

**SÜLEYMAN SERDAR ALKANLI**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2018**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**DİFTERİ TOKSİNİNE KARŞI MOLEKÜLER BASKILAMA  
YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLEN PLASTİK ANTİKORUN  
IN VITRO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**SÜLEYMAN SERDAR ALKANLI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. HANDAN AKÇAKAYA**

**BİYOFİZİK ANABİLİ DALI  
BİYOFİZİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Biyofizik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Süleyman Serdar Alkanlı tarafından Doç. Dr. Handan Akçakaya'nın danışmanlığında hazırlanan "Difteri Toksinine Karşı Moleküler Baskılama Yöntemi İle Geliştirilen Plastik Antikorun In Vitro Etkinliğinin Belirlenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 04/01/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Jüri Başkanı**

Prof. Dr. Muhammet Bektaş  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Jüri-Danışman**

Doç. Dr. Handan Akçakaya  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Jüri**

Prof. Dr. Işıl Albeniz  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Jüri**

Yrd. Doç. Dr. Celal Güven  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Jüri**

Prof. Dr. Zerrin Aktaş  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Süleyman Serdar Alkanlı



## İTHAF

Babam Metin Alkanlı'ya ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Tez süresi boyunca bana her zaman vaktini ayırarak yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Handan Akçakaya'ya ve deneylerim süresince desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Muhammet Bektaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımdaya benden yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Fulya Dal Yöntem'e, Yrd. Doç. Dr. Ebru Haciosmanoğlu'na ve deneysel çalışmaların yanında tavsiyeleri ile de bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Celal Güven ve sevgili eşi Doç. Dr. Eylem Taşkın Güven'e teşekkür ederim.

Çalışma süresince desteğinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Leyla Türker Şener'e, benimle fikir ve deneyimlerini paylaşan Arş. Gör. Yasin Çelikok'a, Arş. Gör. Gözde Hasbal'a ve Uzm. Biyolog Göktürk Ötünç'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince birlikte aynı ortamda bulunmaktan mutluluk duyduğum tüm Biyofizik ABD çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Manevi desteğini benden esirgemeyen annem Adalet Alkanlı'ya ve ablam Yrd. Doç. Dr. Nevra Alkanlı'ya ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma, TÜBİTAK 1001, Proje No: 115S224, ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), BAP Proje No: TYL-2017-25648 tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİİ
ÖZET .....	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Hücre Kültürü .....	3
2.1.1. Sağlıklı İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücre Hattı (HUVEC).....	4
2.1.2. İnsan Pankreatik Beta Hücre Hattı (1.1B4) .....	5
2.1.3. Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı (NIH-3T3).....	6
2.2. Difteri Toksini.....	7
2.3. Difteri Toksininin Hücreler Üzerindeki Etkisi .....	8
2.4. Difteri Toksininin A Fragmentinin Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	9
2.5. Difteri Toksininin Aktin Filamentleri Üzerindeki Etkisi.....	9
2.6. Plastik Antikor .....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
3.1. Gereçler.....	12
3.1.1. Kimyasal Maddeler .....	12
3.1.2. Antikorlar .....	13
3.1.3. Cihazlar .....	13
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler: .....	14
3.1.4.1. İmmünfloresan Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....	14
3.1.4.2. Hücre Kültürü ve Hücre Canlılığı Testlerinde Kullanılan Çözeltiler .....	14
3.1.4.3. Kolon Kromatografisinde Kullanılan Çözeltiler.....	15

3.1.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	15
3.1.4.5. Western-Blot Jel Transferi İçin Kullanılan Çözeltiler .....	16
3.2. Yöntemler .....	17
3.2.1. Difteri Toksininin A Fragmentinin Elde Edilmesi.....	17
3.2.2. Fraksiyonların Western-Blot Analizleri ile Belirlenmesi .....	18
3.2.3. Protein Miktarlarının Belirlenmesi .....	19
3.2.4. FA ile Baskılanmış Plastik Antikorun Elde Edilmesi.....	19
3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	20
3.2.5.1. Sıvı Azotta Saklanan Hücrelerin Ekilmesi.....	20
3.2.5.2. Hücrelerin Çoğaltılması .....	21
3.2.5.3. Hücre Sayılarının Belirlenmesi .....	21
3.2.5.4. Hücre Hattının Dondurulması .....	22
3.2.6. Sitotoksosite Deneyleri .....	23
3.2.6.1. HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri .....	23
3.2.6.2. Hücre Canlılığının MTT Testi ile Belirlenmesi .....	23
3.2.6.3. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri .....	24
3.2.7. İmmünfloresan Boyama.....	25
3.2.7.1. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri.....	25
3.2.7.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri .....	25
3.2.8. Nötralizasyon Deneyleri .....	26
3.2.8.1. Plastik Antikorun HUVEC ve 1.1B4 Hücreleri Üzerindeki Nötralizasyon Etkisi .....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Difteri Toksininin A Fragmentinin Elde Edilme Sonuçları.....	27
4.2. Western-Blot Analizleri .....	29
4.3. Protein Miktar Tayinleri .....	30
4.4. Sitotoksosite Deneyleri .....	31
4.4.1. HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri....	31
4.4.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri .....	37
4.5. İmmünfloresan Boyama.....	41
4.5.1. DT İle Muamele Edilen HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.....	41



4.5.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri.....	43
4.6. Nötralizasyon Deneyleri .....	45
4.6.1. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Plastik Antikor ve Difteri Toksini İle Etkileşimleri.....	45
5. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR .....	57
ÖZGEÇMİŞ .....	62



**TABLÖLAR LİSTESİ**

Tablo 3-1: Fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı miktarları .....	20
Tablo 4-1: Fraksiyonların protein konsantrasyonları.....	30



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sağlıklı İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücre Hattı (HUVEC).....	4
Şekil 2-2: İnsan Pankreatik Beta Hücre Hattı (1.1B4).....	5
Şekil 2-3: Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı (NIH-3T3).....	6
Şekil 2-4: DT'nin katalitik (C), transmembran (T), reseptör bağlanma (R) bölgelerinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2-5: DT'nin hücrel girişinin endozomal yolağının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2-6: Aktinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu .....	9
Şekil 2-7: Plastik antikorun kalıp molekül ile etkileşimi.....	10
Şekil 3-1: Sefakril S-100 kabilasyon grafiği (Unlu 2011).....	17
Şekil 3-2: Sıvı azotta saklanan hücrelerin kültür ortamında flaska ekilmesinin şematik gösterimi .....	21
Şekil 3-3: Hemositeometre lamı. Phelan (1998)'den değiştirilerek .....	22
Şekil 3-4: Hücrelerin dondurulması.....	23
Şekil 4-1: Sadece tripsin ve tripsin+DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT'nin elektroforez görüntüsü .....	27
Şekil 4-2: Tripsin ve DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT'nin likit kolon kromatografisi cihazı ile elde edilen FA fraksiyonlarının yer aldığı kromatogram .....	28
Şekil 4-3: Sefakril S-100 kolonunun kalibrasyon grafiği .....	29
Şekil 4-4: Anti-FA kullanılarak elde edilen Western-Blot sonucu.....	30
Şekil 4-5: HUVEC hücrelerinin DT ile 24-48-72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri.....	31
Şekil 4-6: HUVEC hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	32
Şekil 4-7: HUVEC hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	33
Şekil 4-8: HUVEC hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	33
Şekil 4-9: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	34
Şekil 4-10: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	34

Şekil 4-11: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	35
Şekil 4-12: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	36
Şekil 4-13: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	36
Şekil 4-14: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	37
Şekil 4-15: HUVEC hücrelerinin NIP ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	38
Şekil 4-16: HUVEC hücrelerinin NIP ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	38
Şekil 4-17: HUVEC hücrelerinin NIP ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	39
Şekil 4-18: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	39
Şekil 4-19: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	40
Şekil 4-20: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları .....	40
Şekil 4-21: DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri.....	41
Şekil 4-22: DT ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri.....	42
Şekil 4-23: NIP ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin 24-48 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri.....	43
Şekil 4-24: NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri.....	44
Şekil 4-25: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	45
Şekil 4-26: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 48 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	46

Şekil 4-27: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 72 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	46
Şekil 4-28: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	47
Şekil 4-29: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 48 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	48
Şekil 4-30: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 72 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi .....	48
Şekil 4-31: 1,6 nM DT ile 0, 1, 10, 100 µg/ml plastik antikor verilen HUVEC hücrelerinin 24-48 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri .....	49
Şekil 4-32: 1,6 nM DT ile 0, 1, 10, 100 µg/ml plastik antikor verilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri .....	50

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

1.1B4	İnsan pankreatik beta hücre hattı
ADP	Adenozin difosfat
Anti-FA	Sekonder antikor
Bis-Akrilamid	N,N'-Metilen-bis-akrilamid
BSA	Sığır serum albumini
cDMEM	Complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium
cRPMI 1640	Complete Roswell Park Memorial Institute 1640
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	Dithiothreitol
DT	Difteri toksini
eEF-2	Ökaryotik uzama faktörü-2
EDTA	Etidyum bromür
EF-2	Uzama faktörü-2
FA	Fragment A
FB	Fragment B
FBS	Fetal Sığır Serummu
F-aktin	Polimer yapıdaki aktin
G-aktin	Monomer yapıdaki aktin
HB-EGF	Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörüne
HRP	Horseradish (bayır turpu) peroksidaz
HUVEC	Sağlıklı insan umbilikal damar endotel hücre hattı

IgG	İmmunglobülin G
MET	Merkapto etanol
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NIH-3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
NIP	Baskılanmamış polimer
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfat tamponu
PBS-T	Fosfat tamponu-tween 20
P/S	Penisilin/Streptomisin
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N, N', N' tetrametilendiamin
UV	Mor ötesi
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

## ÖZET

Alkanlı SS. Difteri Toksinine Karşı Moleküler Baskılama Yöntemi İle Geliştirilen Plastik Antikorun In Vitro Etkinliğinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018.

Antikorlar, tamamlayıcı üç boyutlu yüzeyler arasındaki çok zayıf elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağlayıcı etkileşimleri ile hedef molekülleri tanırlar. Plastik antikorlar geliştirildikleri molekülleri tanıma, bağlama ve serbest bırakma özellikli moleküler baskılanmış polimerlerdir. Moleküler baskılamada moleküler düzeyde bir hedef molekül bulunur. Fonksiyonel grupları taşıyan monomerler, hedeflenen molekülün etrafında toplanarak çapraz bağlanma ile kopolimerizasyon gerçekleştirirler. Böylece hedef molekülün etrafında polimer yapıdaki kalıp oluşturulur. Kalıp içerisinden molekülün çıkartılmasıyla oluşan bağlanma bölgeleri, molekülü fonksiyonel gruplarının boyutu, şekli ve konumu yönünden tamamlayan bölgelerdir. Bu polimerler biyolojik kökenli yapay antikorların aksine, üretimleri hızlı ve ekonomiktir. Deney hayvanları kullanılmadan üretilirler. Fiziksel ve kimyasal kararlıdır.

Baskılanmış polimerin uygulamalarında kimyasal afinite ile ayırma, yapay immünometik sistemlerin geliştirilmesi ve sensörlerin oluşturulması yer almaktadır.

Difteri, *Corynebacterium diphteriae* bakterilerinden kaynaklanan bir solunum yolu ve deri hastalığıdır. Bu bakteri 0,1 mg/kg vücut ağırlığının altındaki dozlarda bile insanlar için ölümcül olan difteri toksinini salgılar. Difteri toksini, molekül ağırlığı yaklaşık 62 kDa olan, 535 amino asit içeren, A (22 kDa) ve B (40 kDa) fragmentlerinden oluşan bir ekzotoksindir. Enfeksiyonlarda toksin hücre zarı ile bağlanır. A fragmenti sitoplazmaya girerek ADP-ribozilasyonunu ve uzama faktörü 2'nin (EF-2) inaktivasyonunu katalize eder. Böylece ökaryotik hücreyi ribozomal translokasyonu inhibe ederek öldürür.

Bu tez çalışmasında, difteri toksininin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Difteri toksininin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini azaltmak amacıyla A fragmenti baskılanarak üretilen plastik antikorun, in vitro etkinliği belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda plastik antikorun difteri toksininin sitotoksik etkisini azalttığı hücre canlılığı ve immünfloresan boyama çalışmaları ile gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, farklı patojenlere karşı geliştirilecek plastik antikorların tedavi amacıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Difteri Toksini, Plastik Antikor, Moleküler Baskılama, Hücre Kültürü, Nötralizasyon, İmmünfloresan, Sitotoksiste.

Bu çalışma, TÜBİTAK 1001, Proje No: 115S224, ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), BAP Proje No: TYL-2017-25648 tarafından desteklenmiştir.



## ABSTRACT

Alkanli SS. Determination of In Vitro Activity Of Plastic Antibody Developed For Diphtheria Toxin By Molecular Imprinting. İstanbul University, Institute of Health Science, Biophysics Department Master Thesis. İstanbul. 2018.

Antibodies recognize target molecules with very weak electrostatic, hydrophobic, and hydrogen bonding interactions between three-dimensional surfaces. Plastic antibodies are molecular imprint polymers that recognize, bind and release the molecules they develop. There is a target molecule in molecular imprinting. Monomers carrying functional groups perform co-polymerization with cross-linking. Thus, the polymer matrix forms around the target molecule. Formed bonding regions complete the molecule in terms of the size, shape, and position of the functional groups. Polymers, can be produced quickly and economically. They can be produced without experimental animals. They have physical and chemical stability.

Polymers can be used for separation, immunomatic systems and construction of sensors. Diphtheria is a respiratory and skin disease caused by *Corynebacterium diphtheriae*. This bacterium releases diphtheria toxin, which is lethal to humans even at doses below 0.1 mg/kg. Diphtheria toxin (62 kDa) is an exotoxin consisting of A (22 kDa) and B (40 kDa) fragments, containing 535 amino acids. During infection, the toxin binds to the cell membrane. FA enters cytoplasm and catalyzes the inactivation of ADP-ribosylation and elongation factor 2 (EF-2). Thus, FA inhibits ribosomal translocation and kills eukaryotic cells.

In this thesis, the cytotoxic effects of diphtheria toxin on cells have been examined. To reduce cytotoxicity, the activity of the FA imprinted plastic antibody was determined. In the study, cell viability and immunofluorescence staining studies have shown that plastic antibody reduces cytotoxic effect of diphtheria toxin. The results suggest that plastic antibodies to be developed against different pathogens may be used for treatment.

Keywords: Diphtheria Toxin, Plastic Antibody, Molecular Impression, Cell Culture, Neutralization, Immunofluorescence, Cytotoxicity.

This study was supported by TUBITAK 1001, Project No: 115S224, and İstanbul University Scientific Research Projects (BAP), BAP Project No: TYL-2017-25648.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik antikolar, yakın geçmişte literatüre girmiş olup, antikor benzeri işleve sahip olmaları nedeniyle biyolojik kökenli yapay antikolara (hibridoma teknolojisi ile üretilen monoklonal antikolar gibi) tercih edilmeye başlanmış biyouyumlu yapılardır. Araştırmacıların, yapay antikoları üretme noktasında yaşadıkları zorluklar neticesinde ortaya çıkan yeni yaklaşım arayışları, tekrar kullanılabilirlik, üretim ve maliyet gibi pek çok konuda yapay antikolara alternatif olabilecek plastik antikoların geliştirilmesine yol açmıştır. Belirlenen bir kalıp moleküle, kovalent bağlanma, non-kovalent etkileşimler veya ligand etkileşimleri ile ilginlik kazanan plastik antikolar, kalıp molekülü bağlama, bırakma ve tanıma özelliklerine sahip reseptör sistemleridir. Sahip oldukları bu özellikler sayesinde ayrıştırma, saflaştırma, kimyasal sensör, kataliz ve ilaç üretim amacı ile de kullanılabilmektedirler (Vasapollo ve ark. 2011).

