerek fajlar çöktürülmüştür. Sonrasında pellet 100 µL iyodür tamponu (4 M NaI, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) içinde çözdürülmüş ve çözeltiliye 250 µL etanol ilave edilip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tek zincirli faj DNA’sı santrifüj işlemiyle çöktürülmüş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. DNA pelletine %70’lik soğuk etanol eklenmiş ve maksimum hızda santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Tüpteki etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pelet saf su ile çözündürülerek faj klonlarına ait DNA çözeltileri hazırlanmıştır. DNA saflığını belirlemek amacıyla çözeltiler 20 kat seyreltilmiş ve OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ‘de gösterdikleri absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Faj klonlarına ait DNA sekans analizleri RefGen Biyoteknoloji (Ankara, TÜRKİYE) firmasına yaptırılmıştır. Dizi analizlerinde peptit kütüphanesi ile sağlanan -96 gIII primer (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') kullanılmıştır.

Elde edilen DNA dizilimlerinde değişken peptit bölgelerine ait DNA dizilimi belirlenmiş ve peptitlere ait amino asit dizilimi saptanmıştır. Bu amaçla, değişken peptit bölgelerinin başlangıcındaki ve sonundaki işaretçi sekanslar belirlenmiş ve bu iki bölge arasındaki DNA dizilimi ortaya çıkarılmıştır. Bu bölgeye ait DNA dizilimindeki her bir kodona denk gelen amino asit belirlenmiş peptit dizilimleri ortaya konmuştur. Dizilimleri belirlenen peptitler, GenScript Corp. (Pistaway, A.B.D) firması aracılığıyla katı faz peptit sentezleme metodu ile %95 saflıkta sentezlenmiştir.

### **3.2.3. Seçilen Peptitlerin Histamin ile Etkileşiminin İncelenmesi**

#### **3.2.3.1. Histamin- peptit etkileşiminin termodinamik özelliklerinin incelenmesi**

Faj gösterim peptit kütüphanesi kullanılarak seçilen ve sentezlenen peptitlerin histamine gösterdikleri afinitenin belirlenmesi ve peptit-histamin etkileşiminin termodinamik açıdan incelenmesi amacıyla İTK cihazı kullanılmıştır. Peptit ve histamin çözeltileri TBS tamponu (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl) içerisinde hazırlanmıştır. HBF5, HBF10, HBF14 peptitleri tampon içerisinde çözünmediğinden sırasıyla %0.25, %0.5 ve %0.2 oranında DMSO içeren tamponda hazırlanmıştır. Bu peptitlerin histamin çözeltileri de aynı oranda DMSO içerecek şekilde hazırlanmıştır. 40 µM HBF5 ve HBF14, 400 µM histamin çözeltisi ile; 30 µM HBF10, 360 µM histamin çözeltisi ile ve 200 µM HBF26, 1mM histamin çözeltisi ile 1 µL hacimlerde ve sabit sıcaklıkta (25 °C) titre edilmiştir.

İlk enjeksiyon hacmi makromolekül ve ligand çözümleri arasında karışıklığa neden olabileceği için ilk enjeksiyon sahte sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle ilk enjeksiyon, sonraki enjeksiyonlara göre daha düşük hacimde tutulmuştur. Cihaz üreticisi tarafından tavsiye edilen, ilk enjeksiyon hatalarından kurtulmak için ilk titre, 0.2 µL ve süresi 2 sn olarak ayarlanmıştır. İlk enjeksiyon yapılmış ve buna ait ilk veri noktası veri bağlantısından çıkartılmıştır. Diğer her bir titre ise 1 µL hacimlerde, 0.2 sn boyunca ve her bir titre arası 90 sn olacak şekilde ayarlanmıştır. Bütün denemelerde histamin çözeltisi peptitleri içermeyen tampon çözeltileri ile titre edilmiş ve böylece kontrol deneyleri de gerçekleştirilmiştir.

Peptit-histamin titrasyonu ile elde edilen ısı değerleri ile kontrol denemeleri ile elde edilen ısı değerlerinin farkı histamin ile peptitler arasındaki bağlanma reaksiyonlarının ısılarını vermektedir. Bu farklar hesaplanmış ve termodinamik parametreler ile bağlanma katsayıları ORIGIN 7 SR4 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Histamine afinite gösterdiği belirlenen peptitlerin seçiciliğinin test edilmesi amacıyla yapısal olarak benzer histidin molekülü test molekül olarak seçilmiştir. Bu amaçla İTK cihazı aynı koşullarda kullanılmış ve peptit-histidin interaksyonunun termodinamik özellikleri belirlenmiştir. 30 µM HBF10, 360 µM histidin molekülü ile 200 µM HBF26, 1mM histidin molekülü içerisine 1 µL hacimlerde titre edilmiştir. Her titrasyon için kontrol denemeleri yapılmıştır.

### **3.2.3.2. Dairesel Dikroizm Spektroskopisi ile İkincil Yapı Analizi**

Histamine afinite gösterdiği belirlenen peptitlerin ikincil yapılarının belirlenmesi amacıyla CD spektroskopisi kullanılmıştır. Ölçümler 1mm'lik quartz küvet kullanılarak yapılmış ve ölçümlerde kullanılacak peptitler 50mM TBS tamponunda, 110 µM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Tek başına histamin çözeltisi ise 220 µM konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Peptitlerin serbest histamin ile etkileşimi sonucunda ikincil yapılarında bir değişiklik olup olmadığını araştırmak amacıyla, peptit-histamin karışımı hacimce 1:1 oranında hazırlanmış ve inkübe edilmiştir. Ardından bu çözeltiler CD spektroskopisi ile incelenmiştir. Örneklere ait spektrum ölçümleri için 190-250nm arasında beş defa ardarda taramalar yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. 1nm dalgaboyu aralığında ve 100 nm dk<sup>-1</sup> tarama hızında veriler alınmıştır. Tüm veriler için CD Spectra Manager ver.2 yazılım paketi ile Savitzky-Golay eşitliği kullanılarak düzeltmeler yapılmıştır.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Histamine Afinite Gösteren Peptitlerin Seçilmesi

Histamin, alerjiler ve gıda zehirlenmesiyle ilişkili biyojenik bir amindir. Gıda tazeliğinin ve kalitesinin önemli bir göstergesidir. Histamin tespiti için hassas, spesifik, hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada histamin tayininde kullanılmak amacıyla faj gösterim kütüphanesi kullanılarak histamine spesifik faj klonları seçilmiş ve afiniteleri faj-ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yüksek afinite gösterdiği belirlenen faj klonlarının DNA analiziyle peptit dizilimleri elde edilmiş ve belirlenen peptitler sentezlenmiştir. Peptitlerin biyosensör uygulamalarında kullanılmak üzere bağlanma ve termodinamik özellikleri incelenmiştir.

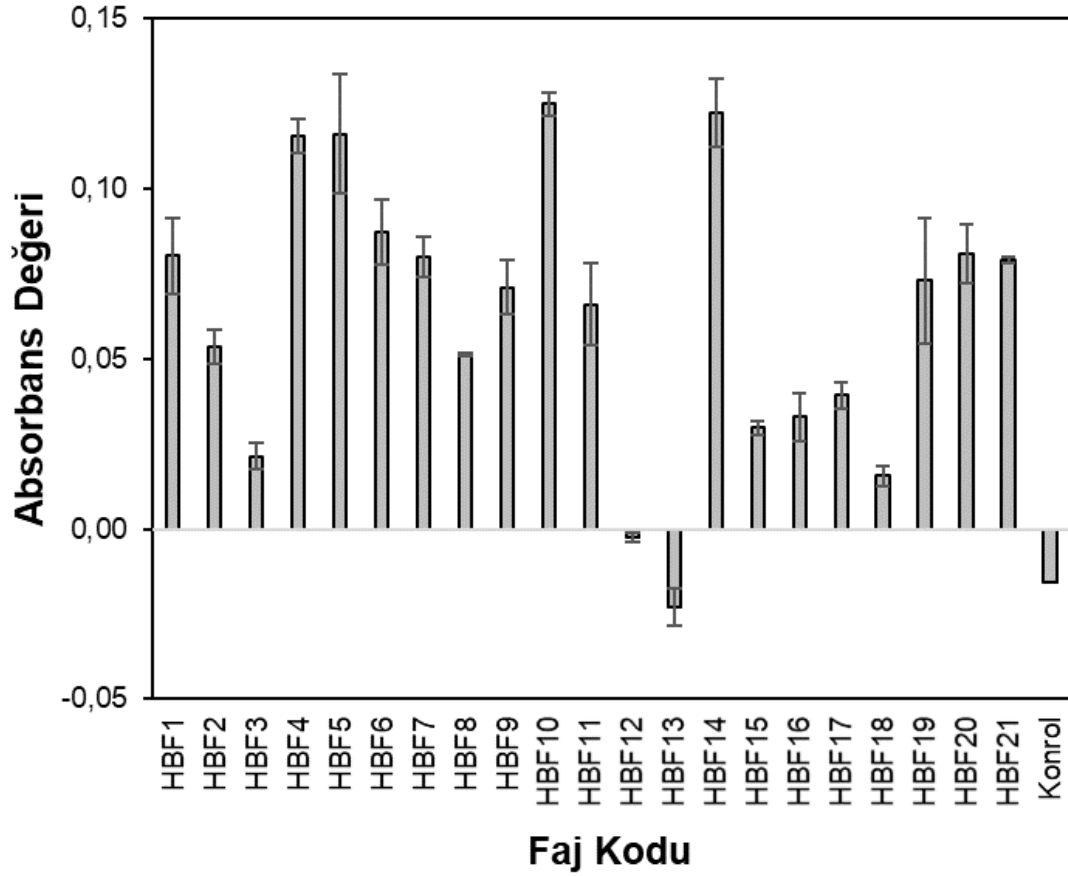
#### 4.1.1. Faj Gösterim Kütüphanesinden Faj Klonlarının Seçilmesi ve Faj-ELISA

Çalışmada bir biyojenik amin olan histamin molekülüne bağlanan faj klonlarının seçilmesi amacıyla 12-mer M13 lineer faj gösterim peptit kütüphanesi kullanılmıştır. Histamin molekülünün geri kazanılması aşamasında iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birincisinde serbest histamin molekülü kullanılmış, diğerinde ise glisin-HCl elüsyon tamponu kullanılmış ve iki farklı faj çözeltisi elde edilmiştir. 12-mer faj gösterim peptit kütüphanesinden serbest histamin elüsyon yöntemiyle 21, glisin-HCl yöntemiyle 20 faj klonu izole edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen faj klonları *E.coli* kültürü kullanılarak çoğaltılmıştır ve titreleri belirlenmiştir.

Seçim döngüleri sonucunda izole edilen faj klonlarının bağlanma özelliklerinin belirlenmesi için faj-ELISA yöntemi uygulanmış ve sonuçlar, UV-ELISA okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak kuyucuğa BSA-histamin yerine yalnızca bloklama tamponu immobilize edilirken, pozitif kontrol olarak da kuyucuğa yalnızca faj immobilizasyonu yapılmıştır. Lineer peptit kütüphanesinden serbest histamin ile elüsyon sonucu seçilen faj klonlarının histamine afinitesi Şekil 4.1.'de görülmektedir.

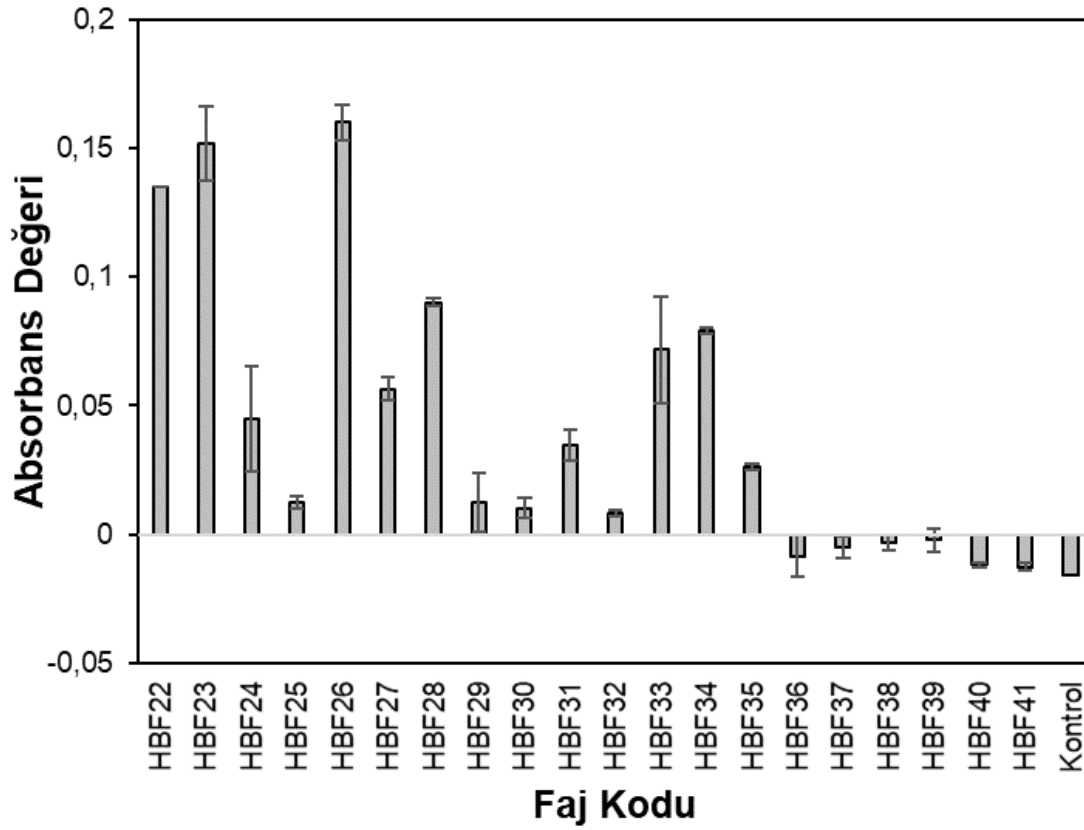
Lineer peptit kütüphanesinden serbest histamin ile elüsyon sonucu seçilen ve izole edilen 21 faj klonundan 4 tanesi (HBF4, HBF5, HBF10 ve HBF14) histamine diğerlerine göre

daha yüksek afinite göstermiştir. Geriye kalan 15 faj klonunda kayda değer bir absorbands değeri ölçülmemiştir.



Şekil 4.1. Lineer peptit kütüphanesinden serbest histamin ile elüsyon sonucu seçilen faj klonlarının faj-ELISA sonunda elde edilen absorbands değerleri

Lineer peptit kütüphanesinden glisin-HCl elüsyon yöntemi sonucu seçilen faj klonlarının histamine afinitesi Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. İzole edilen 20 faj klonundan 3 tanesi (HBF22, HBF23 ve HBF26) belirgin biçimde histamine afinite gösterirken geri kalan fajlarda önemli bir absorbands değeri okunmamıştır.



Şekil 4.2. Lineer peptit kütüphanesinden glisin-HCl elüsyonu sonucu seçilen faj klonlarının faj-ELISA sonunda elde edilen absorbans değerleri

#### 4.1.2 Seçilen Faj Klonlarının Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi

Faj-ELISA yöntemi kullanılarak, histamine afinite gösterdiği belirlenen 7 faj klonunun DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DNA saflığı için 260 nm ve 280nm’de gösterdikleri absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Saf DNA’ya ait  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı  $\sim 1.8$  olmalıdır. Düşük oranlar protein veya fenol kontaminasyonlarından kaynaklanabilmektedir. İzole edilen fajlara ait  $OD_{260}/OD_{280}$  oranları Çizelge 4.1. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İzole edilen fajlara ait OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> değerleri.

Faj kodu	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
HBF4	0.979	0.583	1.68
HBF5	0.506	0.232	2.17
HBF10	0.399	0.181	2.19
HBF14	0.660	0.400	1.65
HBF22	0.901	0.483	1.86
HBF23	0.386	0.143	2.68
HBF26	0.306	0.130	2.35

Seçilen faj klonlarının (HBF4, HBF5, HBF10, HBF14, HBF22, HBF23, HBF26) DNA çözeltileri başarı ile hazırlanmıştır. Faj klonlarına ait DNA sekans analizleri RefGen Biyoteknoloji (Ankara, TÜRKİYE) firmasına yaptırılmıştır. Elde edilen verilerle fajların değişken bölgelerine ait DNA dizilimi belirlenmiş ve her bir kodona denk gelen amino asit belirlenerek peptit dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Bu bölgeye ait DNA dizilimindeki Seçilen 7 faj klonunun peptit dizilimleri Çizelge 4.2.' de gösterilmiştir.

Birbirinden farklı aminoasit dizilimlerine sahip olduğu belirlenen peptitlerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla ExPASy çevrimiçi sunucusu kullanılmıştır [106]. Peptitlerin moleküler ağırlığı, kararsızlık indeksi, genel ortalama hidropatisitesi ve teorik izoelektrik noktaları sunucudaki "ProtParam" aracı kullanılarak elde edilmiştir ve Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Bir peptitin hidrofobiklik değerini temsil etmek için genel hidropatiklik indeksi ortalaması kullanılır. Bu değer, tüm amino asitlerin hidropati değerlerinin [107] toplamının dizi uzunluğuna bölünmesi ile hesaplanır ve pozitif değer artması, daha büyük bir hidrofobikliği göstermektedir. Analiz edilen peptitlerin tümü birbirine yakın hidropatisite değerine sahiptir.

Çizelge 4.2. Faj- ELISA yöntemi ile seçilen faj klonlarının değişken bölgelerine ait peptit sekansları

Peptit kodu	DNA baz dizilimi	Peptit dizilimi
HBF4	5'..ATG GAT GGG CGT CCT CAT ATT AAG TAT AAT TAT AGG..3'	MDGRPHIKYNYR
HBF5	5'..TGG GAG ACT TGT GTT CAT CTT TGG GAT TGT CAG CGT..3'	WETCVHLWDCQR
HBF10	5'..TCT GGG TTT CGG GAT GGG ATT GAG GAT TTT CTG TGG..3'	SGFRDGIEDFLW
HBF14	5'..ACT ACG CAG GAT ATG TGG AAT TTT TGG TGG CAT TCG..3'	TTQDMWNFWWHS
HBF22	5'..GGG TCT TGG CTT GTT CGG GAG AGT GCT AAG ATT AGG..3'	GSWLVRESAKIR
HBF23	5'..ACT ACT TTG TGG CTT GAT AGG GAT GAG GCT TTG AAG..3'	TTLWLDREALK
HBF26	5'..ATT CCT CTT GAG AAT CAG CAT AAG ATT TAT TCG ACG..3'	IPLNQHKIYST

Elde edilen dizilimler incelendiğinde peptitlerin aromatik halka içeren, fenilalanin (F), tirozin (Y) ve triptofan (W) amino asitlerinden en az birini içerdiği görülmektedir.

Yapılarında asidik amino asitlerin bulunduğu HBF5, HBF10 ve HBF14 düşük pI değerine sahipken, HBF4 ve HBF22'nin yüksek pI değerine sahip olduğu görülmektedir. HBF26'nın ise yapısındaki asidik ve bazik amino asitlerin sayısının birbirine eşit olduğu ve teorik pI değerinin 6.75 olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Histamine afinite gösteren peptitlerin fizikokimyasal özellikleri

<b>Peptit</b>	<b>Negatif Yüklü Aminoasit Sayısı</b>	<b>Pozitif Yüklü Aminoasit Sayısı</b>	<b>Teorik pI</b>	<b>Genel ortalama hidropatisite</b>	<b>Stabil olmama indeksi</b>
HBF4	1	3	9.69	-1.775	40.67
HBF5	2	1	5.32	-0.642	16.33
HBF10	3	1	4.03	-0.300	68.21
HBF14	1	0	5.05	-1.158	36.43
HBF22	1	3	10.84	-0.417	28.43
HBF23	3	2	4.56	-0.667	25.82
HBF26	1	1	6.75	-0.767	13.14

Faj gösterimi güçlü bir yöntemdir ancak hedefe ilgisiz peptidlerin kontaminasyonun belirlenmesi önemlidir. Geleneksel faj gösterim deneylerinde polistren yüzey kullanılmaktadır, dolayısıyla spesifik olmayan bağlanma ile seçilebilecek polistiren bağlayan peptitlerin diğer hedef peptitlerden ayrılması gerekmektedir [108]. Bu nedenle dizilimi belirlenen peptitler SAROTUP çevrimiçi yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Yazılım, peptitlere ait dizilimlerden, polistren yüzey bağlama olasılıklarını tahmin etmektedir [109]. Buna göre, HBF22 peptidine ait dizilimin polistren yüzeyine bağlanmaya yatkın olabileceği görülmüştür bu nedenle sentezlenmemiştir. Ayrıca tüm dizilimler MimoDB veri bankası taraması yapılmış ve peptit dizilimleri ile örtüşen kayıtlı herhangi bir peptit dizilimine rastlanmamıştır [110]. Diğer peptitlerden HBF10, HBF14 ve HBF26 bağlanmada etkili olabilecek polar veya apolar özellikte aminoasit içeren uç kısımlara sahip olduğu için ve HBF5 ise diğer peptitlere göre teorik olarak daha stabil olduğundan sentezlenmesine karar verilmiştir.

## 4.2. Histamin-peptit etkileşiminin termodinamik özelliklerinin incelenmesi

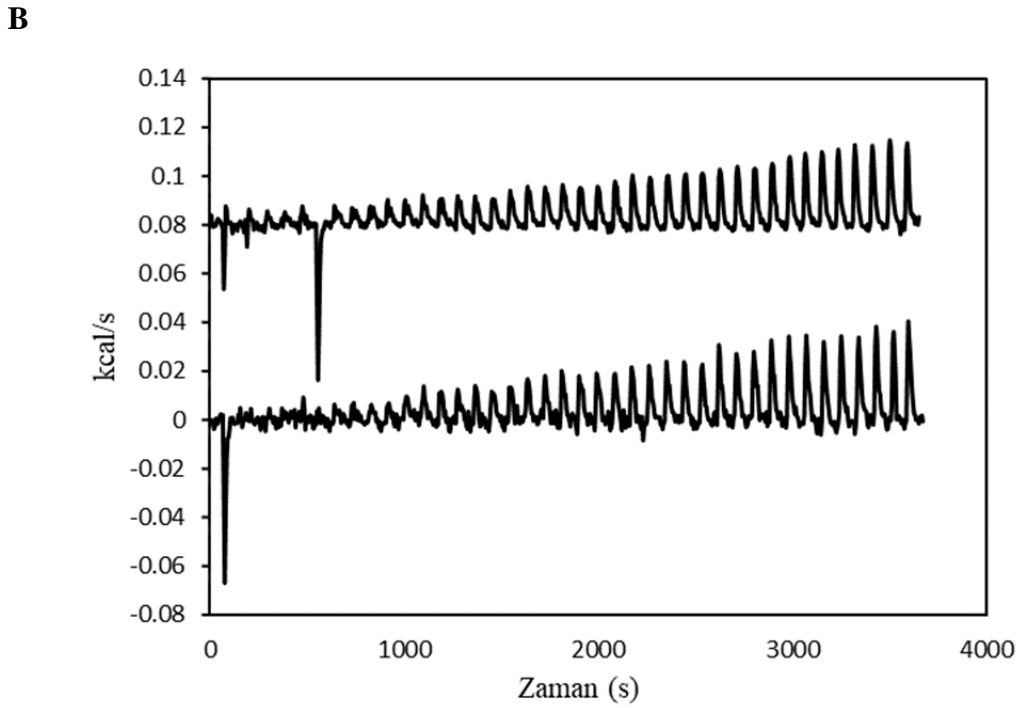
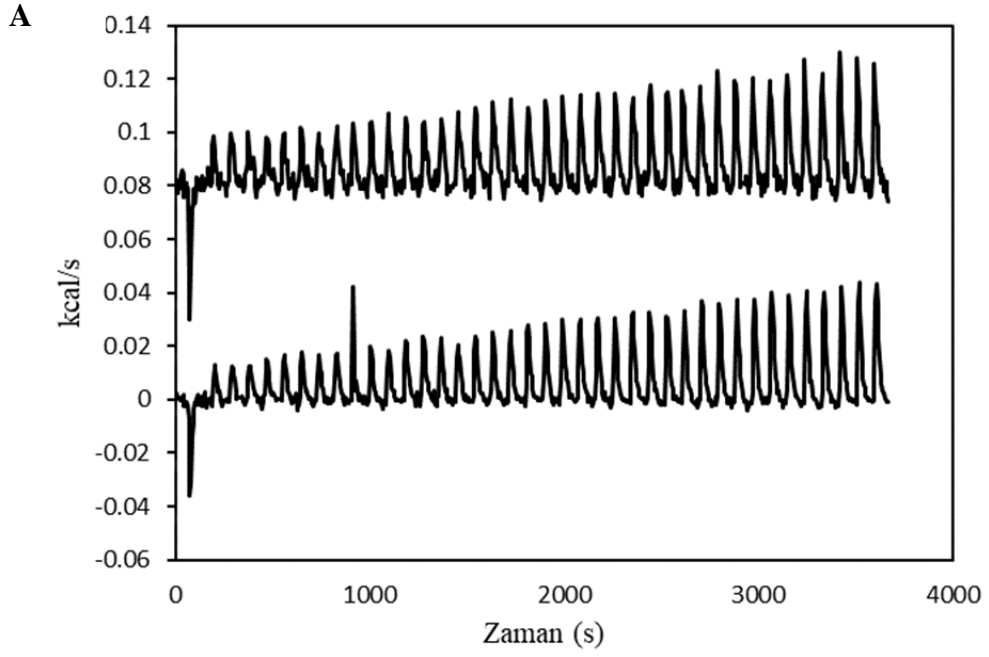
Çözeltideki immobilize olmayan moleküllerin bağlanma etkileşimlerini incelemek, izlemek, karakterize etmek için en önemli ve sık kullanılan teknikler, İTK ve CD spektroskopisidir [73]. Histamine afinite gösteren fajlardan sekansları belirlenmiş 12 amino asit uzunluğundaki 4 peptit (HBF5, HBF10, HBF14, HBF26) katı faz yöntemi ile sentezlenmiştir. Peptit HBF26 su içerisinde çözünürken diğer tüm peptitler DMSO çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür.