Bu yaklaşımı göz önünde bulundurarak geliştirdiğimiz plastik antikor ile elde edilmesi zor ve maliyetli olan diğer yapay antikolar ile karşılanmak istenen antikor ihtiyacını daha kolay, ucuz ve kısa sürede büyük oranda karşılamak hedeflenmektedir. Bu hedef doğrultusunda, moleküler baskılama yöntemi kullanılarak, difteri toksininin (DT) A fragmentine (FA) karşı plastik antikor üretildi. Bu yolla plastik antikorun FA'yı yakalaması ve DT'nin tamamını bağlaması hedeflenmektedir. Plastik antikorun üretiminde, fonksiyonel monomerler ile FA, mor ötesi (UV) ışık altında muamele edildi. UV ışık etkisi ile monomerlerin FA etrafında polimerleşmesi sağlanmış ve sonrasında yapılan diyalizler ile polimerde bulunan FA çıkartıldı. Böylece FA'ya karşı baskılanmış ve DT'yi yakalama özelliğine sahip olan plastik antikor üretildi.

Moleküler baskılamada büyük moleküllerin kalıp olarak kullanılması teknik zorluklar nedeniyle yakın geçmişe kadar pek tercih edilmemiştir. DT'nin bu zamana kadar yapılmış olan çalışmalarda kalıp moleküllerden daha büyük molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle moleküler baskılama çalışmalarının bu doğrultuda önünü açacaktır. Böylece plastik antikorun kullanım alanlarının genişlemesi ve daha etkili plastik antikoların üretilmesi mümkün olacaktır.

Üretilen plastik antikorun etkinliğini anlamak için in vitro çalışmalar yapıldı. Hücre kültürü laboratuvarlarında ilk olarak hücrelere baskılanmamış polimer verilerek, polimerin hücreler üzerindeki etkisi incelendi. Benzer şekilde DT'nin de hücreler

üzerindeki öldürücü etkisi belirlenerek DT'nin hücrelerin yarısını öldürdüğü değer bulundu. Sonrasında plastik antikor, DT ile birlikte hücelere verilmiş ve hücre canlılıklarındaki değişim incelendi. FA, DT'nin toksik özelliğe sahip olan fragmenti olmasına rağmen, DT'nin diğer fragmenti olan FB olmadan hücre içine giremediğinden hücelere tek başına verilmedi. FA'nın sitoplazmaya girebilmesi için FB'de bulunan R bölgesi hücre yüzey reseptörü ile bağlanarak endositoz gerçekleştirmelidir (Morris ve ark. 1985).

Bu alanda, in vivo ortam koşullarında yapılmış ve 2010 yılında yayınlanmış bir makalede, toksik etkili melittinin farenin kan dolaşımına tek başına ve plastik antikor ile birlikte verilmesi durumlarında aralarındaki etkileşim incelenmiştir. Çalışmada kullanılan plastik antikorun, farenin kan dolaşımındaki melittinin vücut dışına atılmasını sağladığı görülmektedir (Hoshino ve ark. 2010). Bizim de benzer yaklaşımlarla ürettiğimiz plastik antikorlar ile gerçekleştirdiğimiz in vitro çalışmalar, ileride yapılacak in vivo çalışmaların sonuçlarını öngörmemizi sağlayacak olmaları nedeniyle önemlidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre Kültürü

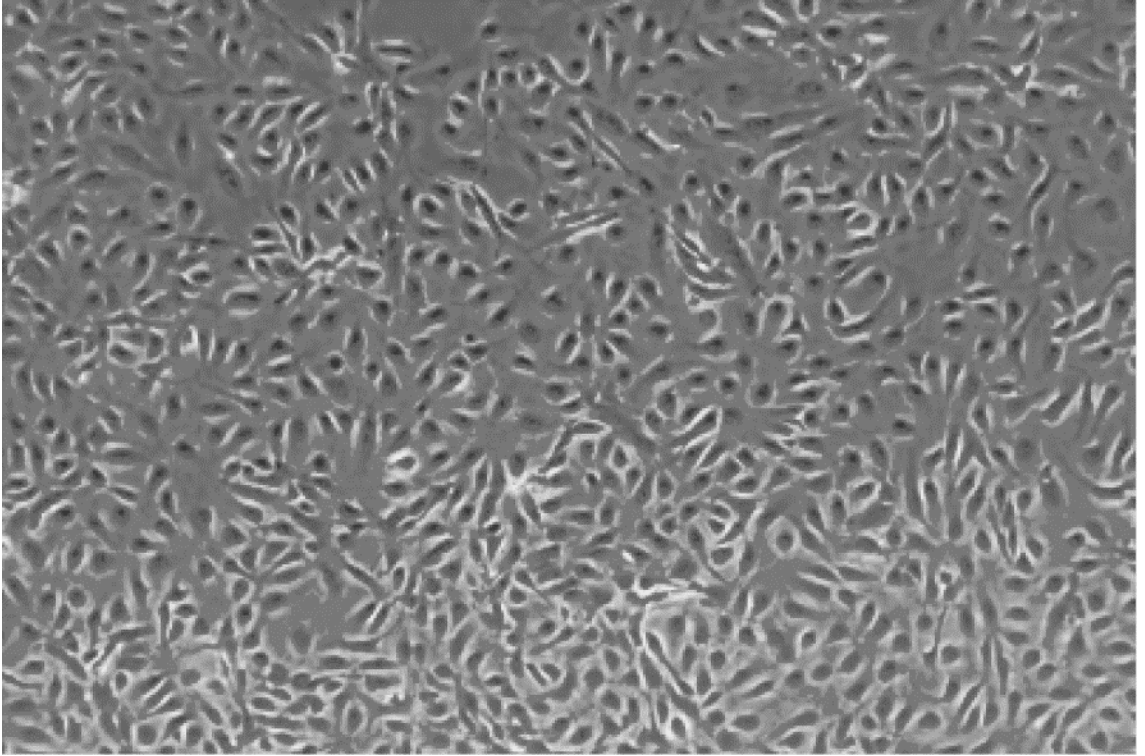
Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında canlı organizmadan bağımsız olarak yetiştirilmesidir. Burada amaçlanan, hücre popülasyonunun genişlemesi ve bu yolla hücre canlılığının devam ettirilmesidir. Hücre sayısının ve canlılığın belirlenmesi deney sürecinin başlaması için gereklidir. Canlı hücreler kültür ortamında çoğaltılarak deneyde ihtiyaç duyulan hücre sayıları elde edilir. Kontaminasyon riski, inkübatör arızası ve araştırmacıdan kaynaklanabilecek hatalar gibi sorunların önüne geçebilmek için hücreler dondurularak saklanır. Bu sayede, hücre hattının kaybedilmesinin önüne geçilerek, hücre yaşlanma ve genetik bozunma önlenmiş olur.

Hücre kültüründe tercih edilen besiyeri önemlidir. Besiyeri, hücrelerin besin gereksinimlerini ve gerekli büyüme faktörlerini sağlamalıdır. Ayrıca, canlılık ile ozmolarite arasındaki uyum da sürdürülebilir olmalıdır.

Hücre kültürü; biyokimya, biyofizik, genetik, immünoloji, fizyoloji, moleküler biyoloji ve sinirbilim alanlarında yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. (Harford, J.B. 2003). Herhangi bir maddenin sitotoksikite deneyleri ile hücre üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, hastalıkların incelenmesi, kök hücre ve ilaç geliştirme çalışmaları, tüp bebek ve kısırlık tedavileri, sitogenetik çalışmalar ile farmasotik protein üretimi gibi çalışmalar hücre kültüründe gerçekleştirilebilmektedir (Justice ve ark. 2009).

### 2.1.1. Sağlıklı İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücree Hattı (HUVEC)

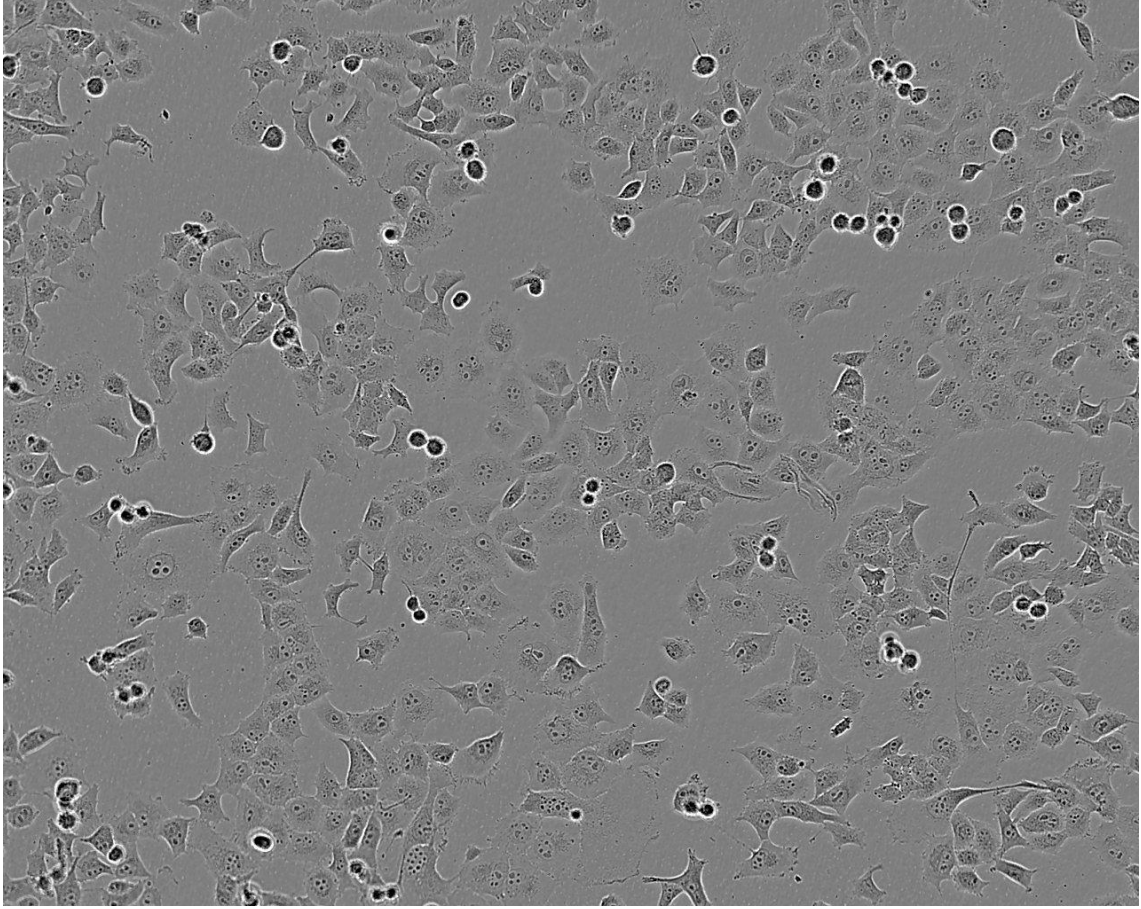
Primer insan umbilikal damar endotel hücree hattı (HUVEC) hücreeleeri, göbek kordonunun damarından izole edilir (Jaffe 1980) (Şekil 2-1). Endotel hücreeleeri, anjiyogenezide ve tümör büyümesi için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisinde kullanılabilerecek anti-anjiyojenik ajan araştıırma çalışmalarında tercih edilmektedir (Harford 2004).



Şekil 2-1: Sağlıklı İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücree Hattı (HUVEC)

### 2.1.2. İnsan Pankreatik Beta Hücre Hattı (1.1B4)

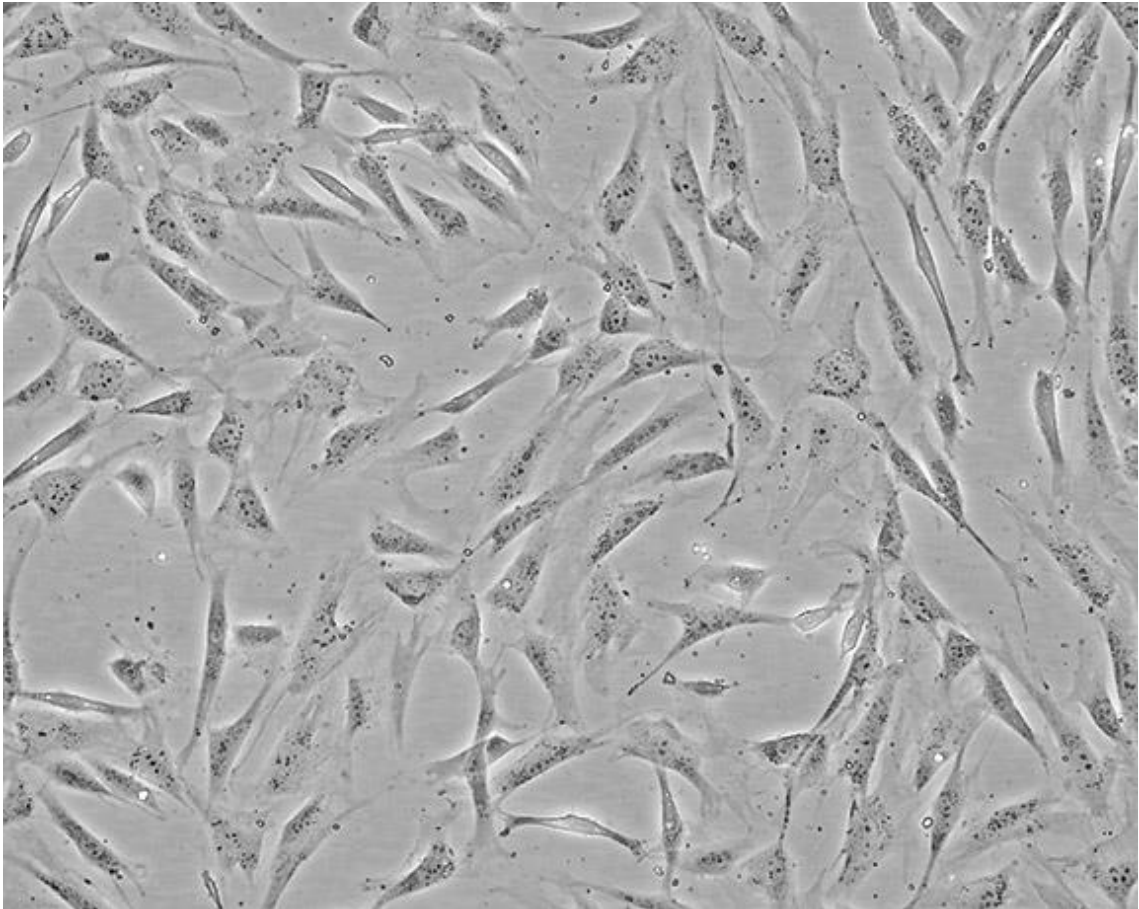
İnsan pankreatik beta hücre hattı (1.1B4), yeni izole edilmiş insan pankreatik beta hücrelerinin ve ölümsüz insan PANC-1 epitel hücre hattının elektrofüzyonu ile üretilmiştir (Şekil 2-2). Avrupa Doğrulanmış Hücre Kültür Koleksiyonu (ECACC) tarafından doğruluğu belgelenerek depolanmıştır (McCluskey ve ark. 2011).



Şekil 2-2: İnsan Pankreatik Beta Hücre Hattı (1.1B4)

### 2.1.3. Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı (NIH-3T3)

Fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH-3T3), NIH İsviçre fare embriyo kültürlerinden üretilmiştir (Jainchill ve ark. 1969) (Şekil 2-3). NIH-3T3 hücre soyu ilk kez 1962 yılında New York Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan George J. Todaro ve Howard Green adlı araştırmacılar tarafından kültüre uyarlanmıştır (Todaro ve Green 1963).