### 4.2.1. Peptit-Histamin Kompleksinin Termodinamik Özellikleri ve Bağlanma Kinetiği

İTK, tek bir titrasyondan temel termodinamik parametrelerin belirlenebilmesinin yanında, çözelti içinde gerçekleşen bağlanma olayı için herhangi bir immobilizasyon, modifikasyon veya etiketleme ve moleküler ağırlık kısıtlamaları olmaksızın kullanılabilir [111]. Ayrıca ölçümler yüksek hassasiyete sahiptir; düşük ve yüksek bağlanma sabitine sahip etkileşimleri, 0.1 µcal kadar küçük ısı değişimlerini ve 0.1 µcal s<sup>-1</sup>'e kadar olan küçük ısı oranlarını ölçebilmektedir [112]. Bu nedenlerle histamin gibi küçük molekül ağırlığına sahip bir molekülün peptitler ile olan etkileşiminin termodinamik özellikleri İTK cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir.

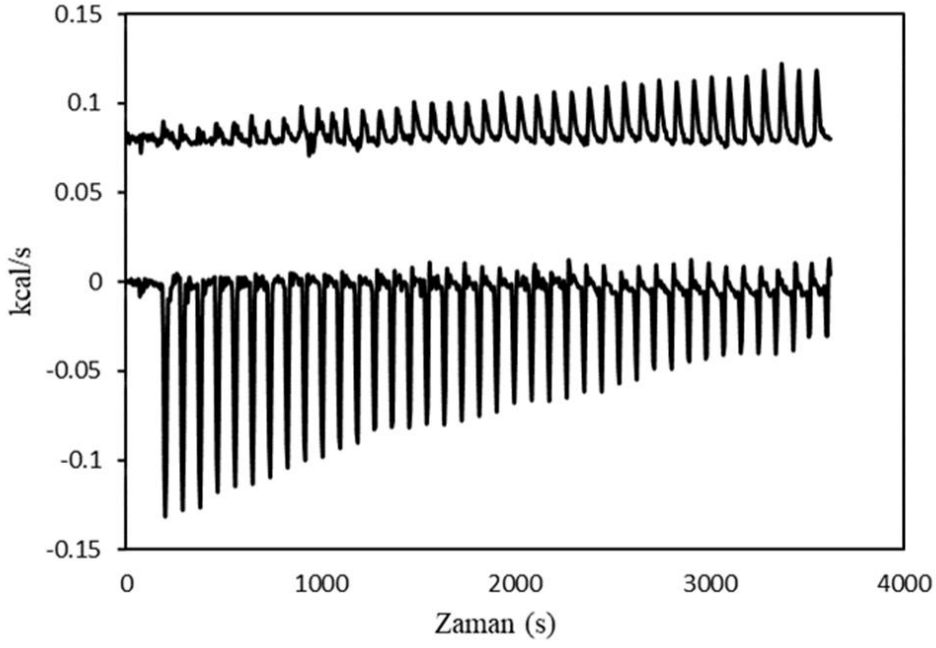
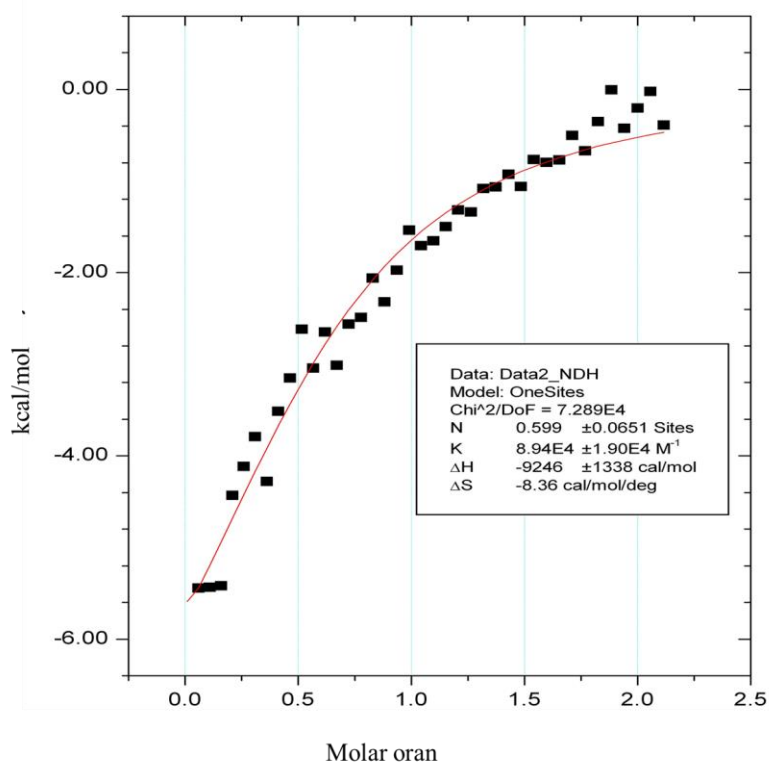
Deneyler sonucunda elde edilen termogramlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.3-4.6). Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisinde histamin çözeltisinin titrasyonunu gösterirken, alttaki eğriler peptit çözeltisi içerisinde histamin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir.

HBF5 ve HBF14 peptitlerini kodlayan fajlar, faj-ELISA deneyleri sırasında histamine yüksek afinite göstermektedir. Fakat her iki peptitin de ölçümler sırasında bağlanma profili göstermediği İTK termogramları ile ortaya konulmuştur (Şekil 4.3 ve Şekil 4.5). Bunun nedeninin, faj kılıfı üzerinde bulunan peptitin konformasyonel ve afinite özelliklerinin sentezlenen peptit ile aynı olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

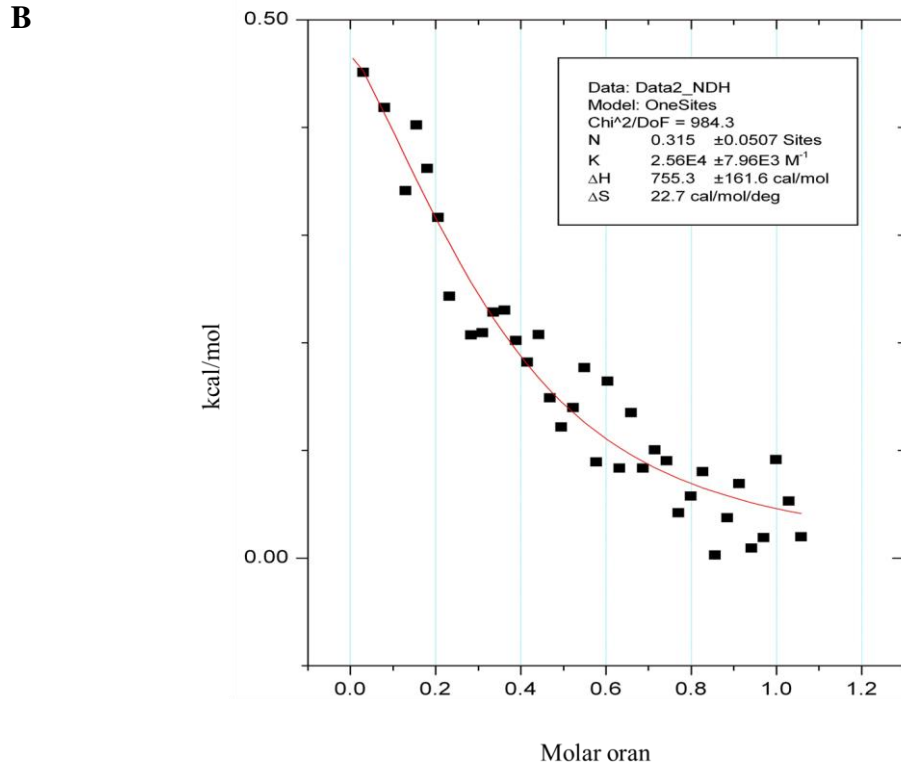
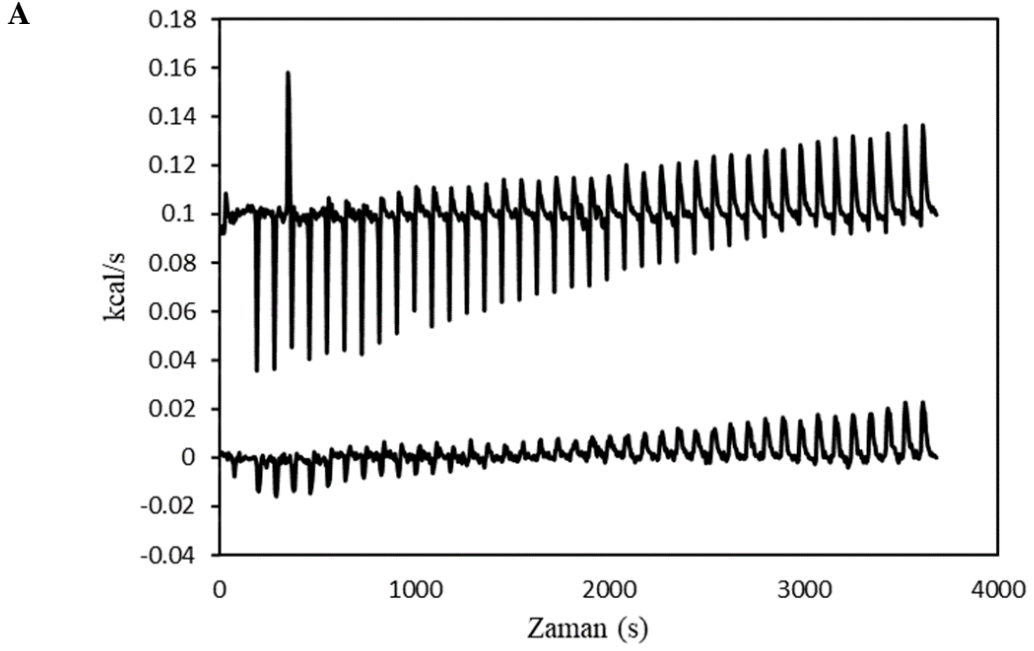


Şekil 4.3. A) Serbest histaminin HBF5 peptiti ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. B) Serbest histaminin HBF14 peptiti ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisinde, alttaki eğriler ise peptit çözeltisi içerisinde histamin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir.



**A****B**

Şekil 4.4. A) Serbest histaminin HBF10 peptidi ile titrasyonu ile elde edilen İTK termogramları. Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisinde, alttaki eğriler ise peptid çözeltisi içerisinde histamin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir. B) Histamin-HBF10 peptidi bağlanmasına ait grafik ve termodinamik özellikler



Şekil 4.5. A) Serbest histaminin HBF26 peptitleri ile titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisinde, alttaki eğriler ise peptit çözeltisi içerisinde histamin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir. B) Histamin-HBF26 peptidi bağlanmasına ait grafik ve termodinamik özellikler

İTK deneyi ile tespit edilen ısı değişiminin, sadece bağlanma reaksiyonları sırasında alınan veya salınan ısıyı değil, aynı zamanda ligand ve proteinin seyreltilmesinden kaynaklanan ısı etkileri, farklı bileşenler içeren iki çözeltinin karıştırılması, numune hücresi ve şırınga arasındaki sıcaklık farkları vb. gibi ligand eklendikten sonra numune hücresinde meydana gelen toplam ısı etkisi olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, kompleks oluşum ısısını elde etmek için bu spesifik olmayan ısı etkilerini belirlemek için kontrol deneylerinin de gerçekleştirilmesi gerekmektedir [113]. Bu nedenle peptitler ve histamin arasındaki bağlanma reaksiyonlarına ait ısı değerlerini elde etmek için seyrelme ısı değerleri, titrasyondan elde edilen ısı değerlerinden çıkarılmıştır.

İTK titrasyon eğrisi ile doğrudan entalpi değişimi ( $\Delta H$ ), bağlanma stokiyometrisi (N) ve bağlanma sabiti (K) elde edilmiş;  $\Delta G$  ve  $\Delta S$ , aşağıdaki denklemlerden (1,2) türetilmiştir.

$$\Delta G = -RT \ln (K) \quad (1)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (2)$$

Termodinamik parametrelerin belirlenmesi ve bağlanma katsayılarının hesaplanması amacıyla uygun bağlanma modeli olarak tek yanlı bağlanma modeli (one site binding model) kullanılmıştır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.4.' te gösterilmiştir.