Şekil 2-3: Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı (NIH-3T3)

## 2.2. Difteri Toksini

Difteri, *Corynebacterium diphteriae* bakterilerinin neden olduğu bir solunum yolu ve deri hastalığıdır. Bu bakteri 0,1 mg/kg vücut ağırlığının altındaki dozlarda bile insanlar için ölümcül olan DT salgılar (Pappenheimer Jr. 1977; Gill 1982). DT, moleköl ağırlığı yaklaşık 62 kDa olan, 535 amino asit içeren bir ekzotoksindir. İki fragmenti bulunur. Bunlardan fragment A (FA) 22 kDa, fragment B (FB) 40 kDa moleköl ağırlığına sahiptir (Bennett ve ark. 1994). FA; katalitik (C) bölgesini içeren N-terminal polipeptidi, FB; transmembran (T) ile reseptör bağlanma (R) bölgelerini içeren C-terminal polipeptidi ifade eder (Collier 2001) (Şekil 2-4).

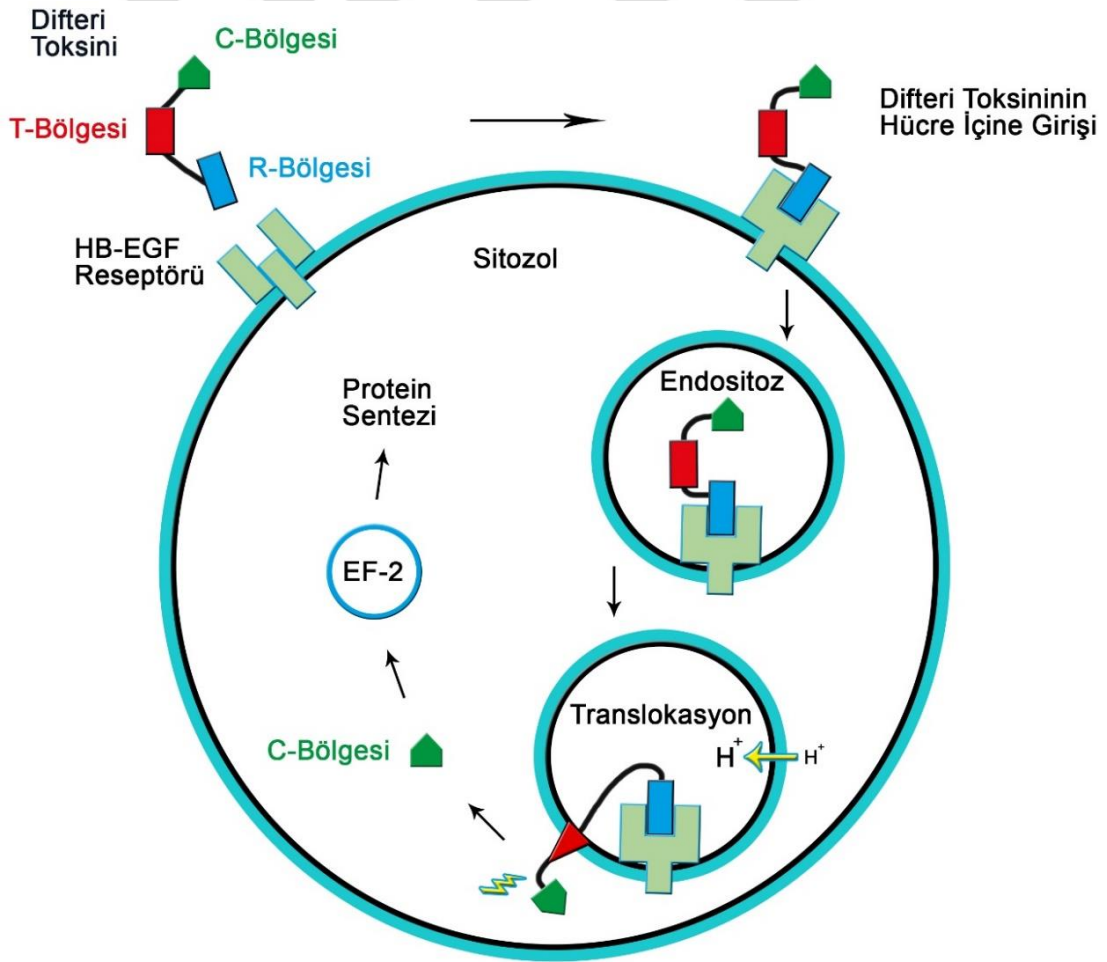


Şekil 2-4: DT'nin katalitik (C), transmembran (T), reseptör bağlanma (R) bölgelerinin şematik gösterimi



### 2.3. Difteri Toksininin Hücreler Üzerindeki Etkisi

DT'nin toksik özellik gösteren fragmenti FA, sitoplazmaya girerek, translokaz olarak da bilinen uzama faktörü 2'nin (EF-2)'nin ADP-ribozillenmesini ve böylece inaktivasyonunu sağlar (Burch ve ark. 1968). Bu sayede ökaryotik hücreyi ribozomal translokasyonu inhibe ederek öldürür. Diğer fragment FB'de bulunan R bölgesinin (Şekil 2-4) hücre yüzey reseptör (HB-EGF) bağlanmasıyla endositoz gerçekleşir (Morris ve ark. 1985). Bu yolla FA'nın sitoplazmaya girişi kolaylaşır (Bennett ve ark. 1994). Sitoplazmaya translokasyon gerçekleştikten sonra C bölgesi, ADP-ribozun NAD'den EF-2'nin post-translasyonel değiştirilmiş histidine (diftamid) transferini katalize eder (Van Ness ark., 1980). Böylece protein sentezini durdurarak hücrenin ölümüne neden olur (Collier, 1975) (Şekil 2-5).



**Şekil 2-5: DT'nin hücresel girişinin endozomal yolağının şematik gösterimi**

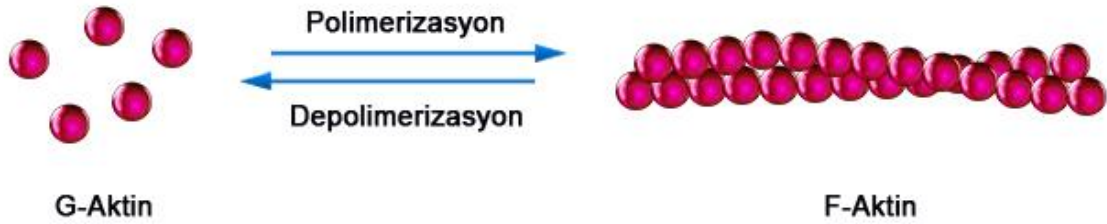
Toksin üç bölgeden oluşur: Reseptör bağlanma (R) bölgesi, heparin bağlayan EGF (epidermal büyüme faktörü) benzeri reseptöre bağlanarak endositozu başlatmakla sorumlu translokasyon (T) bölgesi, uzama faktörü 2 (EF-2)'nin modifikasyonu yoluyla protein sentezini bloke eden katalitik (C) bölgesi.

#### 2.4. Difteri Toksininin A Fragmentinin Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

FA'nın sitoplazmaya girişi DT'nin sitotoksik etkisi için gereklidir. FB'deki R bölgesi hücre yüzeyindeki heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörüne (HB-EGF) bağlandıktan sonra DT, reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır (Şekil 2-5). DT'nin, asidik bir bölmede yapısal değişikliğe uğramasıyla, T bölgesinin belirli bölgeleri endozomal zara sokulur. Enzimatik olarak aktif FA, sitoplazmada yer değiştirerek ökaryotik protein sentezini inhibe eder. Bu durum toksinin difteri ile ilişkili ciddi ve ölümcül kardiyomiyopati (difteri miyokarditi) oluşturmasından ileri gelmektedir (Collier 2001; Bektaş ve ark. 2004; Burch ve ark. 1968).

#### 2.5. Difteri Toksininin Aktin Filamentleri Üzerindeki Etkisi

Aktin, 1942'de Straub tarafından kas dokusunda keşfedilmiştir (Galler 2015). Aktin, monomerik G-aktin ile polimerize F-aktin arasında dinamik bir denge durumunda bulunur (Oosawa ve Asakura 1975) (Şekil 2-6).



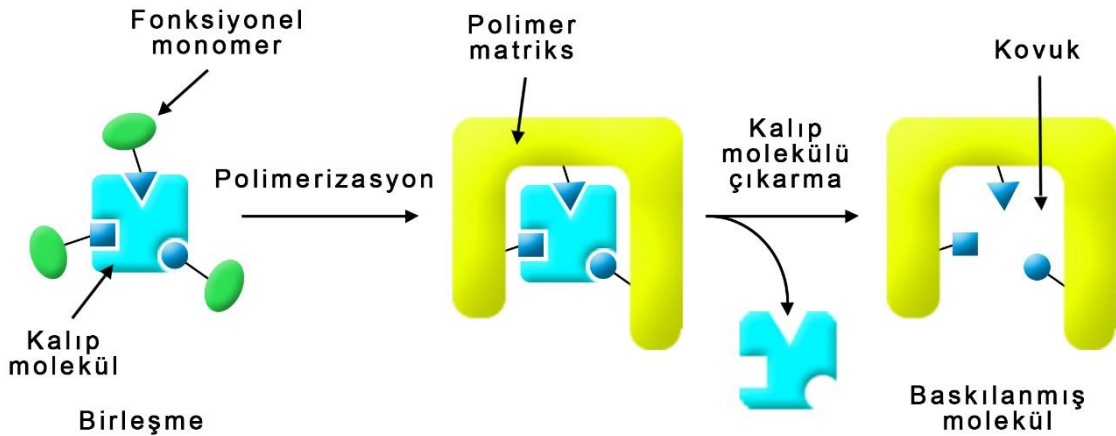
Şekil 2-6: Aktinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu

Aktin'in lifli yapısı (F-Aktin), kas dokularının tümünde bulunan ince filamentin ana bileşenidir. Aktin, ökaryotik hücrelerin çoğunda en bol bulunan iskelet proteindir. Hücre hareketliliğinde önemli hücresel işlevlere sahip olmasının yanında, kompleks proteinlerin hücrede bulunması ve taşınmasında da rol oynar (Pollard ve Borisy 2003; Carlier ve Pantaloni 2007).

DT kaynaklı sitotoksisite ile protein sentezinin inhibisyonundan sonra aktin filamentlerinin depolarizasyonu gerçekleşir. Aktin, ökaryotik uzama faktörü-2 (eEF-2)'nin FA aracılı ADP-ribozilasyonunu inhibe eder (Bektaş ve ark. 2004). Bu bulgu, proteinler arası etkileşimlerin doğasını belirlemenin gerekliliğini ortaya koymaktadır. FA hem G-aktin hem de F-aktin ile etkileşime girebilir (Bektaş ve ark. 2009). Ayrıca DT'nin endositik değiş tokuşunda F-aktin ve eEF-2'nin rolü de belirlenmiştir (Bektaş ve ark. 2011).

## 2.6. Plastik Antikor

Plastik antikorlar, moleküler baskılama tekniği kullanılarak üretilen polimer yapıdaki nanopartiküllerdir. Moleküler baskılama, kalıp molekülün etrafındaki fonksiyonel gruplar ile üç boyutlu uyuma ve yüksek seçicilikte bağlayıcı oyuklara sahip sentetik polimerlerin sentezlenmesi ile gerçekleşir (Corman ve ark. 2014) (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Plastik antikorun kalıp molekül ile etkileşimi

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), özgün moleküler tanıma becerisine sahiptirler (Ali ve ark. 2010; Kryscio ve Peppas 2012). Ayrıca monoklonal antikorlar gibi biyolojik kökenli yapay antikorlara kıyasla üretim maliyetleri daha düşük olup, daha uzun süreli kararlılığa sahiptirler (Say ve ark. 2009).

Moleküler baskılama teknolojisi ile ilişkili ilk çalışmalar 1930'lu yılların başlarında görülmektedir. 1993 yılında Nature dergisinde yayınlanan bir çalışma ile moleküler baskılanmış polimerlerin yarışmalı bağlanma testiyle antikorların yerine

başarılı bir şekilde kullanılabilirdiği ispatlanmıştır (Vlatakis ve ark. 1993). 2010 yılında Journal of the American Chemical Society dergisinde yayınlanmış olan diğer bir makalede, bal arısı iğnesindeki zehir olan melitin peptidine karşı sentetik organik polimer nanoparçacıklar geliştirilmiştir. Aynı çalışmada toksik etkisi olan melitin canlı farenin kan dolaşımında baskılanmış polimer tarafından yakalanarak temizlendiği gösterilmiştir (Hoshino ve ark. 2010). Bu çalışma, özellikle toksik proteinlerin moleküler baskılama yöntemi kullanılarak yakalanması ve nötralizasyonu konusunda önemli bir adım olmuştur.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI)

Akrilamit (Sigma)

Amonyum persülfat (Sigma)

Asetik asit (Akkimya)

Bis-Akrilamit (N,N'-Metilen-bis-akrilamit) (Sigma)

Difteri toksini (Sigma)

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Etil alkol (Sigma)

Falloidin 594 Boya

Fetal Sığır Serum (FBS)

Hidroklorik asit (Sigma)

N,N, N', N' tetrametilendiamin (TEMED) (Sigma)

Penisilin/Streptomisin (P/S)

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)

Sığır serum albumini (BSA) (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Tripsin-EDTA (Gibco)

Trizma (Sigma)

### 3.1.2. Antikorlar

Anti-difteri toksini FA'ya özgün fare kökenli monoklonal antikor (Abcam)

Anti-fare IgG (HRP) monoklonal antikor (Abcam)

### 3.1.3. Cihazlar

Buz Dolabı (Altus)

CO<sub>2</sub> İnkübatör (Sanyo)

Çalkalayıcı (Biosan)

Distile Su Cihazı (GFL)

Hassas Terazi (Mettler)

Hassas Terazi (Scaltec)

İmmün Floresan Mikroskopu (Olympus BX51)

Jel Elektroforez Tankı (Biorad)

Jel Filtrasyon Sistemi (GE Healthcare AKTAprime Plus)

Jel Filtrasyon Kolonları (GE Healthcare HiPrep Sefakril S-100 HR)

Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2448 (Heraus)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)

Otoklav (Hirayama)

Otomatik Pipetler (Eppendorf)

Protein Test Kiti (Qubit)

Santrifüj (Hettich-Universal 32)

Sıvı Azot Tankı (International Cryogenics, Inc.)

Ters Mikroskop (Olympus 1M)

Vorteks (Biosan)

Western-Blot Jel Transfer Sistemi (Invitrogen)

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler:

#### 3.1.4.1. İmmünfloresan Boyamada Kullanılan Çözeltiler

##### **PBS**

1,44 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 gr KCl

8,0 gr NaCl

0,24 gr  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$

800 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  ile çözülerek pH HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

##### **%5 PBS/BSA**

5 gr BSA

100 ml PBS çözeltisi

##### **%1 Triton X-100**

1 ml Triton X-100

100 ml PBS

##### **%2 Paraformaldehit**

2 gr Paraformaldehit

100 ml PBS

100 ml PBS içerisine 2 gr paraformaldehit eklenip su banyosunda ısıtılarak çözünmesi beklenir.

#### 3.1.4.2. Hücre Kültürü ve Hücre Canlılığı Testlerinde Kullanılan Çözeltiler

##### **Hücre Kültürü**

##### **Complete DMEM (cDMEM)**

445 ml DMEM

50 ml FBS

5 ml P/S

**Complete RPMI 1640 (cRPMI 1640)**

445 ml RPM 1640

50 ml FBS

5 ml P/S

**Hücre Canlılığı****MTT solüsyonu**

50 mg MTT

10 ml PBS

**3.1.4.3. Kolon Kromatografisinde Kullanılan Çözeltiler****Kolon Yükleme Tamponu**

10 mM Tris bazi

1 mM EDTA

Bu tampon, kolona verilecek olan difteri toksininin çözüldüğü tampon olduğu için tercih edildi.

**Kolon Yıkama Tamponu**

200 ml Ethanol

800 ml dH<sub>2</sub>O

**3.1.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler****PAGE Jeli (% 14)**

2 ml 1,5 M Tris-HCl pH: 8,8

3,73 ml Akrilamid/bisakrilamid

80 µl % 10 SDS

80 µl % 10 APS

20 µl TEMED

2,1 ml dH<sub>2</sub>O



**PAGE Yürütme Tamponu (1x)**

3 gr Tris bazı (250 mM)

14,4 gr Glisin (1,82 M)

1 gr SDS (% 1)

**PAGE Yükleme Tamponu (2x)**

1 ml 1 M Tris HCl pH:6,8

1,6 ml Gliserin (% 99)

2 ml SDS (% 10)

0,4 ml 14 M MET

0,2 ml Bromfenol mavisi (% 0,1)

3,8 ml dH<sub>2</sub>O

**Jel Boyama Çözeltisi (Commasie Parlak Mavisi)**

Commasie parlak mavisi (% 0,2)

Metanol (% 50)

Asetik asit (% 10)

**Jelden Boya Çıkarma Çözeltisi**

% 10 Asetik asit

**3.1.4.5. Western-Blot Jel Transferi İçin Kullanılan Çözeltiler****PBS-T**

497,5 ml PBS

2,5 ml Tween 20 (% 0,5)

**PBS-T/BSA (% 5)**

10 ml PBS-T

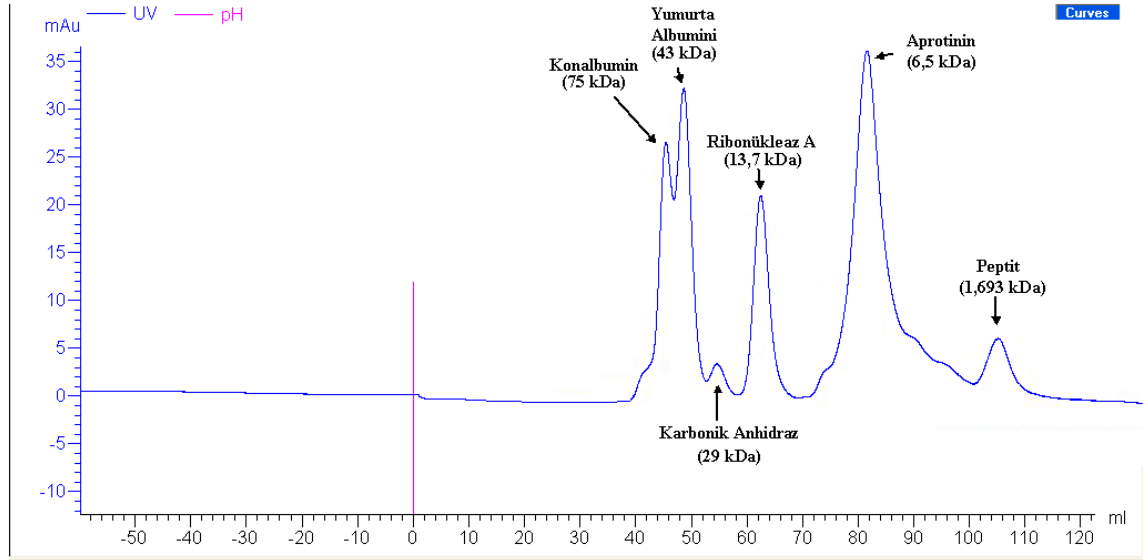
0,5 gr BSA

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Difteri Toksininin A Fragmentinin Elde Edilmesi

DT'nin A fragmentinin, tripsin ve DTT (Dithiothreitol) kullanılarak kısmi sindirimi gerçekleştirildi. Kısmi sindirim işlemi için 50 mM Tris-HCl pH: 8.0 ve 1 mM EDTA bulunan solüsyon içerisine 40 mg (4 mg/ml) tripsin eklendi. Ara dilüsyonlar yapılarak elde edilen 4 µg/ml tripsin içeren çözeltiden 5 µl alınarak, 250 µl DT (32 µM) üzerine eklendi. 25 °C'de 30 dakika beklendikten sonra karışımın üzerine 0,1 M DTT ilave edilerek 37 °C'de 90 dakika beklendi. Beklemenin sonunda çözelti 25 °C'de 0,6 µg/ml tripsin inhibitörü ile muamele edilerek kısmi sindirim gerçekleştirildi.

Kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT'nin A fragmentini elde etmek için, AKTA Prime Plus likit kolon kromatografisi cihazı kullanıldı. Cihazın kalibrasyonu için kolona BSA verildi. Saflaştırma için toplam hacmi 120 ml olan Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 kolonu kullanıldı. Aynı sistem ile yapılmış olan bir kalibrasyon çalışmasından alınan kromatogram görüntüsünün (Unlu 2011) (Şekil 3-1), yaptığımız çalışmanın kalibrasyon grafiğindeki 66 kDa molekül ağırlığına sahip BSA'nın geldiği tepenin bulunduğu hacim ile örtüştüğü gözlemlendi (Şekil 4-3).



**Şekil 3-1: Sefakril S-100 kalibrasyon grafiği (Unlu 2011).**

Örnek hacmi 1ml, akış hızı 0,8 ml/dak olacak şekilde 1 mg/ml protein karışımı kolona yüklendi.

Kalibrasyon sonrasında Tripsin ve DTT kullanılarak kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT, likit kolon kromatografisi cihazına verilerek FA fraksiyonlar halinde elde edildi.

Likit kolon kromatografisi cihazından elde edilen FA'nın ve DT'nin yer aldığı değerler, kalibrasyon grafiğindeki değerler ile karşılaştırılarak kontrol edildi.

Kolondaki örnekler 0,37 mPa basınçta, 1 ml/dk hızda ve 1 ml'lik hacimlerde fraksiyonlar halinde toplandıktan sonra örneklerin 280 nm dalga boyunda optik yoğunlukları belirlendi. Çalışmanın ardından kolondan % 20'lik etil alkol çözeltisi geçirilerek kolon temizlendi.

Likit kolon kromatografisi cihazından elde edilen grafikten alınan tepelerin bulunduğu fraksiyonlar Western-Blot analizi ile membrana aktarılarak görüntüledi.

### **3.2.2. Fraksiyonların Western-Blot Analizleri ile Belirlenmesi**

Likit kolon kromatografisi cihazından elde edilen grafikte FA'nın bulunduğu tepenin yer aldığı fraksiyonlar (48-50) 100 °C'de 10 dakika bekletilerek denature edildi. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) için bir beher içerisinde % 14'lük tek jel hazırlandı. Hazırlanan jelde, jel polimerinin monomeri olan akrilamid, jel oluşumunu sağlayan çapraz bağlayıcı ajan N,N'-metilen-bis(akrilamid), proteinleri denatüre ederek üç boyutlu yapılarını bozup doğrusal hale getiren sodyum dodesil sülfat (SDS), distile su (dH<sub>2</sub>O), polimerleşmeyi sağlayan serbest radikal kaynağı amonyum persülfat (APS) ve serbest radikalleri kararlı hale getiren TEMED kullanıldı. Hazırlanan jel pasteur pipet yardımıyla cam plakların arasına dökülerek jelin üzerine tarak yerleştirildi. Jel polimerleştikten sonra Bio-Rad elektroforez kiti içerisindeki cihaza özgü kısıkaç yardımı ile sıkıştırılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin bulunduğu hazne ve tank SDS-PAGE tamponu ile dolduruldu. Ardından jelin üzerindeki tarak çıkarılarak oluşan kuyulara denature edilen örnekler ve marker yüklendi. Güç kaynağı elektroforez tankına bağlandıktan sonra 140 V değerine getirilerek proteinler jelde yürütüldü.

Elektroforez sonunda güç kaynağı kapatılıp jel alındı. Cam plaklar arasındaki jel distile su ile durulandı. Jel üzerindeki cam alınıp jeldeki istenmeyen bölgeler çıkartıldıktan sonra kurumaması için sıvı ortama (PBS-T olan bir kaba) yerleştirildi. Jel transfer cihazına, kit içerisinden çıkan alt bölme yerleştirildikten sonra sırasıyla sıvı ortamdaki jel, membran, üst bölme ve sünger yerleştirilerek cihazın kapağı kapatıldı.

Cihaz başlatılarak 9 dakika aktarım işleminin gerçekleşmesi beklendi. İşlemin sonunda jel atılarak membran PBS-T dolu kaba yerleştirildi. PBS-T 5 dakika ara ile 3 kez değiştirilerek membran çalkalayıcı üzerinde durulandı. Membran %5 PBS-T/BSA çözeltisi bulunan kaba koyularak 25 °C’de 60 dakika çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. 5 ml %5 PBS-T/BSA çözeltisi hazırlanarak içerisine primer antikor (anti-FA-fare) 1:500 oranında (10 µl) ilave edildi. 60 dakika sonunda primer antikor ayrı bir kaba boşaltıldı ve kap içerisine çalkalayıcıdan alınan membran yerleştirildi. Kap içerisindeki membran gece boyu +4 °C’de çalkalayıcı üzerinde bırakıldı.

Daha sonra membran alınarak 3 kez 10 dakika ara ile çalkalayıcı üzerinde bulunan PBS-T dolu kap içerisinde bekletildi. Kap içerisindeki PBS-T her 10 dakika sonunda değiştirildi. İşlemin sonunda sekonder antikor (anti fare), 10 ml hacimde %5 PBS-T/BSA olan tüp içerisine 1:3000 oranında (3,33 µl) eklendi. Tüp içindeki %5 PBS-T/BSA ve sekonder antikor karışımı bir kaba aktarıldı. Membran bu kaba yerleştirilerek 25 °C’de 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu sürenin sonunda membran 3 kez 10 dakika ara ile çalkalayıcı üzerinde bulunan PBS-T dolu kap içerisinde bekletildi. Bu işlemin sonrasında PBS-T dökülerek kaba membranın yüzeyini kaplayacak kadar TMB eklendi. Karanlıkta 1 dakika kadar bekledikten sonra membranın durumuna bakıldı.

### **3.2.3. Protein Miktarlarının Belirlenmesi**

FA’nın olduğu fraksiyonlardaki protein miktarları Qubit Protein Assay Kit ile belirlendi. Kit içerisindeki talimatlara göre tampon çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan tampon, kit ile beraber gelen 3 adet standart (her birinden 10 µl) ve fraksiyonlar (her birinden 3 µl) ile toplam hacim 200 µl olacak şekilde tüplere hazırlandı. Standartlar cihaza okutulduktan sonra örnekler sıra ile okutularak protein miktarları µg/ml cinsinden belirlendi.

### **3.2.4. FA ile Baskılanmış Plastik Antikorun Elde Edilmesi**

Baskılama işlemi için Tablo 3-1’deki formülasyon kullanılarak 1. faz oluşturuldu. 1,25 µM FA, 1. faz içerisine damlalar halinde eklenerek monomer-kalıp molekül etkileşiminin gerçekleşmesi için yarım saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. İşlemin sonunda başlatıcı olarak 0.015 gr IRGACURE 184 ve 0.015 gr kamforkinon eklendi. Yağ/su (o/w) emülsiyonu manyetik karıştırıcıda 700 rpm hızla

karıştırılan 2. fazın içine, 1 ml'lik tek kullanımlık şırınga ile damlatılarak ilave edildi. Bu sayede su/yağ/su (w/o/w) emülsiyonu oluşturuldu.

**Tablo 3-1: Fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı miktarları**

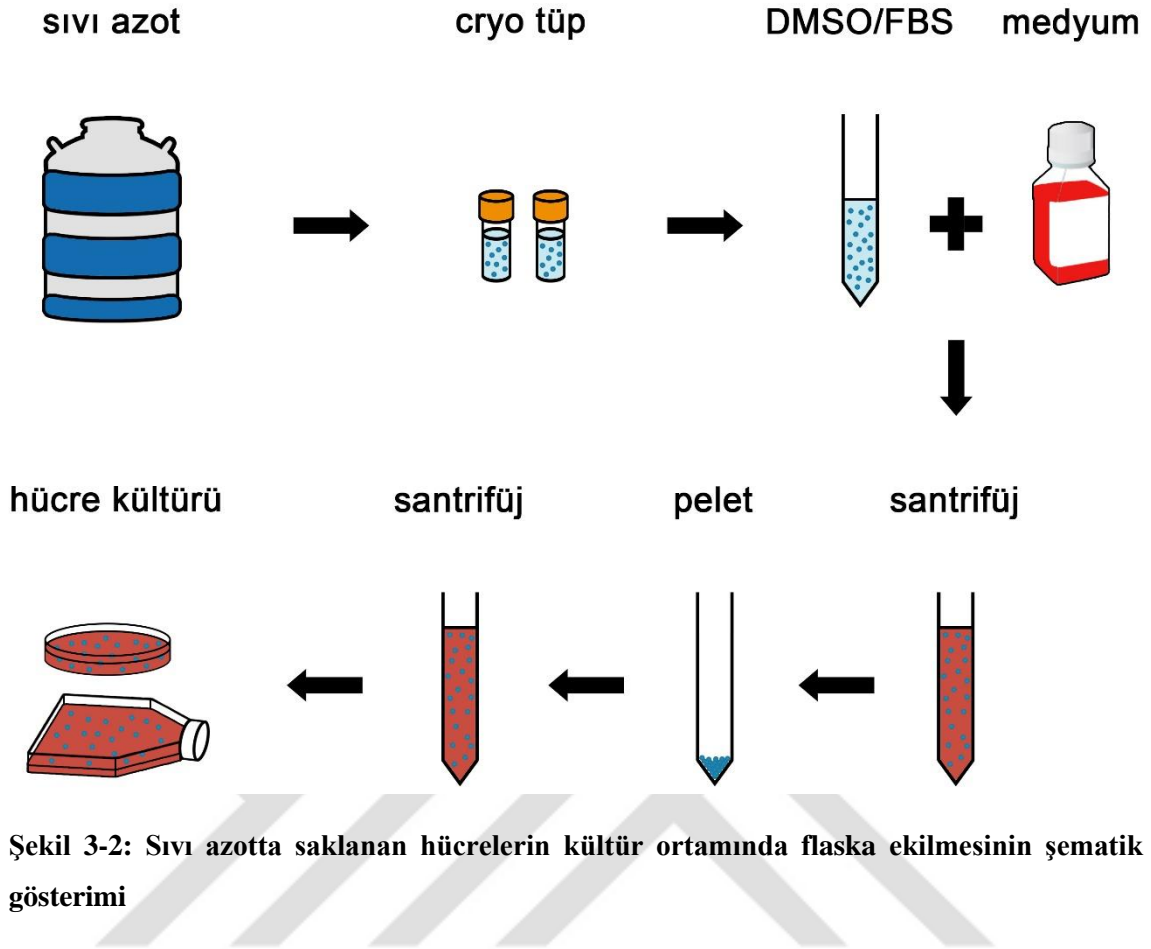
Monomer	Miktar (gr)
N-hidroksietilakrilamit	0.44
N-3-dimetilamino propilmetakrilamit	0.11
Hidroksietilmetakrilat	0.41
N,N,O-triallyl-L-fenilalanin	0.033
Etilen glikol dimetakrilat	0.022
Pentaeritritoltetrakis (3-merkaptopropionat)	0.03
Hekzadekan	0.048

Kendi karıştırma sistemine sahip UV fotoreaktör içerisinde 30 dakika süre ile polimerizasyon gerçekleştirildi. Reaksiyonun ardından şeffaf-bulutsu nanopartikül dispersiyonu elde edildi. Baskılanmış polimerin içerisinde FA'nın temizlenmesi için 2 saat ara ile diyalizler gerçekleştirildi. Diyalizlerin ardından elde edilen plastik antikor, membran içerisinde 25 °C'de saklandı.