Entalpi, termodinamik bir sistemin toplam enerjisinin bir ölçüsüdür [114]. Bir bağlanma sürecinde  $\Delta H$ , ligand proteine bağlandığında sistemin enerji değişimini yansıtmaktadır. Bağlanma entalpisi, genellikle bağlanma arayüzünde gerçekleşen etkileşimlerin (Van der Waals bağları, hidrojen bağları, iyon çiftleri ve diğer polar ve apolar etkileşimler) oluşumlarından kaynaklanan enerji değişiklikleri olarak ele alınmaktadır [113]. Çizelge 4.4 'de hesaplanan  $\Delta H$  değerleri incelendiğinde, HBF26 peptiti düşük ve pozitif bir bağlanma entalpisi gösterirken, HBF10 peptiti ise daha yüksek ve negatif bir bağlanma entalpisi göstermektedir. Buna göre, HBF26-peptit kompleksinin oluşumu endotermik bir reaksiyonken, HBF10 peptiti ile oluşan kompleksin ekzotermik bir reaksiyon olduğu görülmektedir.

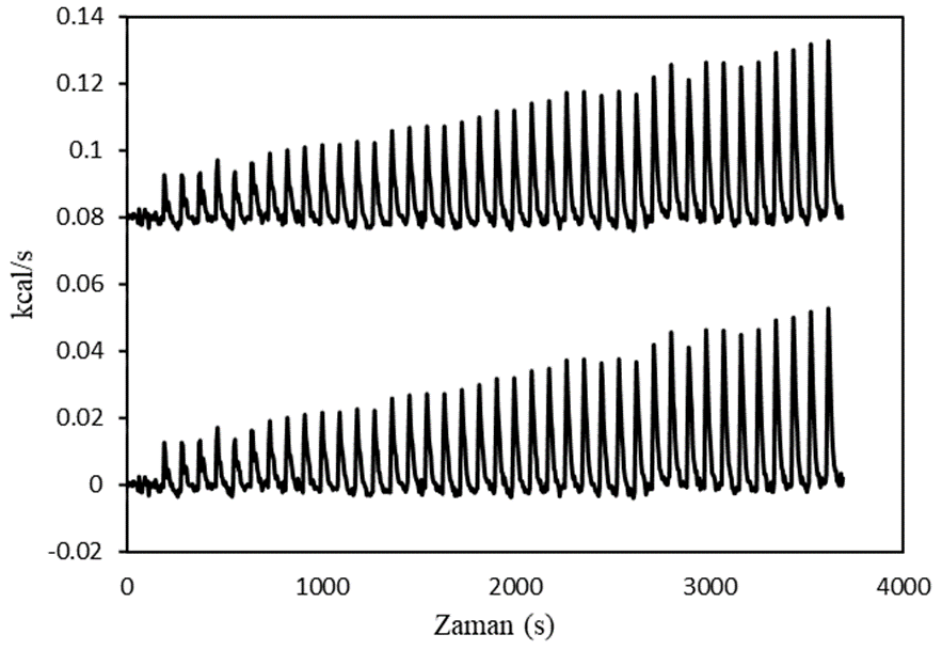
Çizelge 4.4. Histamine-peptit interaksiyonunun termodinamik özellikleri (K; bağlanma katsayısı,  $\Delta G$ ; Gibbs serbest enerjisi,  $\Delta H$ ; bağlanma entalpisi,  $\Delta S$ ; bağlanma entropisi ve n bağlanma stokiyometrisi )

Peptit Kodu	K(M <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	n
<b>HBF5</b>	-	-	-	-	-
<b>HBF10</b>	8.94x10 <sup>4</sup> ± 1.90x10 <sup>4</sup>	-38.7 ± 5.6	-28.2	-35.0	0.59
<b>HBF14</b>	-	-	-	-	-
<b>HBF26</b>	2.56x10 <sup>4</sup> ± 7.96x10 <sup>3</sup>	3.1 ± 0.6	-25.21	95.0	0.31

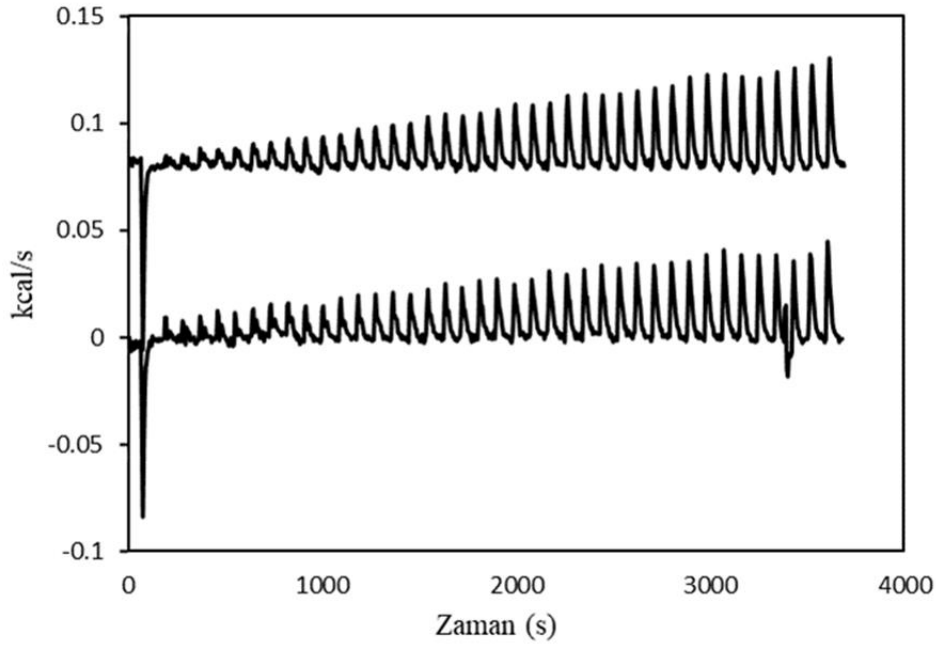
HBF26 peptitinin histamin molekülüne karşı 2.56x10<sup>4</sup> (M<sup>-1</sup>) bağlanma katsayısı ile HBF10'un ise 8.94x10<sup>4</sup> (M<sup>-1</sup>) katsayısı ile bağlandığı görülmekte ve böylece HBF26 peptitinin HBF10'a göre daha zayıf bir bağlanma profiline sahip olduğu görülmektedir.

Bir sistemin termodinamik bir özelliği olan  $\Delta S$ , pozitif ve negatif işaretlere sahip olabilir, bu işaretler sırasıyla sistemin düzensizlik derecesindeki genel artışı ve azalmayı göstermektedir [113]. Histamin-HBF10 peptit kompleksinin oluşum  $\Delta S$  değerinin ve  $\Delta H$  değerinin negatif olduğu görülmektedir. Histamin-HBF26 peptit kompleksinin oluşum  $\Delta S$  değerinin diğer peptide göre büyük ve pozitif,  $\Delta H$  değerinin ise küçük ve pozitif değerde olduğu görülmektedir. Pozitif ve yüksek entropi değişimlerinin açıklanabilmesi için, hidrasyondaki önemli değişikliklerin, konformasyonel değişikliklere eşlik etmesi gerekmektedir [115]. HBF26 peptidinin bir ucunda sırasıyla apolar aminoasitlerden olan izolösin, prolin ve lösin bulunmaktadır. Entropinin bu şekilde yüksek ve pozitif olmasının etkileşime katılan apolar aminoasitlerin hidrofobik özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Histamine bağlanma özelliği gösteren HBF10 ve HBF26 peptitlerinin seçiciliğinin incelenmesi amacıyla peptit-histidin etkileşimi İTK cihazı ile analiz edilmiştir. Elde edilen titrasyon eğrileri Şekil 4.7.'te gösterilmiştir. Verilen grafiklerde üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisine histidin çözeltisinin titrasyonunu gösterirken, alttaki eğriler peptit çözeltisi içerisine histidin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir. Peptitler ve histidin arasındaki bağlanma reaksiyonlarına ait ısı değerlerini elde etmek için seyrelme ısı değerleri, titrasyondan elde edilen ısı değerlerinden çıkarılmıştır. Ancak her iki peptitin de histidine karşı herhangi bir afinite göstermediği görülmüştür.



Şekil 4.6. Serbest histidin- HBF10 peptit titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisine histidin çözeltisinin titrasyonunu, alttaki eğriler ise peptit çözeltisi içerisine histidin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir.

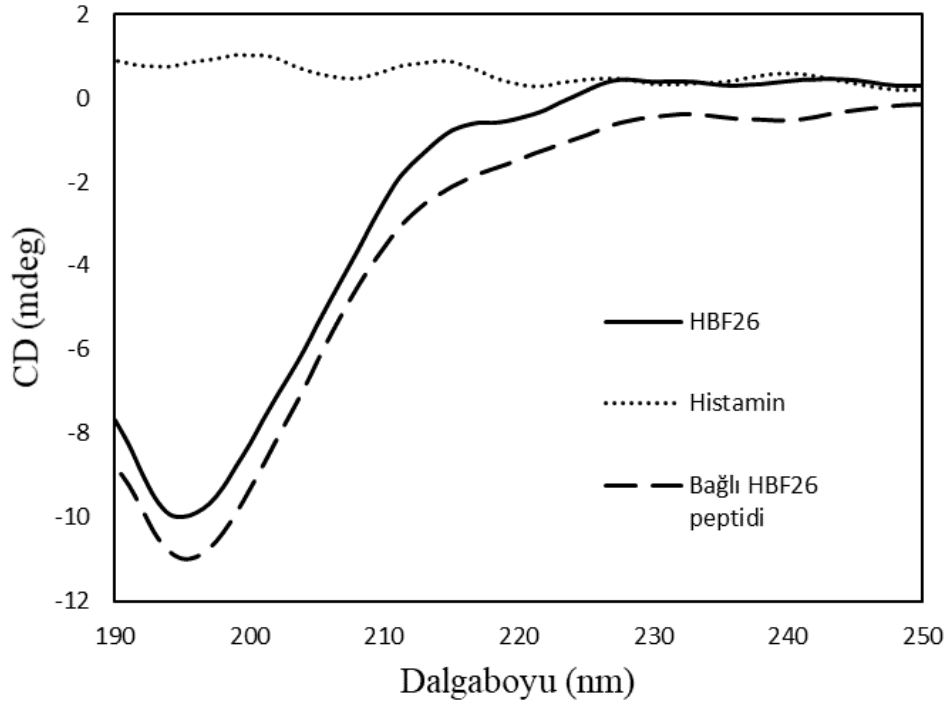


Şekil 4.7. Serbest histidin- HBF26 peptit titrasyonu sonucunda elde edilen İTK termogramları. Üstteki eğriler tampon çözeltisi içerisinde histidin çözeltisinin titrasyonunu, alttaki eğriler ise peptit çözeltisi içerisinde histidin çözeltisinin titrasyonunu göstermektedir.

#### 4.2.2. Seçilen Peptitlerin İkincil Yapı Analizi

CD, proteinler, peptitler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipidler gibi biyolojik olarak önemli moleküllerin yapısal karakterizasyonunu yapmak için tercih edilen tekniktir [116]. Az miktarda numune kullanılarak, immobilizasyona ve etiketlemeye gerek duymadan bir biyomolekül çözeltisindeki bağlanma etkileşimlerinin araştırılmasına da olanak vermektedir [116, 117]. Bu nedenle, histamine afinite gösteren peptitlerin CD spektroskopisi aracılığıyla ikincil yapıları belirlenmiş ve peptit-histamin etkileşiminin peptit yapılarında bir değişikliğe neden olup olmadığı incelenmiştir.

Histamine afinite gösterdiği belirlenen peptitlerden, HBF26 peptiti hariç diğer peptitlerin tampon çözeltileri içerisinde bulunan DMSO'nun girişimi nedeniyle CD ölçümleri alınamamıştır. HBF26'ya ait tarama sonuçları Şekil 4.8' te gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Serbest histamine, HBF26 peptidine ve histamin ile etkileştirilmiş HBF26 peptidine ait CD spektrumları

CD spektroskopisinin çözünür proteinler tarafından ligand bağlanması çalışmaları için oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir [118, 119]. Histamin - peptit etkileşimi sonrası peptit yapısındaki değişimin araştırılması amacıyla, histamin ile inkübe edilmiş peptidin de spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlar serbest haldeki peptite ait spektrumlar ile karşılaştırılmıştır. Bağlı haldeki peptite ait CD spekturumunu elde etmek amacıyla, histamin-HBF26 kompleksine ait spektrumlardan histamine ait spektrumlar çıkartılmıştır (Şekil 4.8.).

HBF26 peptidine ait spektrum 195 nm civarında negatif eliptisite göstermektedir. Kısa peptitler için alınan CD ölçümlerinin, rastgele sarmal biçimlerinin özelliği, ~195 nm'de ortalananmış geniş bir negatif eliptisite göstermesidir [120, 121]. Bu da HBF26 peptidinin rastgele sarmal yapısının baskın olduğunu ortaya koymaktadır.

Serbest haldeki ve histamin ile etkileşim sonrası HBF26 peptidine ait CD spektrogramunun hesaplanmış eğrisi ve ikincil yapı bileşenleri BeStSel çevrimiçi yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır [122].

Hesaplama 190-250 nm dalgaboyu aralığındaki veriler kullanılarak yapılmıştır. İkincil yapı analizinde elde edilen verilerde ölçüm birimi eliptisite (mdeg), örnek konsantrasyonu 55.44  $\mu$ M, peptit uzunluğu 12 amino asit ve kullanılan ışık yolu uzunluğu 0.1 cm olarak belirtilmiştir. Hesaplama sonunda dalgaboyuna karşı  $\Delta\epsilon$  değerine ait grafikler elde edilmiştir. BeStSel yazılımı kullanılarak elde edilen peptite ait uydurma eğriler EK- Şekil 1.1 ve 1.2’de gösterilmiş ve ikincil yapı bileşenlerine ait veriler Çizelge 4.5 ’te verilmiştir.

Çizelge 4.5. HBF26 peptiti ve histamin-HBF26 peptit kompleksine ait ikincil yapı oranları

	$\alpha$ -heliks (%)	Antiparalel $\beta$ – zincir (%)	Paralel $\beta$ – zincir (%)	Döngü (%)	Rastgele Sarmal (%)	NKOS*
<b>HBF26</b>	0	31.9	0	13.3	54.8	0.020
<b>Bağlı HBF26</b>	2.2	27.9	7.9	15.1	46.9	0.020

\*Normalize karekök ortalama sapma

Yazılımda  $\alpha$ -heliksler, düzenli ve düzensiz olmak üzere iki bileşene ayrılmaktadır. Ayrıca paralel  $\beta$ -tabakaları antiparalel olanlardan ayrı verilmektedir [123]. Antiparalel  $\beta$ -tabakaları, bükülmeler dikkate alınarak; sola bükülmüş, gevşetilmiş (hafifçe sağa bükülmüş) ve sağa bükülmüş (+ 3 ° ve + 23 ° büküm açıları sınırlarını kullanarak) olarak üç bileşene ayrılmaktadır. Son iki bileşen dönüş ve "diğerleri" dir [124]. Rastgele sarmal olarak kabul ettiğimiz “diğerleri”;  $3_{10}$ -heliks,  $\pi$ -heliks,  $\beta$ -köprü, ilmek (loop)/ düzensiz ve yapının görünmeyen bölgelerini temsil etmektedir [125].



Çizelge 4.5'te verilen sonuçlara göre, HBF26 peptiti için rastgele sarmal yapının ve  $\beta$ -konformasyonunun baskın olduğu görülmektedir. Bunun yanında  $\alpha$ -heliks yapısı gözlenmemiştir. Kısa peptitlerin modellenmesi sırasında yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinlere ait referans setlerin kullanılmasından dolayı peptitlerin ikincil yapısındaki  $\beta$ -zincir konformasyonunun oranı yüksek olabilmektedir [126]. Ancak, çizelgedeki diğer oranlara bakıldığında, HBF26 peptitinin rastgele sarmal yapının daha baskın olduğu görülmektedir.

Histamin-HBF26 kompleksine ait spektrumlardan histamine ait spektrumlar çıkartılması ile elde edilen spektrumlara ait veriler, histamin-peptit interaksyonu sonrasında peptit yapısındaki değişimin incelenmesinde kullanılmıştır. Bunun için serbest ve bağlı HBF26 peptidine ait spektrumlar karşılaştırılmıştır. Spektrumlar arasında büyük farklılıklar olmadığı görülmektedir. Buna bağlı olarak peptitin histamin ile etkileşiminin peptit yapısında önemli bir değişime neden olmadığı söylenebilir.

Serbest haldeki HBF26 peptiti ile histamin interaksyonu sonucunda bağlı haldeki HBF26 peptidine ait ikincil yapı oranları incelendiğinde, rastgele sarmal yapı oranında önemli bir düşüş olduğu görülmektedir. Ayrıca paralel  $\beta$ -zincir ve döngü yapısında artış meydana geldiği ve düşük oranda  $\alpha$ -heliks yapısının oluştuğu belirlenmiştir. HBF26 peptitindeki tüm bu değişimler, etkileşim sonucunda peptitin daha düzenli bir yapıya dönüştüğünü ortaya koymaktadır. Düzenli yapı ise daha stabil bir histamin-HBF26 peptit kompleksinin oluşmasına olanak sağlamaktadır.

Sonuç olarak histamine bağlanan 12 amino asit uzunluğunda birbirinden farklı dizilime sahip iki adet (HBF10 ve HBF26) peptit seçilmiştir. Peptitlerin bağlanma katsayıları HBF10 için  $\sim 10^5$  ( $M^{-1}$ ), HBF26 için  $\sim 10^4$  ( $M^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır. Seçilen peptitlerin histamine yapıcı benzer olan histidin amino asitine afinite göstermediği görülmüştür. Faj gösterim teknolojisi ile histamin molekülüne afinite gösteren yapay tanıyıcı peptitlerin seçilmesi ve bağlanma özelliklerinin incelenmesi bakımından, literatürde bir ilk olma özelliğine sahiptir.

## 5. YORUM

Canlı sistemlerde ve çevresel maddelerde aminlerin tespiti endüstri, tıp, çevre bilimi ve kimyasal ve biyokimyasal araştırmalar için önemli bir problemdir [127]. Yiyecek ve içeceklerde karşılaşılan başlıca biyojenik aminlerden biri de histamin olmaktadır. Biyojenik aminleri yüksek miktarda içeren gıdaların tüketilmesinin toksikolojik sonuçlara sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından histamin tayininin hızlı ve hassas yapılması kritik öneme sahiptir.

Geleneksel tayin yöntemlerinin yanında, biyolojik tanıyıcı ajan olarak histamin spesifik enzimler veya antikorların kullanıldığı biyosensörler ve biyoanaliz kitlerine dair yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. Bu analiz yöntemleri, histaminin hızlı ve hassas tayinini olanaklı kılmaktadır fakat üretimlerinin zahmetli ve maliyetli olması önemli bir dezavantajdır. Ayrıca çevresel etmenler (sıcaklık, pH veya iyonik kuvvet gibi) ile aktivite kayıpları yaşamaları, sentezlenebilen biyomoleküllerin (yapay tanıyıcıların) biyoanaliz sistemlerinde tanıyıcı ajan olarak kullanılmasını popüler bir alan haline getirmiştir. Faj ve hücre yüzeyi görüntüleme yöntemleri gibi afinite bazlı peptit taraması, hedef moleküller için spesifik afinitelere sahip peptitlerin üretilmesini ortaya çıkarmıştır [97]. Geliştirilen bu yapay tanıyıcı ajanlar, birçok biyoanaliz sisteminde kullanılmaktadır. Peptitlerin, amino asitlerin çeşitli kimyasından kaynaklanan çok çeşitli hedef moleküller için reseptörler olarak daha uygun olduğu bir gerçektir [100]. Peptit ligandları, özgüllük, stabilite ve yüksek afinite, ucuz ve hayvan dostu üretim süreçleri gibi dikkate değer özelliklere sahiptir [104].

Faj gösterim yöntemi çeşitli hedef moleküllere seçici olarak bağlanan yapay tanıyıcı ajanların geliştirilmesine imkân tanıyan bir teknolojidir. Tez kapsamında faj gösterim yöntemi kullanılmış ve histamine spesifik yapay tanıyıcı ajan olarak, 12 amino asit uzunluğunda peptit ligandlar seçilmiş ve incelenmiştir.

Faj gösterim yönteminde üç seçim döngüsü uygulanmış ve son seçim döngüsünde yıkama işleminden sonra histamine daha seçici olan faj klonlarının seçilmesi amacıyla, histidin elüsyonu yapılmış ve histidine bağlanan fajlar elimine edilmiştir. Histamine bağlanan, serbest histamin elüsyonu yöntemiyle 21, glisin-HCl yöntemiyle 20 faj klonu olmak üzere

toplamda 41 adet faj klonu izole edilmiştir. Seçilen faj klonlarının histamine afinitesi, faj-ELISA yöntemiyle incelenmiş ve serbest histamin yönteminden en yüksek afinite değerine sahip 4, glisin-HCl yönteminden 3 olmak üzere toplamda 7 faj klonuna ait DNA'lar izole edilmiştir. Fajların değişken bölgelerine ait DNA baz dizilimlerinden, amino asit dizilimleri ve böylece peptitlerin dizilimleri belirlenmiştir, incelenmiştir. Peptit sekansları arasında herhangi bir dizilim benzerliği veya tekrarlanan motif bulunmadığı görülmüştür. Toplamda histamine afinite gösteren 7 farklı peptit (12 amino asit uzunluğunda) belirlenmiştir ve bunlardan 4 tanesi sentezlenmiştir.

Faj gösterim yöntemiyle seçilen 4 farklı peptitin histamin molekülüne olan afiniteleri İTK sistemi kullanılarak incelenmiştir. Histamin molekülü ile peptit ligandların arasındaki etkileşimin termodinamik özellikleri yapılan titrasyon denemeleri ile elde edilmiştir.

Histamin- peptit etkileşimine ait elde edilen İTK deney sonuçlarından, HBF26 peptitinin histamin molekülüne karşı  $2.56 \times 10^4$  ( $M^{-1}$ )  $K_a$  değeri ile HBF10'un ise  $8.94 \times 10^4$  ( $M^{-1}$ ) değeri ile bağlandığı görülmektedir. Bu veriler ışığında, HBF26 peptitinin HBF10'a göre daha zayıf bir bağlanma profiline sahip olduğu söylenebilir.

Peptit ligandların küçük organik moleküllere bağlanma afinitelerinin belirlenmesi için İTK sisteminin başarı ile kullanılabilirdiği bilinmektedir. Örneğin Jaworski ve ark., faj gösterim yöntemi kullanarak seçmiş oldukları peptitin saf asetonitril içinde trinitrotoluene ile etkileşimine ait  $K_a$  değerini  $1.4 \times 10^7$  ( $M^{-1}$ ) olarak hesapladıkları bildirilmiştir [100]. Yapılan bir başka çalışmada ise faj gösterim yöntemi ile nano yapıdaki selüloza bağlanan peptitler seçilmiş ve İTK denemelerinde  $K_a$  değeri  $\sim 10^5$  ( $M^{-1}$ ) bulunmuş ve bu değer floresan söndürme ölçümlerinden elde edilen değer ile aynı aralıkta olduğu belirtilmiştir [128]. Küçük organik moleküllere bağlanan peptitlere ait İTK sonuçlarının yine küçük organik bir molekül olan histamin ile peptit etkileşimlerine ait  $K_a$  değerleri ile yakın aralıkta olduğu söylenebilir.

Titrasyon sonuçlarına göre HBF10 ve HBF26 peptitlerinin histamin molekülü ile etkileşime girdiği görülmüştür. HBF26 peptitine ait bağlanma entalpisi değeri  $+3.1$  kJ mol<sup>-1</sup> iken, HBF10 peptitine ait bağlanma entalpisi değeri  $-38.7$  kJ mol<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, HBF26-histamin kompleksinin oluşumunun endotermik bir

reaksiyon olduğu ve HBF10-histamin kompleksinin ise ekzotermik bir reaksiyon olduğu belirlenmiştir.

Kompleks bileşenleri arasında meydana gelen kovalent olmayan etkileşimlerden kaynaklanan bağlanma, büyük bir negatif  $\Delta H$  değerine sahipse, bu duruma etkileşim halindeki bileşenlerin hareketliliğinin kısıtlanması nedeniyle negatif bir  $\Delta S$  değeri eşlik etmektedir [129]. Histamin-HBF10 peptit etkileşimine ait termodinamik parametreler incelendiğinde negatif  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  ve  $\Delta G$  değerine sahip olduğu görülmektedir. HBF10 peptiti ile histamin arasındaki bağlanma, kovalent olmayan etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir.

Ligand-protein bağlanmasının  $\Delta S$ ' in çeşitli etkilerin toplamı olarak ifade edilebileceği bilinmektedir. Bunlardan en önemlisi, çözücü etkileriyle ilgilidir. Pozitif bir entropi değişikliği, genellikle su moleküllerinin kompleks yüzeyinden salındığının güçlü bir göstergesidir [130]. HBF26 peptit- histamin etkileşimi pozitif entropi değişimi değerine, + 95.0 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, sahiptir. Bu nedenle etkileşimde hidrasyon etkisinin görüldüğü düşünülmektedir.

Sistemin  $\Delta G$  değeri ve kompleks oluşumu ile bağlanmamış haldeki serbest durum arasındaki serbest enerji farkının derecesi (yani, bağlanma üzerine negatif serbest enerji değişiminin büyüklüğü) kompleksin kararlılığını belirlemektedir [113]. HBF10 ve HBF26 peptitlerinin bağlanmasına ait  $\Delta G$  değeri sırasıyla, -28.2 kJ mol<sup>-1</sup> ve -25.21 kJ mol<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Birbirine oldukça yakın olan bu değerlere göre her iki peptitin bağlanmasının yakın kararlılıkta olduğu düşünülmektedir.

Diğer peptitlere gelindiğinde, HBF5 ve HBF14, İTK denemelerinde önemli bir ısı değişikliğine neden olmamıştır. Faj- ELISA yönteminde kullanılan faj klonlarının histamin molekülüne yüksek afinite gösterdiği belirlendiği halde sentezlenen peptitler aynı afiniteye sahip olmamıştır. Bu durumun, faj kılıfı üzerinde bulunan peptitin konformasyonel yapısının, sentezlenen peptit ile aynı olmamasından veya faj kılıfı üzerindeyken sahip olabilecekleri çoklu bağlanma değerliliğinden kaynaklandığı ve böylece farklı bağlanma afinitelerine sahip oldukları düşünülmektedir [131].