### 3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 3.2.5.1. Sıvı Azotta Saklanan Hücrelerin Ekilmesi

Sıvı azot tankında -196 °C sıcaklıkta cryo tüpler içinde saklanmakta olan hücreler 37 °C'ta çözüldü. Hücrelerin bulunduğu ortam 5-6 ml medyum (DMEM ya da RPMI 1640) olan ortama ilave edilerek santrifüj edildi. Hücrelerin medyum olan ortama ilave edilmesi ile ortamdaki DMSO'nun hücreler üzerindeki toksik etkisinin azaltılması amaçlandı. İki defa gerçekleştirilen santrifüj işlemlerinin her birinin sonunda, üst sıvılar döküldü. Böylece DMSO ortamdan uzaklaştırıldı. Santrifüj işleminin sonunda hücre sayımı yapıldı ve hücreler flasklara ekildi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Sıvı azotta saklanan hücrelerin kültür ortamında flaska ekilmesinin şematik gösterimi

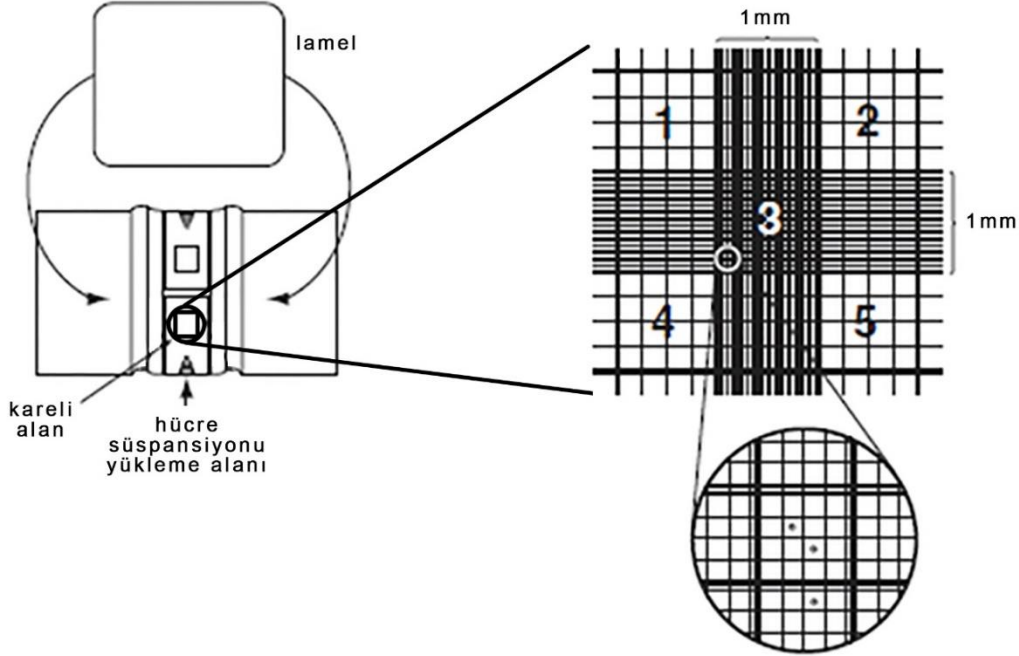
### 3.2.5.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Çalışmalarda kullanılan HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 hücreleri standart kültür koşullarında; % 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 U/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM (cDMEM) ve RPMI 1640 (cRPMI 1640) içerisinde kültür flasklarına ekilerek 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğaltıldı. Ters mikroskopla 2-3 günde bir kontrol edilen hücreler yeterli çoğunluğa ulaştıklarında flask yüzeyinden tripsin-EDTA kullanılarak 4 dakika 37 °C'ta inkübe edildi. Yüzeyden kaldırılan hücreler 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika'da 4 dakika santrifüj sonunda üst sıvı atıldı ve pelet 1-2 ml taze cDMEM veya cRPMI 1640 içerisinde çözdürüldü.

### 3.2.5.3. Hücre Sayılarının Belirlenmesi

HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 hücreleri tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak toplandı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 4 dakika santrifüj sonunda üst sıvıları atıldı. Pelet cDMEM veya cRPMI 1640 içerisinde

çözdürülerek hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücrelerden 10 µl alınarak hemositometre lamına yerleştirildi ve sayım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3-3).

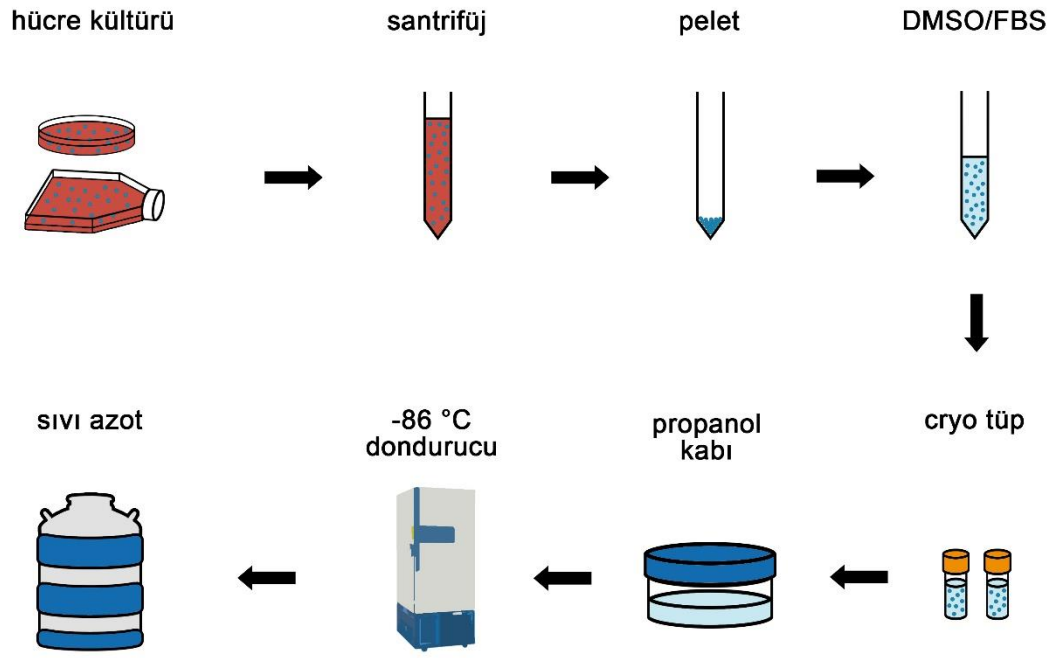


**Şekil 3-3: Hemositometre lamı. Phelan (1998)'den değiştirilerek**

Lamel lamın üzerine yerleştirilir ve Pasteur pipet ya da mikropipet yardımıyla hücre süspansiyonu lam ile lamel arasında verilir. Ardından hücre sayımı gerçekleştirilir.

#### 3.2.5.4. Hücre Hattının Dondurulması

HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 hücreleri tripsin-EDTA ile tutundukları yüzeyden kaldırılarak toplandı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 4 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları atıldı. Tüp içerisindeki hücreler sayılarak  $5 \times 10^6$  hücre FBS içerisinde çözüldü. Soğuğa dayanıklı cryo tüpler içerisinde 1/9 oranında DMSO/FBS karıştırıldı. Hücrelerin bulunduğu cryo tüpler,  $-86 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de propanol bulunan kap içerisine kademeli şekilde donmak üzere bırakıldıktan 24 saat sonra sıvı azot tankına ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aktarıldı (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Hücrelerin dondurulması

### 3.2.6. Sitotoksisite Deneyleri

#### 3.2.6.1. HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri

HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 hücreleri, DT'nin bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, pasajları yapıldıktan sonra 96 kuyulu hücre kültürü plaklarının her bir kuyusunda 10000 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre hattı için ayrı gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin olduğu 3 ayrı plak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında inkübatörde bekletildi. Bekleme sürelerinin sonunda adherent haldeki hücrelerin bulunduğu plak kuyularına 0,08, 0,16, 0,8, 1,6, 8, 16, 80, 160 nM DT verildi. Plaklar 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

#### 3.2.6.2. Hücre Canlılığının MTT Testi ile Belirlenmesi

İnkübasyonun ardından plak kuyularına, hazırlanan MTT solüsyonundan 4 µl ilave edildi. 2 saat inkübasyonun ardından plak kuyularındaki sıvılar çekilerek üzerlerine 200 µl DMSO eklendi. Plaklar 30 dakika 25 °C sıcaklıkta karanlık ortamda bekletildikten sonra Epoch Microplate Spectrophotometer cihazında plakların 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenerek hücre canlılığı hesaplandı (3-1).



$$H (\%) = \left( \frac{DT_{Blank}}{DT_{Mean}} \right) \times 100 \quad (3-1)$$

H: Hücre canlılığı,  $DT_{Blank}$ : DT verilmiş ve verilmemiş kuyulardan alınan absorbansların farkı,  $DT_{Mean}$ : Aynı konsantrasyonlardaki kuyulardan alınan absorbans değerlerinin ortalaması

### 3.2.6.3. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri

HUVEC ve 1.1B4 hücreleri, baskılanmamış polimerin (NIP) bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, pasajları yapıldıktan sonra 96 kuyulu hücre kültürü plaklarının her bir kuyusunda 10000 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre hattı için ayrı gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin olduğu 3 ayrı plak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında inkübatörde bekletildi. Bekleme sürelerinin sonunda adherent haldeki hücrelerin bulunduğu plak kuyularına 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml NIP verildi. Plaklar 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından plak kuyularına hazırlanan MTT solüsyonundan 4 µl ilave edildi. 2 saat inkübasyonun ardından plak kuyularındaki sıvılar çekilerek üzerlerine 200 µl DMSO eklendi. Plaklar 30 dakika 25 °C sıcaklıkta karanlık ortamda bekledikten sonra Epoch Microplate Spectrophotometer cihazında plakların 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenerek hücre canlılığı hesaplandı (3-2).

$$H (\%) = \left( \frac{NIP_{Blank}}{NIP_{Mean}} \right) \times 100 \quad (3-2)$$

H: Hücre canlılığı,  $NIP_{Blank}$ : NIP verilmiş ve verilmemiş kuyulardan alınan absorbansların farkı,  $NIP_{Mean}$ : Aynı miktarlardaki kuyulardan alınan absorbans değerlerinin ortalaması

### **3.2.7. İmmünfloresan Boyama**

#### **3.2.7.1. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri**

HUVEC ve 1.1B4 hücreleri, DT'nin bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, pasajları yapıldıktan sonra 6 kuyulu hücre kültürü plaklarının her bir kuyusunda 115000 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre hattı için ayrı gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin olduğu 3 ayrı plak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında inkübatörde bekletildi. Bekleme sürelerinin sonunda aderent haldeki hücrelerin bulunduğu plak kuyularına 0,08, 8, 80 nM DT verildi. Plaklar 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kuyulardaki hücreler paraformaldehit ile sabitlenerek, triton x-100 yardımıyla hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Örnekler sırasıyla blok serumu ve falloidin 594 ile muamele edilerek her işlem arasında hücreler 3 kere PBS ile yıkandı. Falloidin 594 boyamasından sonra örnekler dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Lamlar, DAPI içeren solmayı engelleyici yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı. İmmünfloresan mikroskobu yardımıyla aktin filamentlerinin yapısının görüntülenmesi gerçekleştirildi.

#### **3.2.7.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri**

HUVEC ve 1.1B4 hücreleri, NIP'in bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, pasajları yapıldıktan sonra 6 kuyulu hücre kültürü plaklarının her bir kuyusunda 115000 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre hattı için ayrı gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin olduğu 3 ayrı plak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında inkübatörde bekletildi. Bekleme sürelerinin sonunda aderent haldeki hücrelerin bulunduğu plak kuyularına 1, 10, 100 µg/ml NIP verildi.

Plaklar 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kuyulardaki hücreler paraformaldehit ile sabitlenerek, triton x-100 yardımıyla hücrelerin geçirgenliği artırıldı.

Örnekler sırasıyla blok serumu ve falloidin 594 ile muamele edilerek her işlem arasında hücreler 3 kere PBS ile yıkandı. Falloidin 594 boyamasından sonra örnekler dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Lamlar, DAPI içeren solmayı engelleyici yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı. İmmünfloresan mikroskobu yardımıyla aktin filamentlerinin yapısının görüntülenmesi gerçekleştirildi.

### 3.2.8. Nötralizasyon Deneyleri

#### 3.2.8.1. Plastik Antikoru HUVEC ve 1.1B4 Hücreleri Üzerindeki Nötralizasyon Etkisi

HUVEC ve 1.1B4 hücreleri plastik antikoru DT'yi nötralize edebilme kapasitesinin belirlenebilmesi için pasajları yapıldıktan sonra 96 kuyulu hücre kültürü plaklarının her bir kuyusunda 10000 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre hattı için ayrı gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin olduğu 3 ayrı plak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında inkübatörde bekletildi. Bekleme sürelerinin sonunda aderent haldeki hücrelerin bulunduğu plak kuyularına 1,6 nM DT ile birlikte 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikor verildi. Plaklar 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından plak kuyularına, hazırlanan MTT solüsyonundan 4 µl ilave edildi. 2 saat inkübasyonun ardından plak kuyularındaki sıvılar çekilerek üzerlerine 200 µl DMSO eklendi. Plaklar 30 dakika 25 °C sıcaklıkta karanlık ortamda bekletildikten sonra Epoch Microplate Spectrophotometer cihazında plakların 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenerek hücre canlılığı hesaplandı (3-3).

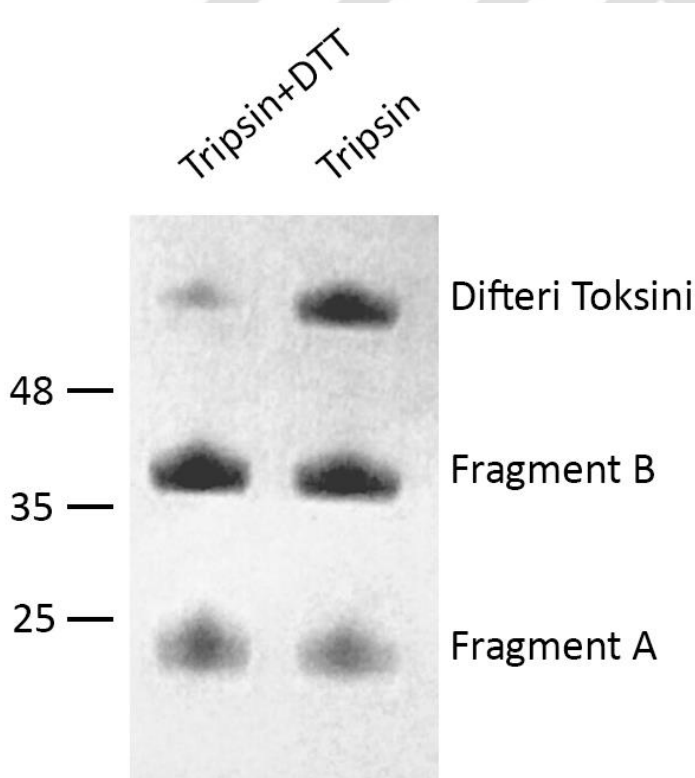
$$H (\%) = \left( \frac{PA_{Blank}}{PA_{Mean}} \right) \times 100 \quad (3-3)$$

H: Hücre canlılığı, PA<sub>Blank</sub>: Plastik antikor ile DT verilmiş ve verilmemiş kuyulardan alınan absorbansların farkı, PA<sub>Mean</sub>: Aynı miktarlardaki kuyulardan alınan absorbans değerlerinin ortalaması

## 4. BULGULAR

### 4.1. Difteri Toksininin A Fragmentinin Elde Edilme Sonuçları

Moleküler baskılama teknolojisi ile geliştirdiğimiz plastik antikorun üretimine benzer teknolojilerin kullanıldığı çalışmalara bakıldığında tercih edilen kalıp moleküllerin belirli bir molekül ağırlığının altında olduğu gözlenmektedir. Yaptığımız çalışmada kalıp molekül olarak kullanılan DT, diğer benzer çalışmalardaki kalıp moleküllere kıyasla daha büyük molekül ağırlığına sahip olması ve fragmente olabilmesi nedeni ile tercih edildi. Çalışmada, DT'nin hücre içine girerek toksik özellik gösteren A fragmenti baskılanarak, DT'nin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin azaltılması amaçlandı. Bunu gerçekleştirebilmek için DT'nin kısmi sindirimi gerçekleştirildi. Tripsin+DTT ve yalnızca tripsin ile iki farklı kısmi sindirim gerçekleştirilerek elektroforez sonuçları alındı (Şekil 4-1).

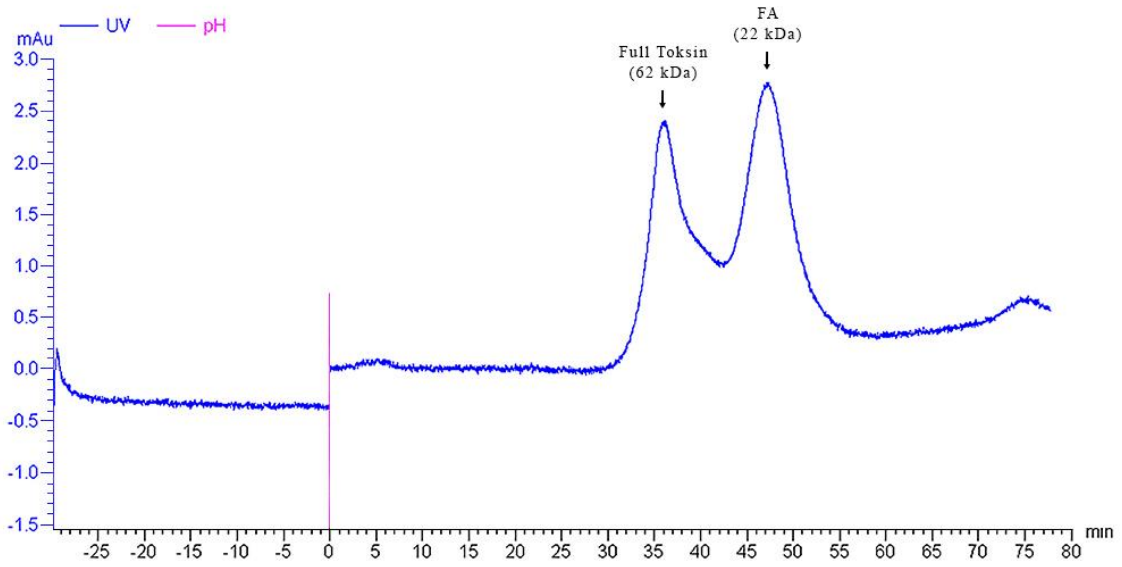


**Şekil 4-1: Sadece tripsin ve tripsin+DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT'nin elektroforez görüntüsü**

DT'nin kısmi sindirim işlemlerinin sonunda yapılan elektroforez ile full toksin (DT), FA ve FB jel üzerinde görülmektedir.

Tripsin+DTT ile gerçekleştirilen kısmi sindirimin sonucunun sadece tripsin ile gerçekleştirilene kıyasla daha etkili olduğuna karar verilerek çalışmalarda tripsin+DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT kullanıldı.

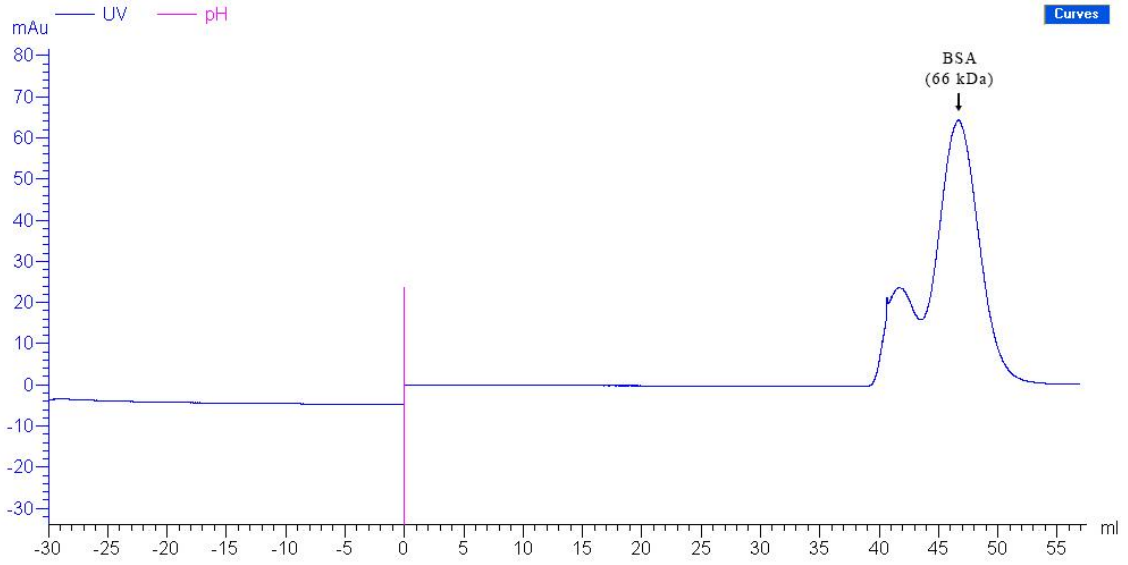
Kısmi sindirim işleminin ardından kalıp molekül olarak kullanılmak üzere FA'yı elde edebilmek için, kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT, likit kolon kromatografisi cihazına verildi ve FA fraksiyonlar halinde toplandı (Şekil 4-2).



**Şekil 4-2: Tripsin ve DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilen DT'nin likit kolon kromatografisi cihazı ile elde edilen FA fraksiyonlarının yer aldığı kromatogram**

Örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 1 ml/dk, DT konsantrasyonu: 32  $\mu$ M

Kalibrasyon için kolona BSA verildi. likit kolon kromatografisi cihazına BSA verilerek elde edilen kromatogram görüntüsündeki değerlerin (Şekil 4-3) aynı sistem kullanılarak yapılan diğer bir çalışmanın kalibrasyon görüntüsü ile örtüştüğü görüldü (Şekil 3-1).

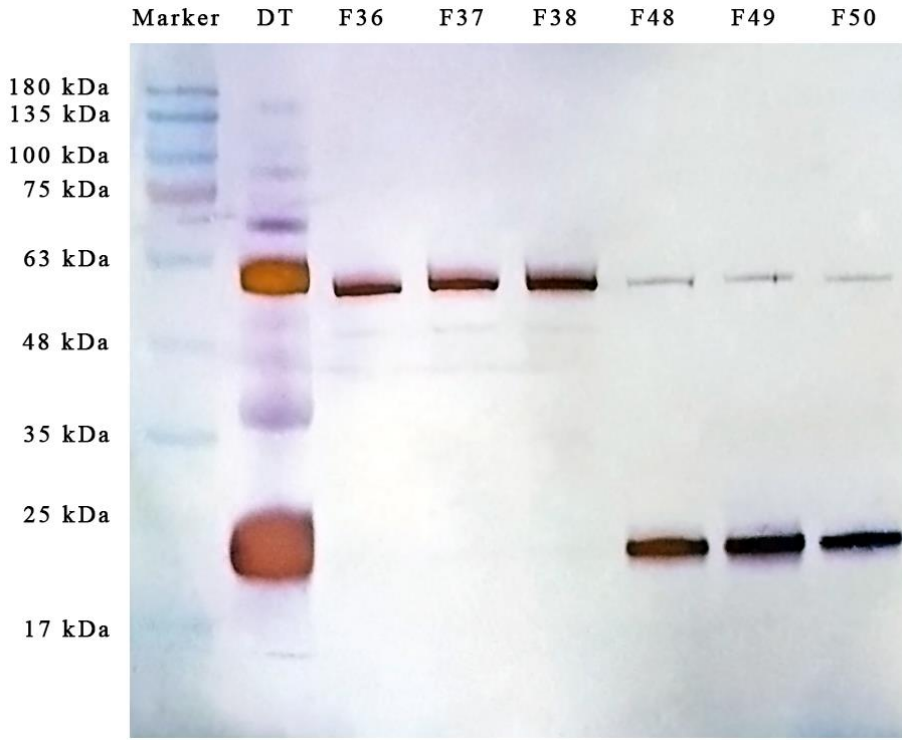


**Şekil 4-3: Sefakril S-100 kolonunun kalibrasyon grafiği**

Örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 1 ml/dk, BSA miktarı: 1 mg/ml

#### 4.2. Western-Blot Analizleri

Tripsin+DTT ile kısmi sindirimi gerçekleştirilmiş olan DT'nin likit kolon kromatografisi cihazından alınan fraksiyonlardan 36-38 ve 48-50'nin Western-Blot analizleri yapıldı. Bu analizden 48-50 fraksiyonlarında FA'nın varlığı belirlendi. 36-38 fraksiyonlarında ise zayıf bir bant şeklinde DT'nin varlığı belirlendi. Ancak bu bantların sinyal şiddetinin kısmi sindirimi gerçekleştirilmiş DT ile karşılaştırıldığında son derece zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 4-4). Bu analiz tripsin+DTT ile yapılan kısmi sindirim işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.



**Şekil 4-4: Anti-FA kullanılarak elde edilen Western-Blot sonucu**

36-37-38; DT (full toksin), 48-49-50; FA, B42; örnek yüklenmeden çalıştırılan likit kolon kromatografisi cihazından alınan tepe.

### 4.3. Protein Miktar Tayinleri

Likit kolon kromatografisi cihazı ile fraksiyonlar halinde elde edilen (Şekil 4-2) ve varlığı Western-Blot analizi ile tayin edilen (Şekil 4-4) FA'nın yer aldığı fraksiyonların protein konsantrasyonları, moleküler baskılama çalışmalarında kullanılmak üzere belirlendi (Tablo 4-1). Protein konsantrasyonlarını belirlemek için Qubit Protein Assay Kit kullanıldı.

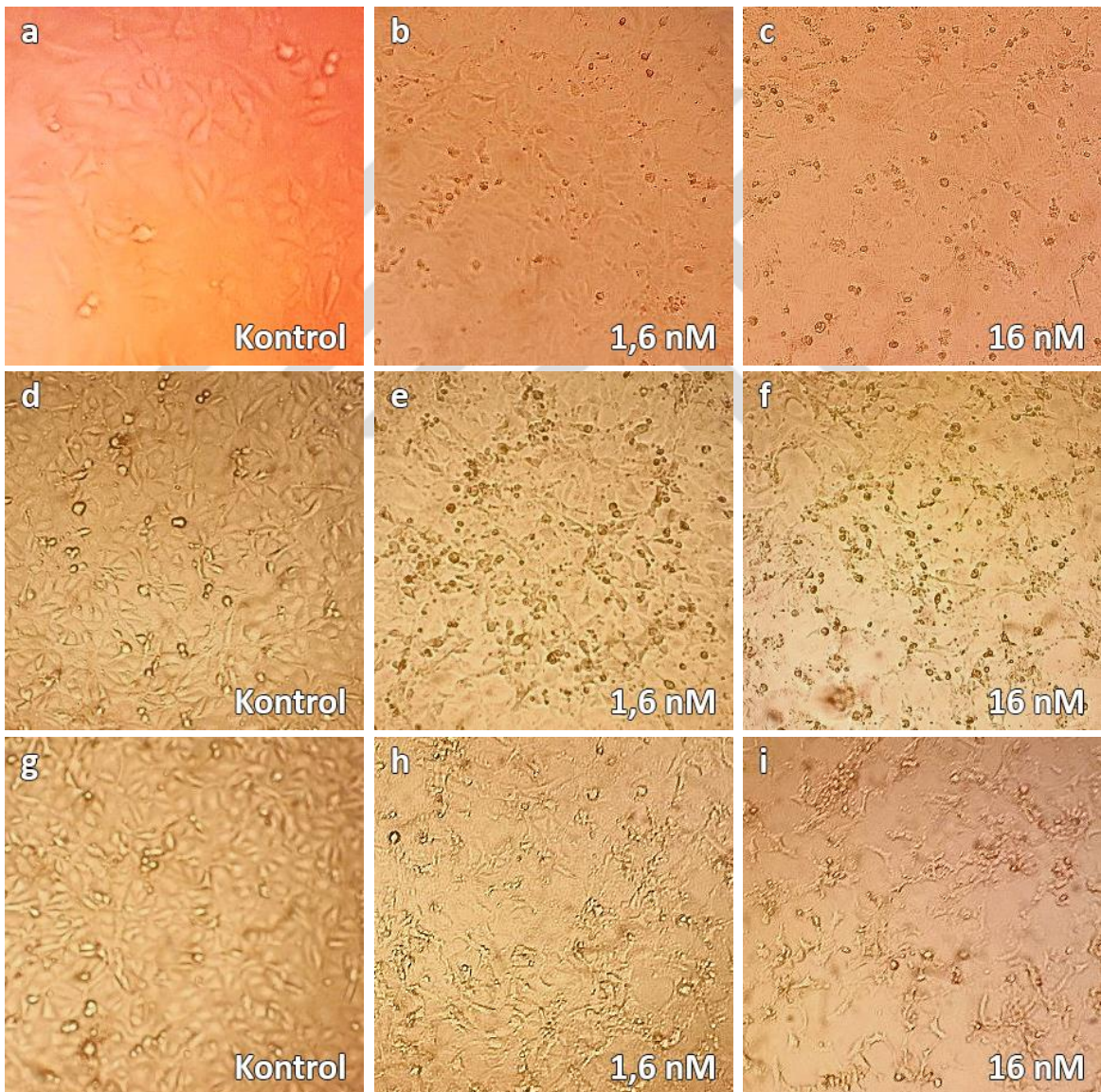
**Tablo 4-1: Fraksiyonların protein konsantrasyonları**

Fraksiyon	Protein Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )
48	4,43
49	2,79
50	4,19

#### 4.4. Sitotoksosite Deneyleri

##### 4.4.1. HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 Hücrelerinin Difteri Toksini İle Etkileşimleri

DT ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında öncelikle DT'nin HUVEC, NIH-3T3 ve 1.1B4 hücreleri üzerindeki etkileri belirlendi. Bu amaçla 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin morfolojisinde meydana gelen değişimler ışık mikroskobu altında incelendi. Bunlardan NIH-3T3, DT'ye dirençli olduğu görüldüğünden sonraki deneylerde kullanılmadı.