Histamine afinite gösterdiği belirlenen peptit ligandların seçicilikleri de oldukça önemli bir özelliktir. Bu nedenle, ligand olarak seçilen HBF10 ve HBF26 peptitlerinin histamine benzer yapıda olan histidin molekülü ile etkileşimleri İTK cihazı kullanılarak araştırılmıştır. Her iki peptitin de histidin molekülü ile titrasyonu sonucu önemli bir bağlanma profili gözlenmemiştir. Bu sonuçlarla seçilen iki peptitin de histidin molekülüne afinite göstermediği ortaya çıkmıştır.

Hedef molekül ile etkileşimlerde, peptit liganların yapısal özelliklerinin rolü büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle termodinamik özellikleri belirlenen peptitlerden HBF26' nın ikincil yapısı, CD spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. HBF26 peptitinin ikincil yapı analizi sonucunda, 195 nm civarlarında negatif eliptisiteye sahip olduğu ve böylece yüksek oranda rastgele sarmal yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir [120]. Düşük sayıda amino asit içeren peptitlerde baskın yapının rastgele sarmal yapı olması beklenmektedir. HBF26 peptitinin histamin ile olan etkileşimi sonrasında, peptitin ikincil yapı bileşenlerinde farklar meydana geldiği görülmüştür. En önemli değişiklik peptitin rastgele sarmal yapısında görülen azalış olmuştur. Bu durum, peptitin bağlanma sırasında daha düzenli bir yapı sergilediğini göstermektedir. Bağlanma ile meydana gelen diğer değişiklikler ise paralel  $\beta$ -zincir ve döngü yapısındaki artış ve düşük oranda  $\alpha$ -heliks yapısının oluşması olmuştur.

Histamin, H1 reseptörünün (H1R) transmembran bölge 3'deki aspartat kalıntılarına ve transmembran bölge 5 içindeki asparajin + lizin kalıntılarına bağlanmaktadır [132]. İnsan H2 reseptörü kromozom 5 üzerinde bulunmakta ve H1R için tarif edilene benzer şekilde histamin molekülü, transmembran bölgeleri 3 aspartat ve 5'e treonin + aspartat kalıntılarına bağlanmaktadır [133]. H4R'ye histamin bağlanması ise, transmembran bölge 3' deki aspartik asit 94 kalıntısının ve transmembran bölge 5'teki glutamik asit 182 kalıntısı ile gerçekleşmektedir [132] .

Histamin bağlayan proteinlerin izole edildiği bir çalışmada, proteine ait aminoasit kalıntılarının, histamin bağlama bölgelerinin kritik bileşenleri incelenmiş ve belirlenmiştir [134]. Triptofan ve Fenilalanin amino asit kalıntılarının aromatik yan zincirlerinin, histamin molekülünün imidazol halkası ile güçlü etkileşimler oluşturduğu

birçok çalışmada kaydedilmiştir [134, 135]. İki aromatik halka, imidazol birinci nitrojen atomunun protonasyonunu destekleyerek aspartik asit kalıntısı ile iyonik etkileşimlere izin verebileceğini bildirilmiştir [134].

Tirozin amino asitinin fenolik halkasının, histaminin imidazol halkasının başka etkileşimlere girmesine katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Histaminin nitrojen atomları ile glutamik asit ve aspartik asit amino asit kalıntılarının karboksilatları arasında hem doğrudan hem de su molekülleri ile köprü yoluyla kapsamlı bir hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler ağı olduğu belirtilmiştir. Tirozin amino asit kalıntısının fenolik halkası ile Van der Waals etkileşimleri varken serin, asparajin ve tirozin amino asit kalıntlarına ait oksijen atomları, histaminin azot atomları ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir [134].

Histamine afinite gösteren HBF10 peptidine ait sekans, SGFRDGIEDFLW şeklinde bulunmuştur. Bu peptite ait negatif yüklü aminoasit sayısının üç olduğu bilinmektedir. Dizilimde iki adet aspartik asit ve bir adet glutamik asit amino asit kalıntısının bulunduğu görülmektedir. Yukarıda açıklanan H1, H2 ve H4 reseptörünün histamin molekülü ile bağlanmasında aspartik asit amino asitinin sorumlu olduğu belirtilmiştir. H4 reseptörüne ise hem aspartik asit hem de glutamik asit amino asitlerinin her ikisinin de rol oynadığı görülmektedir [132]. Bu bilgiler ışığında HBF10 peptidinin bağlanma mekanizmasında aspartik asit ve glutamik asit amino asitlerinin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

HBF10 peptit dizilimi, aromatik yan zincire sahip triptofan ve fenilalanin amino asit kalıntılarını barındırmaktadır. Histamin molekülünün yapısında bulunan imidazol halkasının peptit yapısında bulunan triptofan ve fenilalanin amino asitlerinin aromatik halkaları ve peptit yapısında bulunan bir diğer amino asit olan aspartik asit kalıntısı ile etkileşime girebileceği düşünülmektedir. Ayrıca HBF10 peptidinin yapısında bulunan glutamik asit ve aspartik asit amino asit kalıntılarının karboksilatları ile histamin molekülünün nitrojen atomları doğrudan veyahut su molekülleri ile köprü yoluyla hidrojen bağları oluşturmasının da mümkün olabileceği düşünülmektedir [134].

Histamine afinite gösteren HBF26 peptidine ait sekans, IPLENQHKIYST şeklinde belirlenmiştir. Dizilimde glutamik asit, asparajin, lizin, treonin amino asitlerinin

bulunduğu görülmektedir. H1R- histamin bağlanmasında asparajin + lizin amino asit kalıntılarının, H2R -histamin bağlanmasında treonin amino asitinin ve H4R reseptöründe glutamik asit amino asitinin sorumlu olduğu bilinmektedir [132, 133]. Bu bilgilere istinaden HBF26 peptitinin histamin molekülüne bağlanmasında glutamik asit, asparajin, lizin ve treonin amino asitleri etkili olabilir.

HBF26 peptidine ait dizilim, aromatik yapıya sahip tirozin ve histidin amino asit kalıntıları içermektedir. Histamin molekülü ile peptit yapısında bulunan tirozin amino asit kalıntısının fenolik halkası ile Van der Waals etkileşimlerinin oluşması, peptit yapısındaki bir diğer amino asit olan serinin yapısındaki oksijen atomları ile histaminin azot atomları arasında hidrojen bağı oluşturmasını sağlayabileceği muhtemel görünmektedir [134].

Faj gösterim yöntemi ile elde edilen kısa peptitler çeşitli avantajlarından dolayı spesifik tanıma elemanları olarak biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Kısa peptitler, proteinleri ve antikorları denatüre edecek evre şartlarına dayanabilmekte ve basit prosedürlerle kolayca değiştirilebilmekte ve sentezlenebilmektedir [136]. Ding ve ark., glifosata karşı spesifik ligandlar oluşturmak için faj gösterim yöntemini kullanmış ve peptitleri glifosat tespiti için SPR sensör altın yüzey üzerine immobilize etmiştir. SPR biyosensörün duyarlılığı  $1.02 \text{ RU } (\mu\text{M})^{-1}$  ve algılama limiti  $0.58 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur [137]. Yapılan başka bir çalışmada bakteri toksinini tespit etmek amacıyla faj gösterim yöntemi kullanılarak peptitler seçilmiş ve modifiye edilmiştir. Elde edilen peptitler SPR biyosensör yüzeyine immobilize edilmiş ve algılama limiti  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak bildirilmiştir [138].

Düşük molekül ağırlığına sahip moleküllere yönelik geliştirilen peptit ligandlar biyosensör sistemlerinde başarı ile uygulanabilmektedir. Naftalin molekülüne yönelik yapılan faj gösterim yöntemi ile elde edilen peptitler SPR sensör uygulamasında kullanılmıştır [105]. Aynı fonksiyonel grupları içeren diğer organik moleküller ile peptit etkileşimi analiz edilmiş ve peptitin benzen halkalarının sayısındaki farklılıkları açıkça ayırt ettiği görülmüştür. Bu sisteme ait peptit-naftalin etkileşiminin  $K_a$  değer,  $1.41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmış ve spesifik afiniteleri olan diğer peptitlerin  $K_a$  değerlerine yakın

olduğu bildirilmiştir [105]. Tüm bu çalışmalar ile, faj gösterim teknolojisini ile seçilen peptitlerin biyosensör uygulamalarında yeterli hassasiyete sahip olabileceği gösterilmiştir.

Çalışma sonunda, histamin molekülüne afinite gösteren yapay tanıyıcı peptit ligandlar (12 amino asit uzunluğunda) seçilmiş, yapısal ve moleküler etkileşimlerine ait termodinamik özellikleri incelenmiştir. Yapılan alışma, faj gösterim teknolojisi ile histamin molekülüne afinite gösteren yapay tanıyıcı peptitlerin seçilmesi ve bağlanma özelliklerinin incelenmesi bakımından, literatürde bir ilk olma özelliğine sahiptir. Histamin gibi immün cevap oluşturmayan küçük moleküllere karşı antikor üretimindeki zorluklar değerlendirildiğinde, bu özellikteki moleküllere seçici ve yüksek afinite ile bağlanan yapay tanıyıcı ajanların bulunması önemli bir avantaj oluşurmaktadır. Ayrıca alışma, faj gösterim peptit kütüphanesinden yüksek afinite gösteren peptitlerin seçilmesi ile histamin tayini için daha stabil ve hassas biyoanaliz sistemleri geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Bunlara ek olarak, peptit ligandların bağlanma bölgeleri modifiye edilerek hedef moleküle daha yüksek afinite gösteren tanıyıcı ajanların geliştirilmesi ilerleyen çalışmalar ile mümkün olabilecektir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] F.A. Zuljan, P. Mortera, S.H. Alarcón, V.S. Blancato, M. Espariz, C. Magni, Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese, *International Dairy Journal*, 62 (2016) 53-62.
- [2] A. Halász, Á. Baráth, L. Simon-Sarkadi, W. Holzapfel, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science & Technology*, 5 (1994) 42-49.
- [3] A.R. Shalaby, Significance of biogenic amines to food safety and human health, 1996.
- [4] M.A. Alvarez, M.V. Moreno-Arribas, The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution, *Trends in Food Science & Technology*, 39 (2014) 146-155.
- [5] L. Maintz, N. Novak, Histamine and histamine intolerance, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (2007) 1185-1196.
- [6] S. Bodmer, C. Imark, M. Kneubühl, Biogenic amines in foods: Histamine and food processing, 1999.
- [7] M.H.S. Santos, Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 29 (1996) 213-231.
- [8] M.C. Vidal-Carou, M.L. Izquierdo-Pulido, M.C. Martín-Morro, F. Mariné, Histamine and tyramine in meat products: Relationship with meat spoilage, *Food Chemistry*, 37 (1990) 239-249.
- [9] B. ten Brink, C. Damink, H.M.L.J. Joosten, J.H.J. Huis in 't Veld, Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 11 (1990) 73-84.
- [10] M. Křížek, T. Pelikánová, Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 243-250.

- [11] C. Ruiz-Capillas, A. Herrero, Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety, *Foods*, 8 (2019) 62.
- [12] M. Triki, A.M. Herrero, F. Jiménez-Colmenero, C. Ruiz-Capillas, Quality Assessment of Fresh Meat from Several Species Based on Free Amino Acid and Biogenic Amine Contents during Chilled Storage, *Foods (Basel, Switzerland)*, 7 (2018) 132.
- [13] T. Hernández-Jover, M. Izquierdo-Pulido, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1996) 2710-2715.
- [14] C. Ruiz-Capillas, F. Jiménez-Colmenero, *Biogenic Amines in Meat and Meat Products*, 2004.
- [15] G. Suzzi, F. Gardini, Biogenic amines in dry fermented sausages: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2003) 41-54.
- [16] M.L. Latorre-Moratalla, T. Veciana-Nogués, S. Bover-Cid, M. Garriga, T. Aymerich, E. Zanardi, A. Ianieri, M.J. Fraqueza, L. Patarata, E.H. Drosinos, A. Lauková, R. Talon, M.C. Vidal-Carou, Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries, *Food Chemistry*, 107 (2008) 912-921.
- [17] C.O.d.A. Møller, E.F. Ücok, F.P. Rattray, Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese, *Food Research International*, 128 (2020) 108719.
- [18] S.L. RICE, R.R. EITENMILLER, P.E. KOEHLER, Biologically Active Amines in Food: A Review, *Journal of Milk and Food Technology*, 39 (1976) 353-358.
- [19] H.M. Doeglas, J. Huisman, J.P. Nater, Histamine intoxication after cheese, *Lancet*, 2 (1967) 1361-1362.
- [20] S.L. Taylor, R.R. Eitenmiller, Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects, *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 17 (1986) 91-128.
- [21] V.B. Konkimalla, N. Chandra, Determinants of histamine recognition: Implications for the design of antihistamines, 2003.
- [22] S. Cid, m. latorre, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, Processing contaminants: biogenic amines, *Encyclopedia of Food Safety*, (2014) 381-391.