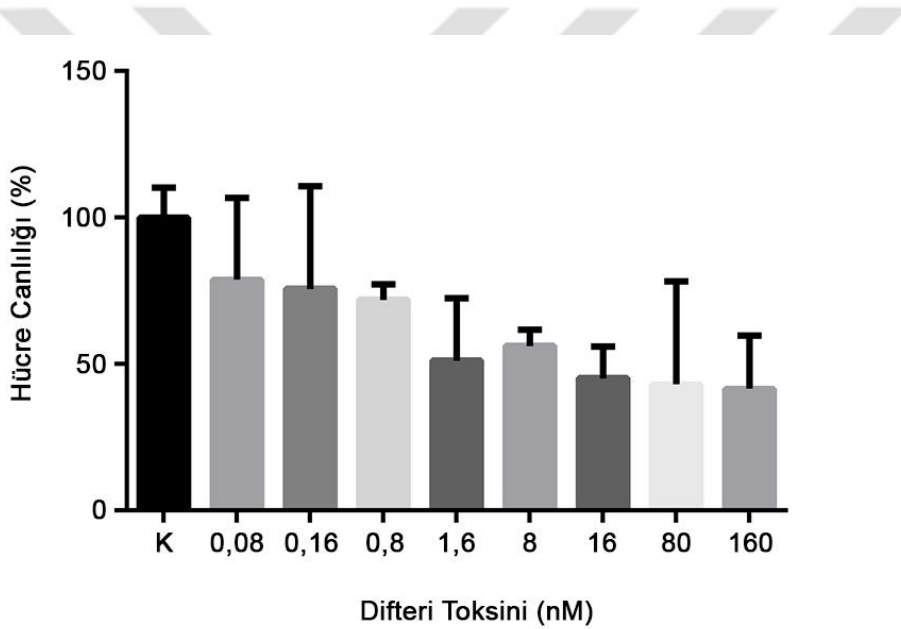
**Şekil 4-5: HUVEC hücrelerinin DT ile 24-48-72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri**

24 saat: a, b, c; 48 saat: d, e, f; 72 saat: g, h, i. DT: a, d, g: Kontrol, b, e, h: 1,6 nM, c, f, i: 16 nM

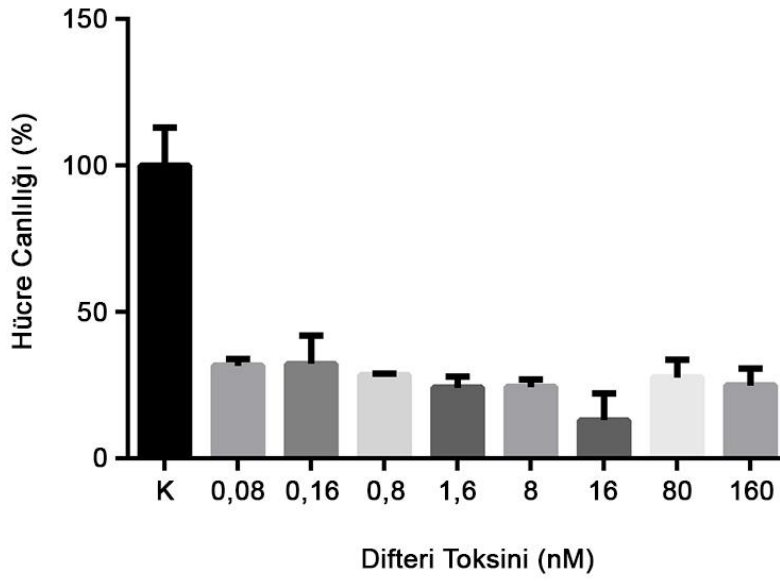


1,6 nM DT ile muamele edilen hücrelerin 24 saat sonra canlılıklarını büyük ölçüde korumasına rağmen (Şekil 4-5b), aynı konsantrasyonun 72 saat sonra hücreleri hemen hemen tamamen öldürdüğü gözlemlendi (Şekil 4-5h). 16 nM DT ise henüz 24 saatte bile hücreleri büyük ölçüde öldürmektedir (Şekil 4-5c).

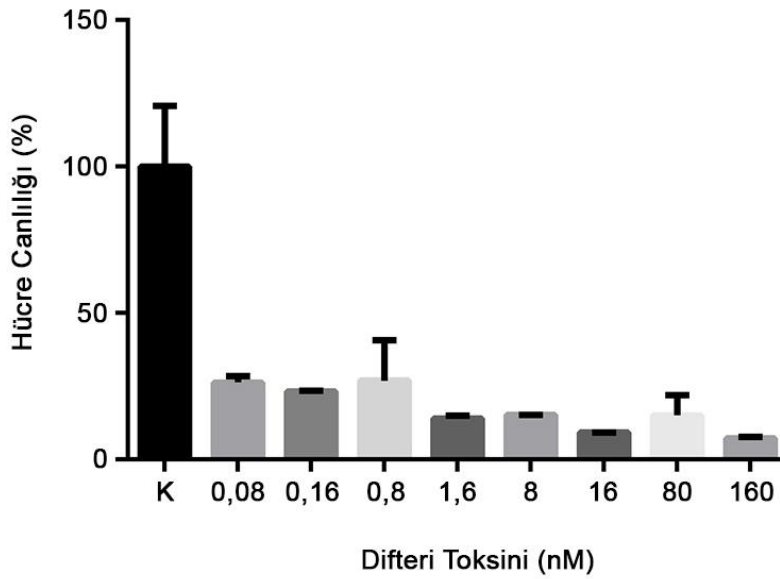
Çalışmada morfolojik değişimlerin incelendiği ışık mikroskobu görüntülerinin yanında, MTT testleri yapılarak Epoch Microplate Spectrophotometer cihazından alınan absorbans değerleri ile hücre canlılığı sayısal olarak da belirlendi. 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-6-8).



**Şekil 4-6: HUVEC hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**



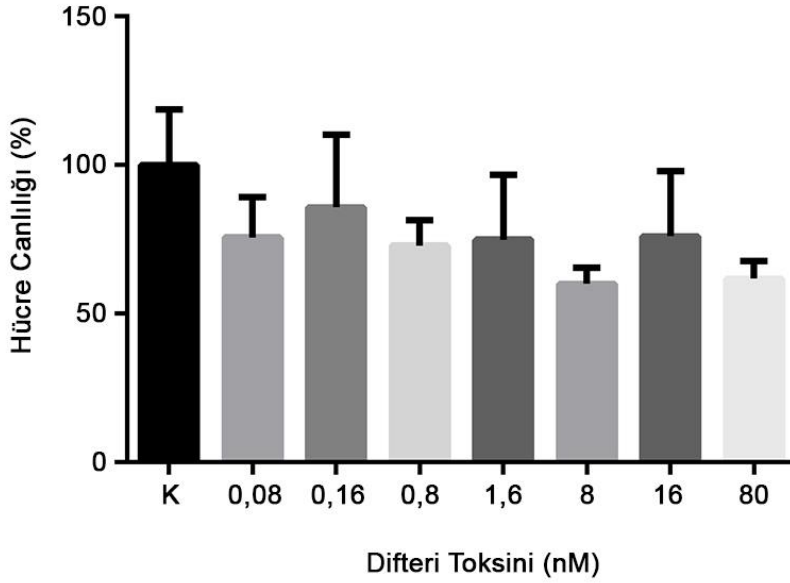
**Şekil 4-7: HUVEC hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**



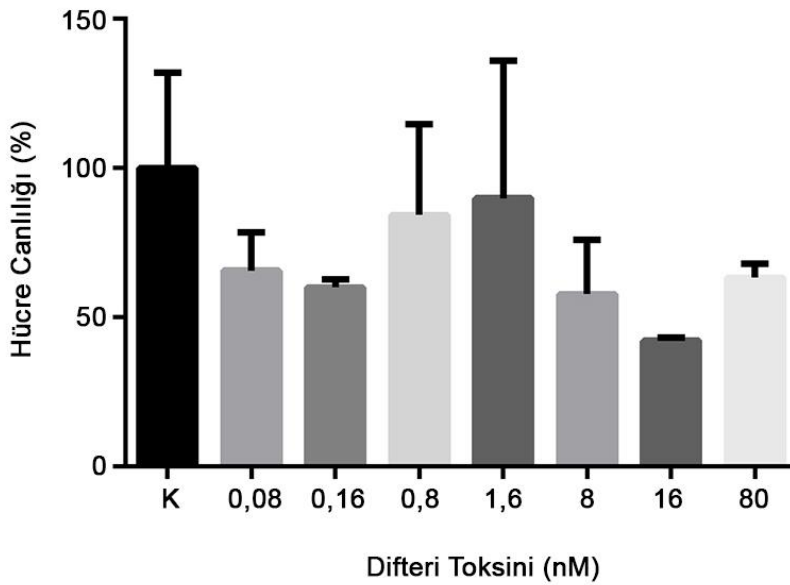
**Şekil 4-8: HUVEC hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**

Bu test sonuçları ışık mikroskobu görüntüleriyle uyum göstermektedir. Örneğin; 24 saat sonunda, 1,6 nM konsantrasyondaki DT, hücre canlılığını % 51,21'e düşürmektedir (Şekil 4-6).

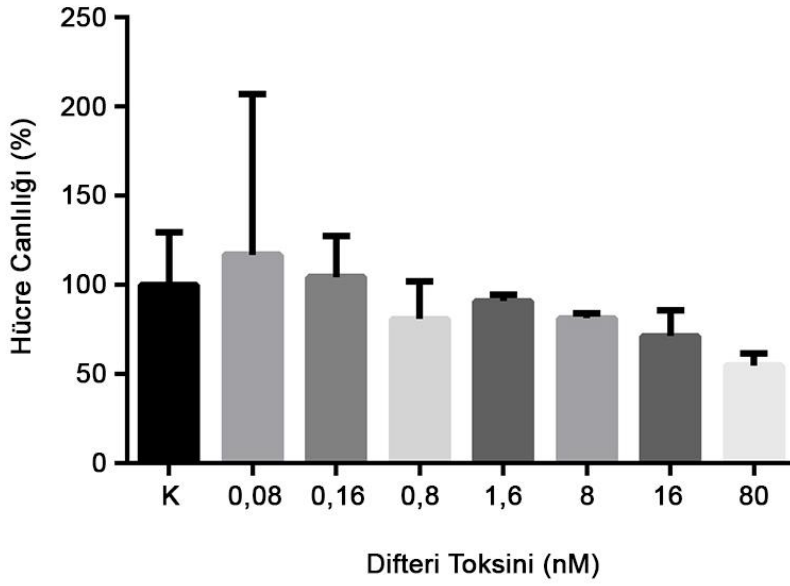
DT'nin NIH-3T3 hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için MTT testi gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen NIH-3T3 hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-9-11).



Şekil 4-9: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları

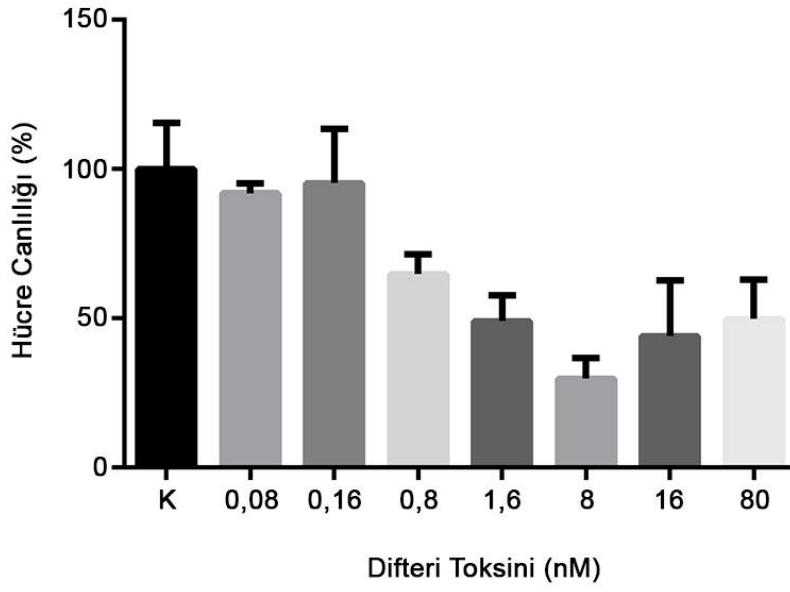


Şekil 4-10: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları

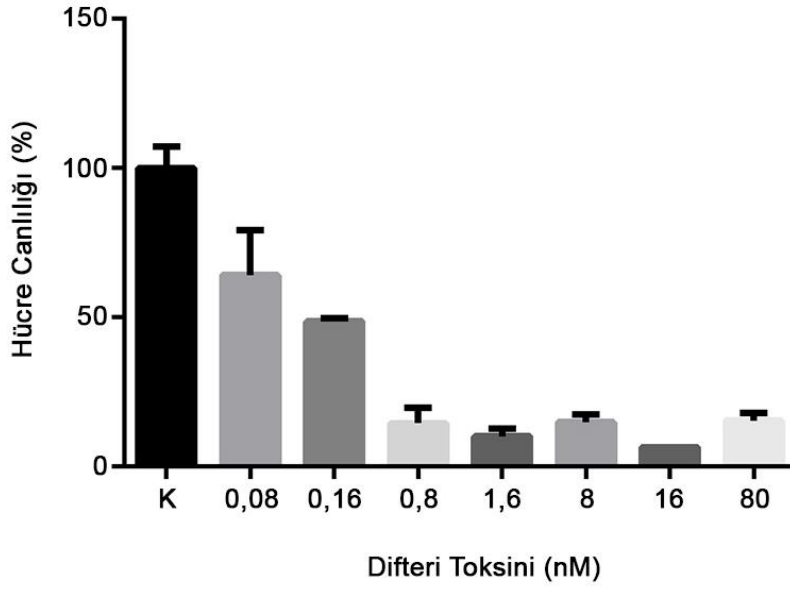


**Şekil 4-11: NIH-3T3 hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**

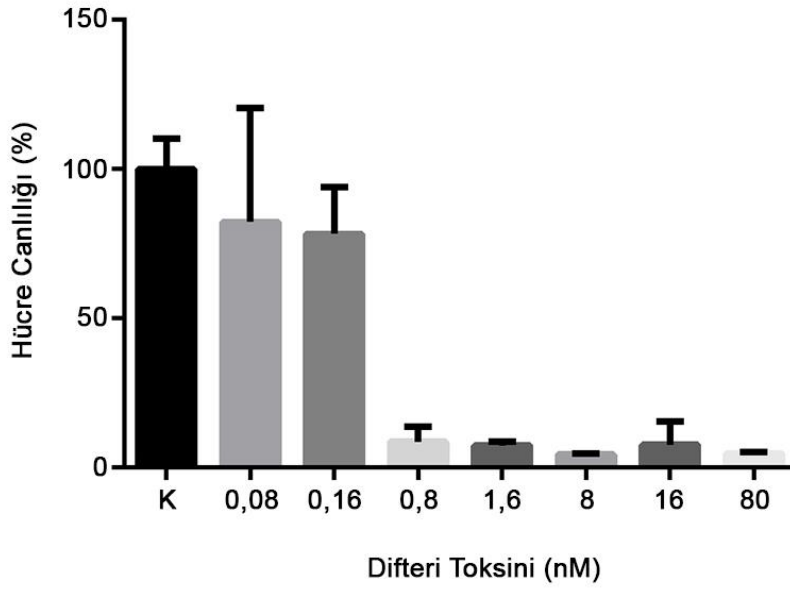
DT'ye karşı dirençli olduğu görüldüğünden NIH-3T3 hücrelerine sonraki çalışmalarda yer verilmedi. Onun yerine insan pankreatik beta hücresi olan 1.1B4 hücreleri ile çalışmalara devam edildi. DT'nin 1.1B4 hücreleri üzerindeki etkisini anlamak amacıyla MTT testleri yapıldı. 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-12-14).



Şekil 4-12: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları



Şekil 4-13: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları

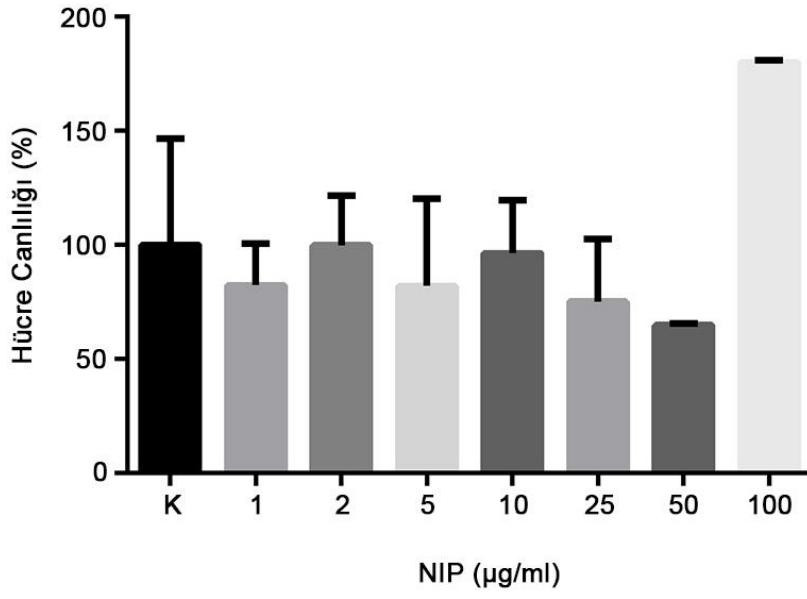


**Şekil 4-14: 1.1B4 hücrelerinin DT ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**

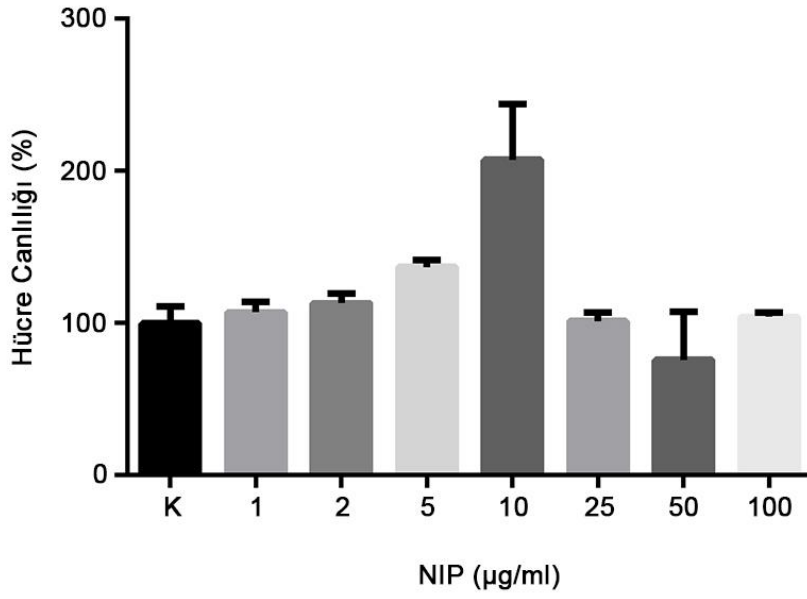
1.1B4 hücrelerinin de HUVEC hücreleriyle benzer şekilde DT'ye duyarlı olduğu belirlendi. HUVEC hücrelerinde olduğu gibi 1.1B4 hücrelerinde de 1,6 nM DT konsantrasyonuna bakıldığında 1.1B4 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre canlılığının % 49,11'e düşüdüğü gözlenmektedir (Şekil 4-12). 1,6 nM konsantrasyonu hücrelerin yaklaşık % 50'sini öldürmesi nedeni ile yapılan nötralizasyon deneylerinde bu değer kullanıldı.