- [23] S.H. Arnold, W.D. Brown, Histamine (?) Toxicity from Fish Products, in: C.O. Chichester (Ed.) *Advances in Food Research*, Academic Press **1978**, pp. 113-154.
- [24] L. Auerswald, C. Morren, A.L. Lopata, Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood, *Food Chemistry*, 98 (**2006**) 231-239.
- [25] V. Economou, M.M. Brett, C. Papadopoulou, S. Frillingos, T. Nichols, Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse, *Food Additives & Contaminants*, 24 (**2007**) 820-832.
- [26] U. Pechanek, W. Pfannhauser, H. Woidich, [Content of biogenic amines in four food groups of the Austrian marketplace], *Z Lebensm Unters Forsch*, 176 (**1983**) 335-340.
- [27] M. Izquierdo-Pulido, T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, M.C. Vidal-Carou, Biogenic Amines in European Beers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (**1996**) 3159-3163.
- [28] S.L. Taylor, N.A. Woychik, Simple Medium for Assessing Quantitative Production of Histamine by Enterobacteriaceae, *Journal of Food Protection*, 45 (**1982**) 747-751.
- [29] S.L. Taylor, J.E. Stratton, J.A. Nordlee, Histamine Poisoning (Scombroid Fish Poisoning): An Allergy-Like Intoxication, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 27 (**1989**) 225-240.
- [30] O. Comas-Basté, Maria L. Latorre-Moratalla, S. Sánchez-Pérez, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance, **2019**.
- [31] A. Naila, S. Flint, G. Fletcher, P. Bremer, G. Meerdink, Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches, *Journal of Food Science*, 75 (**2010**) R139-R150.
- [32] P. Etkind, M.E. Wilson, K. Gallagher, J. Cournoyer, Bluefish-Associated Scombroid Poisoning: An Example of the Expanding Spectrum of Food Poisoning From Seafood, *JAMA*, 258 (**1987**) 3409-3410.
- [33] Ş. Kurt, Ö. Zorba, The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of “sucuk” – A Turkish dry fermented sausage, *Meat Science*, 82 (**2009**) 179-184.

- [34] W. Tapingkae, S. Tanasupawat, K. Parkin, S. Benjakul, W. Visessanguan, Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products, *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (2010) 92-99.
- [35] J.M. Hungerford, Scombroid poisoning: A review, *Toxicon*, 56 (2010) 231-243.
- [36] P. Russo, G. Spano, M. P Arena, V. Capozzi, D. Fiocco, F. Grieco, L. Beneduce, Are consumers aware of the risks related to Biogenic Amines in food?, 2010.
- [37] K. Prasad Rai, H. Ram Pradhan, B. Kumari Sharma, S. Kant Rijal, Histamine in Foods: Its Safety and Human Health Implications, 2014.
- [38] E. Rosini, F. Tonin, N. Vasylieva, S. Marinesco, L. Pollegioni, Evolution of histamine oxidase activity for biotechnological applications, 2014.
- [39] L. Maintz, N. Novak, Histamine and histamine intolerance, *American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (2007) 1185-1196.
- [40] Y. Özogul, F. Özogul, Chapter 1 Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food, *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity*, The Royal Society of Chemistry 2020, pp. 1-17.
- [41] FAO/WHO, Meeting Report: Public Health Risks Of Histamine And Other Biogenic Amines From Fish And Fishery Products, in: W.H. Organization (Ed.), FAO/WHO, 2013.
- [42] ResmiGazete, Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (Tebliğ No:2002/63), 2002.
- [43] FDA, Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition, University of Florida, 2011
- [44] EU, Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, *Official Journal of the European Union*, 338 (2005) 25.
- [45] J.J. Rodriguez-Jerez, M. Grassi, T. Civera, A Modification of Lerke Enzymic Test for Histamine Quantification, *Journal of Food Protection®*, 57 (1994) 1019-1021.
- [46] S.B. Patange, M.K. Mukundan, K. Ashok Kumar, A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh, *Food Control*, 16 (2005) 465-472.

- [47] M. Gagic, E. Jamroz, S. Krizkova, V. Milosavljevic, P. Kopel, V. Adam, Current Trends in Detection of Histamine in Food and Beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 773-783.
- [48] F.C. McIntire, The quantitative determination of histamine in animal tissues, *Journal of Allergy*, 26 (1955) 292-296.
- [49] R. Bateman, D.B. Eldrige, S. Wade, J. McCoy-Messer, E. Jester, D.E. Mowdy, Copper Chelation Assay For Histamine in Tuna, 2006.
- [50] P. A. Lerke, L. D. Bell, A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tun, 2006.
- [51] P.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn, A METHOD FOR THE FLUOROMETRIC ASSAY OF HISTAMINE IN TISSUES, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 127 (1959) 182.
- [52] D.-F. Hwang, S.-H. Chang, C.-Y. Shiua, C. Tuu-jyi, High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 693 (1997) 23-30.
- [53] S. Brillantes, W. Samosorn, Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, *Fish Sci*, 67 (2001) 1163-1168.
- [54] H.K. Mayer, G. Fiechter, E. Fischer, A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3251-3257.
- [55] Y. Song, Z. Quan, J. Evans, E. A Byrd, Y.-M. Liu, Enhancing capillary HPLC-MS2 of biogenic amines by pre column derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole, 2004.
- [56] AOAC, AOAC Official Method 977.13 Histamine in Seafood, 2012.
- [57] A. Gospos, U. Dreikhausen, D.C. Dartsch, M. Szamel, S. Hockertz, Development of an allergy test model: activation of human mast cells with potentially allergenic substances, *Toxicology*, 166 (2001) 91-96.
- [58] L.K. James, S.R. Durham, Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy, *Clinical & Experimental Allergy*, 38 (2008) 1074-1088.

- [59] L. Guilloux, S. Ricard-Blum, G. Ville, J. Motin, Histamine release assay and radioimmunoassay for the detection of IgE antibodies against neuromuscular blocking drugs, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 12 (**1993**) 182-186.
- [60] K. Kivirand, T. Rincken, Biosensors for Biogenic Amines: The Present State of Art Mini-Review, *Analytical Letters*, 44 (**2011**) 2821-2833.
- [61] M. Ohashi, F. Nomura, M. Suzuki, M. Otsuka, O. Adachi, N. Arakawa, Oxygen-Sensor-Based Simple Assay of Histamine in Fish Using Purified Amine Oxidase, **2006**.
- [62] I. Mirela Apetrei, C. Apetrei, Amperometric Biosensor Based on Diamine Oxidase/Platinum Nanoparticles/Graphene/Chitosan Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Histamine Detection, **2016**.
- [63] N. Kobayashi, M. Naya, S. Endoh, J. Maru, K. Yamamoto, J. Nakanishi, Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology*, 264 (**2009**) 110-118.
- [64] S. Köse, N. Kaklıkkaya, S. Koral, B. Tufan, K.C. Buruk, F. Aydın, Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method, *Food Chemistry*, 125 (**2011**) 1490-1497.
- [65] M. Yang, J. Zhang, X. Chen, Competitive electrochemical immunosensor for the detection of histamine based on horseradish peroxidase initiated deposition of insulating film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 736 (**2015**) 88-92.
- [66] B. Van Dorst, J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, R. Blust, J. Robbens, Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (**2010**) 1178-1194.
- [67] L. Mattsson, S. Doppler, C. Preininger, Challenges in developing a biochip for intact histamine using commercial antibodies, *Chemosensors*, 5 (**2017**).
- [68] J.L. Guesdon, D. Chevrier, J.C. Mazié, B. David, S. Avrameas, Monoclonal anti-histamine antibody: Preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine, *Journal of Immunological Methods*, 87 (**1986**) 69-78.
- [69] L. Luo, X.-Q. Wei, B.-Z. Jia, J.-Y. Yang, Y.-D. Shen, B. Hammock, J.-X. Dong, H. Wang, H.-T. Lei, Z.-L. Xu, Modulating Linker Composition of Haptens Resulted in Improved Immunoassay for Histamine, *Biomolecules*, 9 (**2019**) 597.

- [70] J.L.A. Voskuil, The challenges with the validation of research antibodies, *F1000Res*, 6 (2017) 161-161.
- [71] L. Luo, Z.-L. Xu, J.-Y. Yang, Z.-L. Xiao, Y.-J. Li, R.C. Beier, Y.-M. Sun, H.-T. Lei, H. Wang, Y.-D. Shen, Synthesis of Novel Haptens and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Histamine in Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 12299-12308.
- [72] V. Semwal, B.D. Gupta, Detection of Histamine Using Molecular Imprinted Hydrogel Coated SPR Based Fiber Optic Probe, 2018 Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR), 2018, pp. 1-2.
- [73] A. Rahtuvanoğlu, S. Akgönüllü, S. Karacan, A. Denizli, Biomimetic Nanoparticles Based Surface Plasmon Resonance Biosensors for Histamine Detection in Foods, *ChemistrySelect*, 5 (2020) 5683-5692.
- [74] F. Horemans, J. Alenus, E. Bongaers, A. Weustenraed, R. Thoelen, J. Duchateau, L. Lutsen, D. Vanderzande, P. Wagner, T.J. Cleij, MIP-based sensor platforms for the detection of histamine in the nano- and micromolar range in aqueous media, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 148 (2010) 392-398.
- [75] M. Peeters, F.J. Troost, R.H.G. Mingels, T. Welsch, B. van Grinsven, T. Vranken, S. Ingebrandt, R. Thoelen, T.J. Cleij, P. Wagner, Impedimetric Detection of Histamine in Bowel Fluids Using Synthetic Receptors with pH-Optimized Binding Characteristics, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 1475-1483.
- [76] F.A.D. Hubilla, A.I. Mabilangan, R.C. Advincula, F.R. del Mundo, A Surface Plasmon Resonance Histamine Sensor Based on an Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymer (E-MIP), *MATEC Web Conf.*, 95 (2017) 02006.
- [77] K.A. Günay, H.-A. Klok, Identification of Soft Matter Binding Peptide Ligands Using Phage Display, *Bioconjugate Chemistry*, 26 (2015) 2002-2015.
- [78] G.P. Smith, V.A. Petrenko, Phage Display, *Chemical Reviews*, 97 (1997) 391-410.
- [79] J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, D.J. Chiswell, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature*, 348 (1990) 552-554.
- [80] J. Scott, G. Smith, Searching for peptide ligands with an epitope library, *Science*, 249 (1990) 386-390.

- [81] S.D. Branston, E.C. Stanley, J.M. Ward, E. Keshavarz-Moore, Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18 (2013) 560-566.
- [82] J.W. Kehoe, B.K. Kay, Filamentous Phage Display in the New Millennium, *Chemical Reviews*, 105 (2005) 4056-4072.
- [83] J. Pande, M.M. Szewczyk, A.K. Grover, Phage display: Concept, innovations, applications and future, *Biotechnology Advances*, 28 (2010) 849-858.
- [84] G. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, 228 (1985) 1315-1317.
- [85] D. Rodi, S. Mandava, L. Makowski, Filamentous Bacteriophage Structure and Biology, *Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery, Second Edition* 2015, pp. 1-42.
- [86] J.D. Boeke, P. Model, N.D. Zinder, Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane, *Molecular and General Genetics MGG*, 186 (1982) 185-192.
- [87] D. D Williams, O. Benedek, C. L Turnbough, Species-Specific Peptide Ligands for the Detection of Bacillus anthracis Spores, 2003.
- [88] J. Rodriguez-Diaz, V. Monedero, G. Pérez Martínez, J. Buesa, Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display, 2004.
- [89] C. Enever, I. M Tomlinson, J. Lund, M. Levens, P. Holliger, Engineering High Affinity Superantigens by Phage Display, 2005.
- [90] W.L. Matochko, S. Cory Li, S.K.Y. Tang, R. Derda, Prospective identification of parasitic sequences in phage display screens, *Nucleic Acids Research*, 42 (2013) 1784-1798.
- [91] B. Bakhshinejad, H.M. Zade, H.S.Z. Shekarabi, S. Neman, Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library, *Amino Acids*, 48 (2016) 2699-2716.



- [92] K. Even-Desrumeaux, P. Chames, Phage Display and Selections on Cells, in: P. Chames (Ed.) *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Second Edition, Humana Press, Totowa, NJ, **2012**, pp. 225-235.
- [93] M. Hyvönen, P. Laakkonen, Identification and Characterization of Homing Peptides Using In Vivo Peptide Phage Display, in: Ü. Langel (Ed.) *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, **2015**, pp. 205-222.
- [94] M.R. Tohidkia, M. Sepehri, S. Khajeh, J. Barar, Y. Omid, Improved Soluble ScFv ELISA Screening Approach for Antibody Discovery Using Phage Display Technology, *Slas Discovery*, 22 (**2017**) 1026-1034.
- [95] S.D. Gan, K.R. Patel, Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (**2013**) 1-3.
- [96] E. R. Goldman, M. P. Pazirandeh, J. Matthew Mauro, K. D. King, J. C. Frey, G. Anderson, Phage-displayed peptides as biosensor reagents, **2000**.
- [97] M. Sarikaya, C. Tamerler, A.K.Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, Molecular biomimetics: nanotechnology through biology, *Nature Materials*, 2 (**2003**) 577.
- [98] S. Wang, E.S. Humphreys, S.-Y. Chung, D.F. Delduco, S.R. Lustig, H. Wang, K.N. Parker, N.W. Rizzo, S. Subramoney, Y.-M. Chiang, A. Jagota, Peptides with selective affinity for carbon nanotubes, *Nature Materials*, 2 (**2003**) 196.
- [99] M. Hamzeh-Mivehroud, A.A. Alizadeh, M.B. Morris, W. Bret Church, S. Dastmalchi, Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery, *Drug Discovery Today*, 18 (**2013**) 1144-1157.
- [100] J.W. Jaworski, D. Raorane, J.H. Huh, A. Majumdar, S.-W. Lee, Evolutionary Screening of Biomimetic Coatings for Selective Detection of Explosives, *Langmuir*, 24 (**2008**) 4938-4943.
- [101] E.R. Goldman, M.P. Pazirandeh, P.T. Charles, E.D. Balighian, G.P. Anderson, Selection of phage displayed peptides for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater, *Analytica Chimica Acta*, 457 (**2002**) 13-19.
- [102] J.-H. Na, M.-S. Ju, W.-K. Lee, H. Shim, S.-H. Lim, S. Taek Jung, Y. Gyu Yu, Development of a Single Chain Antibody Using a Phage Display Cloning Method for the

Detection of 2,4-Dinitrotoluene, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34 (2013) 460-464.

[103] M. Tanaka, T. Minamide, Y. Takahashi, Y. Hanai, T. Yanagida, M. Okochi, Peptide Screening from a Phage Display Library for Benzaldehyde Recognition, *Chemistry Letters*, 48 (2019) 978-981.

[104] B. Van Dorst, J. Mehta, E. Rouah-Martin, W. De Coen, V. Petrenko, R. Blust, J. Robbens, Selection of PCB binding phages as potential biorecognition elements for food and environmental monitoring, *Analytical Methods*, 3 (2011) 1865-1871.

[105] T. Sawada, Y. Okeya, M. Hashizume, T. Serizawa, Screening of peptides recognizing simple polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemical Communications*, 49 (2013) 5088-5090.

[106] Anonymous, ExPASy bioinformatics resource portal, ProtParam tool, <https://web.expasy.org/protparam/> (Erişim tarihi: **20 Aralık 2020**)

[107] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology*, 157 (1982) 105-132.

[108] X. Qiang, K. Sun, L. Xing, Y. Xu, H. Wang, Z. Zhou, J. Zhang, F. Zhang, B. Caliskan, M. Wang, Z. Qiu, Discovery of a polystyrene binding peptide isolated from phage display library and its application in peptide immobilization, *Scientific Reports*, 7 (2017) 2673.

[109] Anonymous, SAROTUP, Scanner And Reporter Of Target-Unrelated Peptides, <https://i.uestc.edu.cn/sarotup3/TUPredict.html> (Erişim tarihi: **27 Aralık 2020**)

[110] J. Huang, B. Ru, P. Zhu, F. Nie, J. Yang, X. Wang, P. Dai, H. Lin, F.-B. Guo, N. Rao, MimoDB 2.0: a mimotope database and beyond, *Nucleic acids research*, 40 (2012) D271-D277.

[111] K. Bouchemal, New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry, *Drug Discovery Today*, 13 (2008) 960-972.

[112] M.W. Freyer, E.A. Lewis, *Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions*, *Methods in Cell Biology*, Academic Press 2008, pp. 79-113.

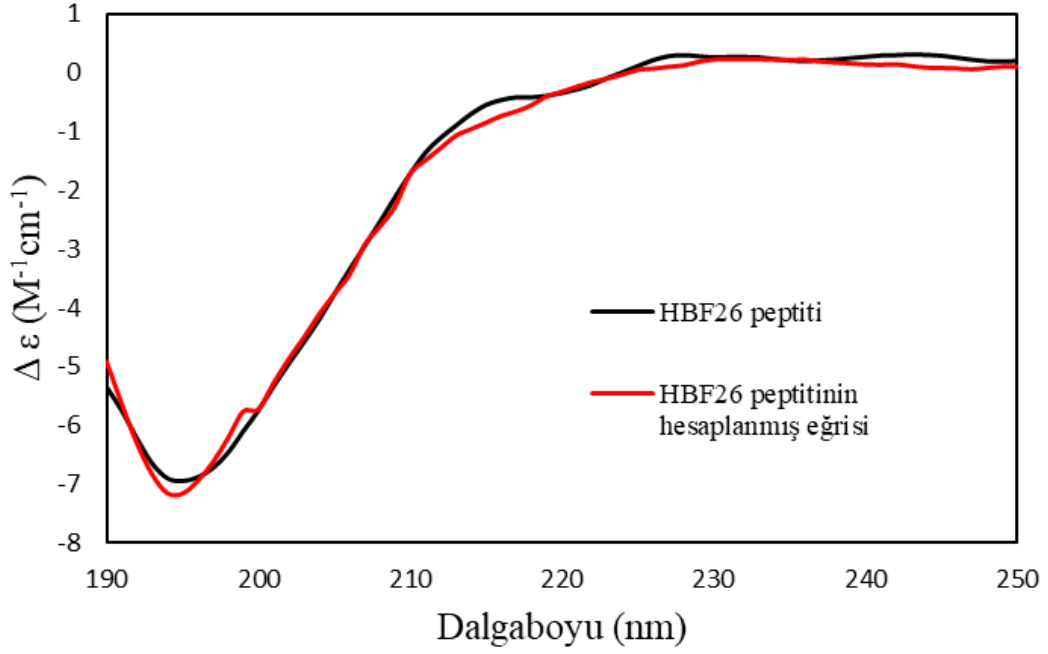
- [113] X. Du, Y. Li, Y.-L. Xia, S.-M. Ai, J. Liang, P. Sang, X.-L. Ji, S.-Q. Liu, Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods, *International journal of molecular sciences*, 17 (2016) 144.
- [114] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24 (2004) 1-52.
- [115] A.I. Dragan, C.M. Read, C. Crane-Robinson, Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation, *European Biophysics Journal*, 46 (2017) 301-308.
- [116] G. Siligardi, R. Hussain, Applications of Circular Dichroism, in: J.C. Lindon (Ed.) *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, 2010, pp. 9-14.
- [117] J. W C Johnson, Secondary Structure of Proteins Through Circular Dichroism Spectroscopy, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 17 (1988) 145-166.
- [118] S.R. Martin, M.J. Schilstra, G. Siligardi, Circular dichroism, *RSC Biomolecular Sciences*, 2011, pp. 226-246.
- [119] G. Siligardi, R. Hussain, Biomolecules interactions and competitions by non-immobilised ligand interaction assay by circular dichroism, *Enantiomer*, 3 (1998) 77-87.
- [120] N.J. Greenfield, G.D. Fasman, Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, 8 (1969) 4108-4116.
- [121] X. Xiao, Z. Kuang, J.M. Slocik, S. Tadepalli, M. Brothers, S. Kim, P.A. Mirau, C. Butkus, B.L. Farmer, S. Singamaneni, C.K. Hall, R.R. Naik, Advancing Peptide-Based Biorecognition Elements for Biosensors Using in-Silico Evolution, *ACS Sensors*, 3 (2018) 1024-1031.
- [122] Anonymous, BeStSel, Beta Structure Selection, Single Spectrum Analysis and Fold Recognition, <http://bestsel.elte.hu/index.php> (Erişim tarihi: 12 Aralık 2020).
- [123] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic acids research*, 46 (2018) W315-W322.

- [124] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (2015) E3095-E3103.
- [125] A. Micsonai, É. Bulyáki, J. Kardos, BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy, in: Y.W. Chen, C.-P.B. Yiu (Eds.) *Structural Genomics: General Applications*, Springer US, New York, NY, 2021, pp. 175-189.
- [126] V. Majava, M.V. Petoukhov, N. Hayashi, P. Pirilä, D.I. Svergun, P. Kursula, Interaction between the C-terminal region of human myelin basic protein and calmodulin: analysis of complex formation and solution structure, *BMC Structural Biology*, 8 (2008) 10.
- [127] A.A. Ksenofontov, G.B. Guseva, E.V. Antina, A.I. Vyugin, Zinc(II) bis(dipyrromethenate)s as chemosensors for fluorescent detection of amines, *Journal of Luminescence*, 181 (2017) 387-392.
- [128] J. Guo, J.M. Catchmark, M.N.A. Mohamed, A.J. Benesi, M. Tien, T.-h. Kao, H.D. Watts, J.D. Kubicki, Identification and Characterization of a Cellulose Binding Heptapeptide Revealed by Phage Display, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 1795-1805.
- [129] J.D. Dunitz, Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions, *Chemistry & Biology*, 2 (1995) 709-712.
- [130] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *Journal of Molecular Recognition*, 12 (1999) 3-18.
- [131] G.A. Weiss, R.M. Penner, The Promise of Phage Display: Customized Affinity and Specificity, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 3082-3089.
- [132] M. Dy, E. Schneider, Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15 (2004) 393-410.
- [133] J.D. Valle, I. Gantz, Novel insights into histamine H<sub>2</sub>receptor biology, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273 (1997) G987-G996.

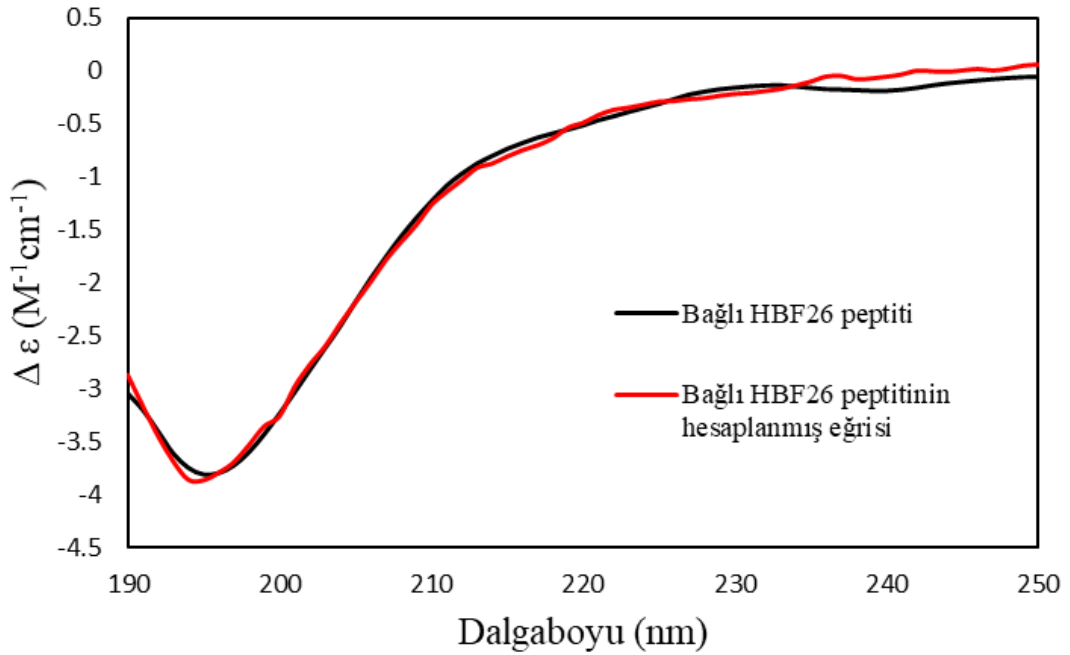
- [134] G.C. Paesen, P.L. Adams, K. Harlos, P.A. Nuttall, D.I. Stuart, Tick Histamine-Binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-Dimensional Structure, *Molecular Cell*, 3 (1999) 661-671.
- [135] T. Izoré, J. Tailhades, M. Hansen, J. Kaczmarek, C. Jackson, M. Cryle, *Drosophila melanogaster* nonribosomal peptide synthetase *Ebony* encodes an atypical condensation domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (2019) 201811194.
- [136] Y. Tan, T. Tian, W. Liu, Z. Zhu, C. J. Yang, Advance in phage display technology for bioanalysis, *Biotechnology Journal*, 11 (2016) 732-745.
- [137] X. Ding, K.-L. Yang, Development of an Oligopeptide Functionalized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Online Detection of Glyphosate, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 5727-5733.
- [138] F.C. Dudak, İ.H. Boyacı, Peptide-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B, *Food Analytical Methods*, 7 (2014) 506-511.

## EKLER

### EK 1- CD Spekturumlarına Ait Hesaplanmış Eğriler



Şekil 1.1. Serbest HBF26 peptidine ait CD spekturumuna ait hesaplanmış eğri



Şekil 1.2. Histamin ile etkileştirilmiş HBF26 peptidine ait CD spekturumuna ait hesaplanmış eğri