#### **4.4.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri**

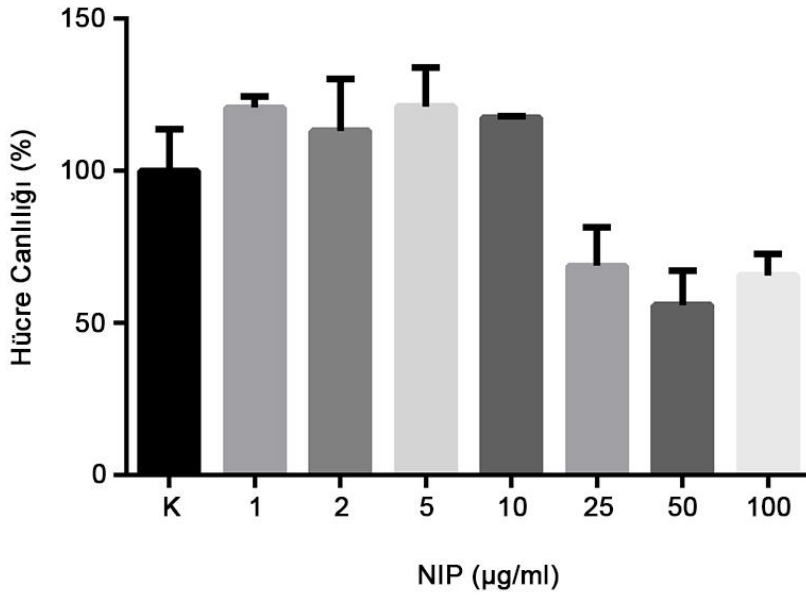
DT'ye duyarlı olduğu gözlenen HUVEC ve 1.1B4 hücreleri, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere hücre kültür ortamında çoğaltıldı. Plastik antikor ile aynı yapıda olup herhangi bir kalıp molekül kullanılmadan üretilen NIP'm, HUVEC ve 1.1B4 hücrelerine verilmesi ile MTT testi yapılarak hücre canlılıkları belirlendi. 24, 48 ve 72 saat sürelerle NIP ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-15-17).



Şekil 4-15: HUVEC hücrelerinin NIP ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları



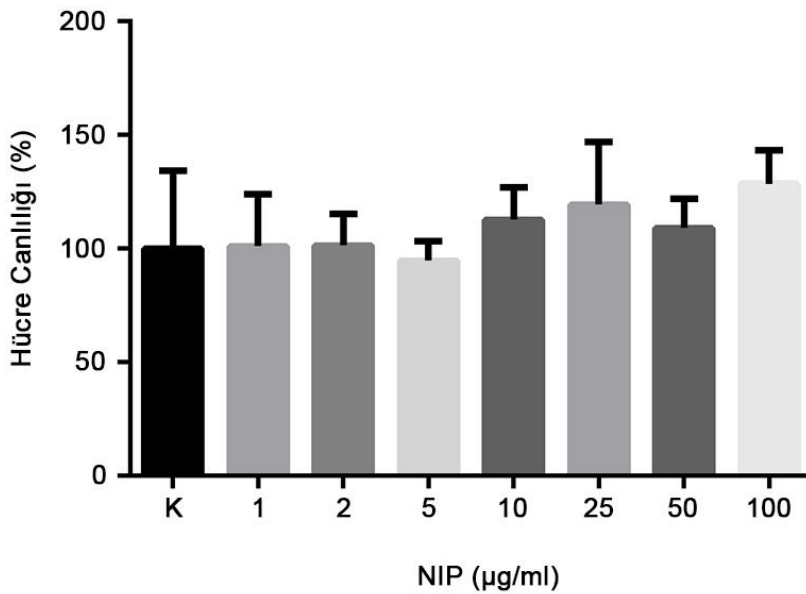
Şekil 4-16: HUVEC hücrelerinin NIP ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları



**Şekil 4-17: HUVEC hücrelerinin NIP ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**

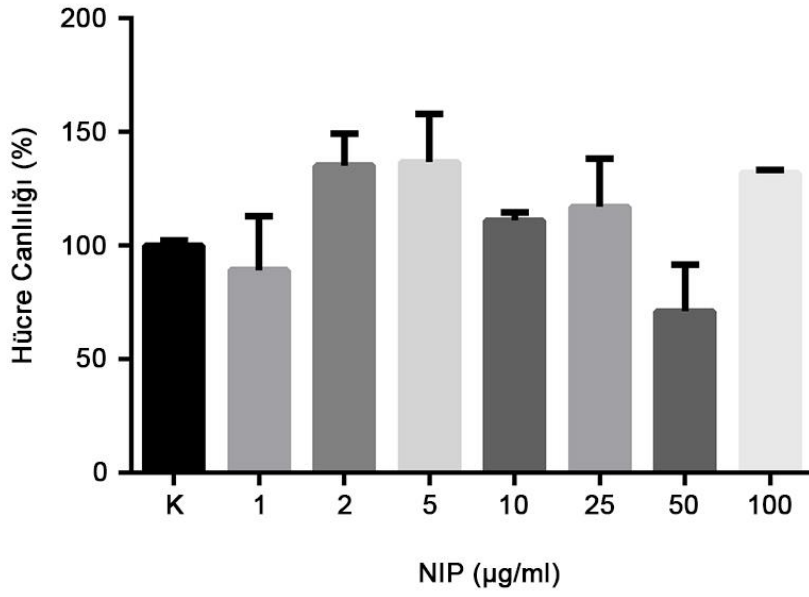
HUVEC hücreleri ile yapılan MTT testlerinin sonunda NIP'in hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4-15-17).

24, 48 ve 72 saat sürelerle NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-18-20).

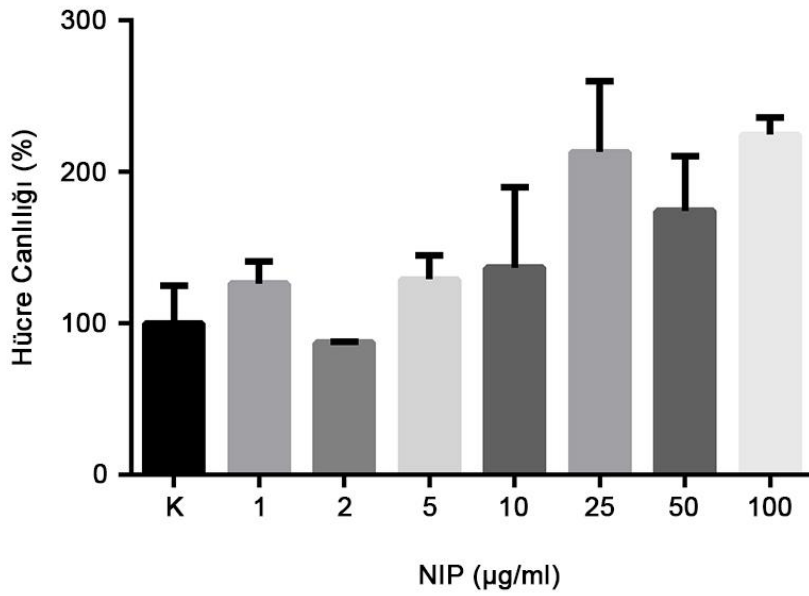


**Şekil 4-18: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları**





Şekil 4-19: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 48 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları



Şekil 4-20: 1.1B4 hücrelerinin NIP ile 72 saat süre ile muamele edilmesi sonrası hücre canlılıkları

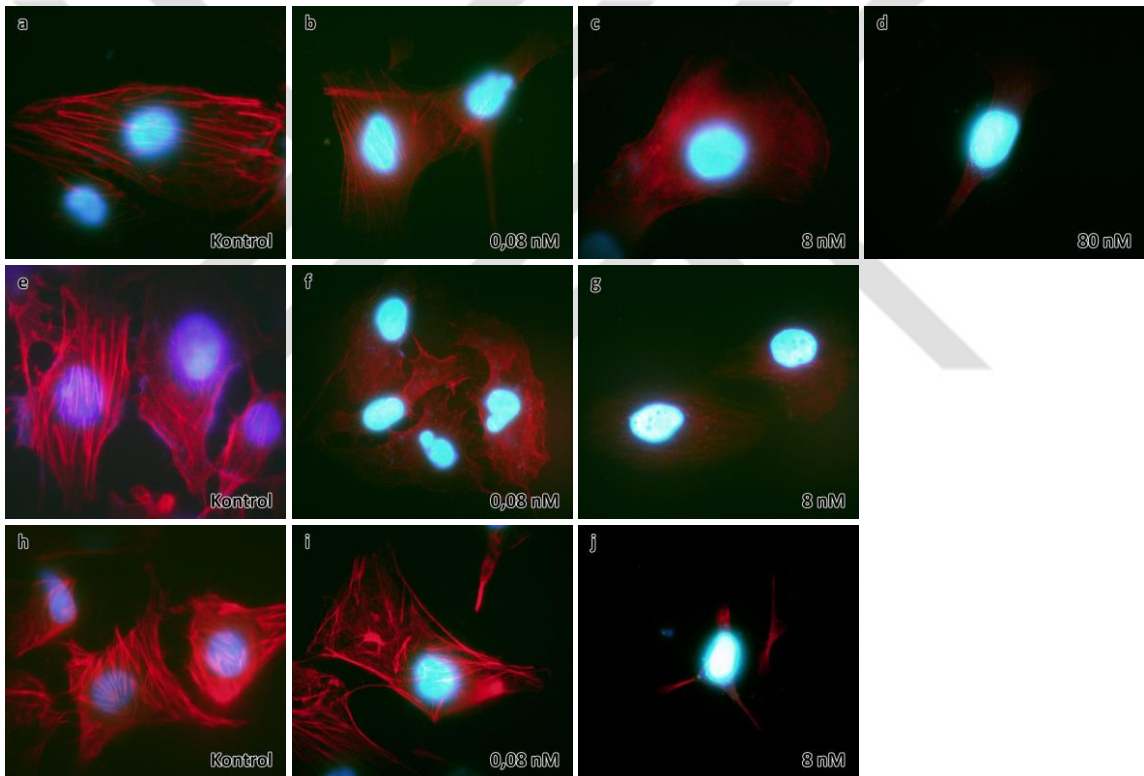
1.1B4 hücreleri ile yapılan MTT testlerinin sonunda NIP'in hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4-18-20).

Her iki hücre hattında da 1-100 µg/ml NIP miktarlarında 24-72 saatlik muamele sürelerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlendi.

## 4.5. İmmünfloresan Boyama

### 4.5.1. DT İle Muamele Edilen HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin İmmünfloresan Boyama Görüntüleri

Hücrelerin DT etkisi altında, aktin filamentlerinde meydana gelen yapısal değişimleri anlamak amacıyla immünfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirildi. HUVEC ve 1.1B4 hücreleri DT ile muamele edilerek, hücrelerin aktin filamentleri incelendi. 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4-21).



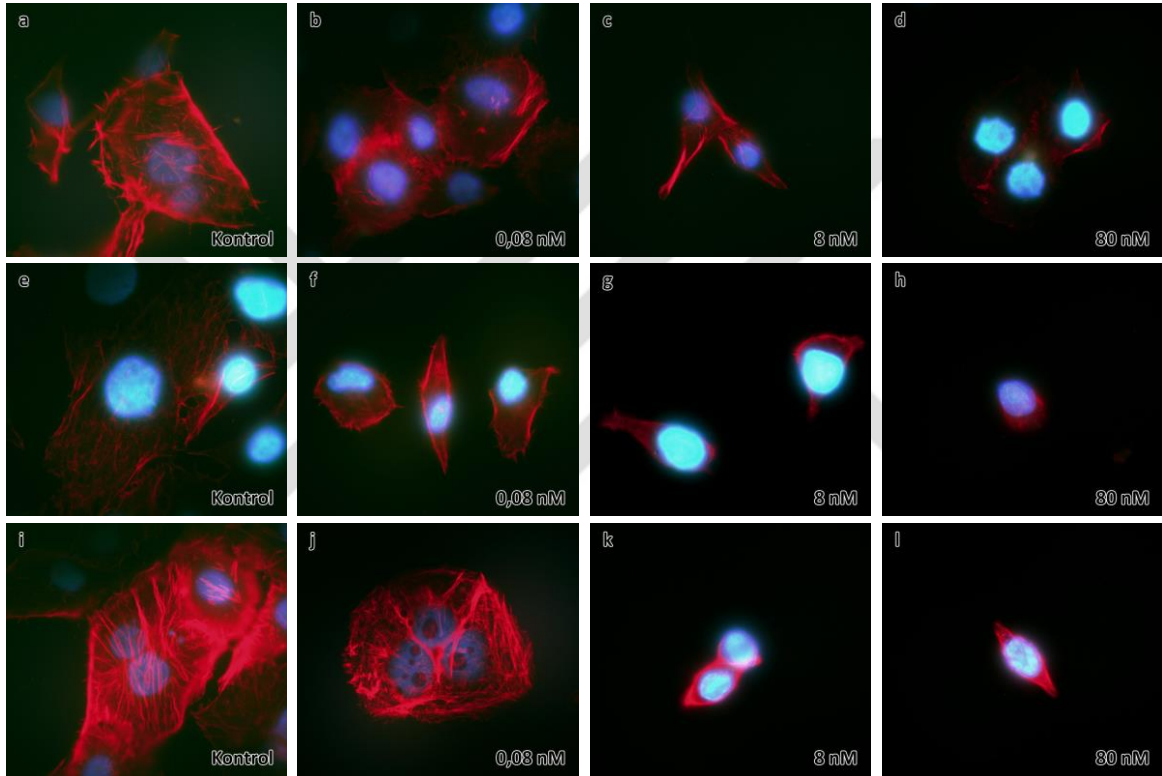
**Şekil 4-21: DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g; 72 saat: h, i, j. DT: a, e, h: Kontrol, b, f, i: 0,08 nM, c, g, j: 8 nM, d: 80 nM (48 ve 72 saat için aktin filamentlerinin 8 nM DT konsantrasyonunda yapısal özelliklerini büyük ölçüde kaybetmeleri nedeniyle 80 nM deneye dahil edilmemiştir.)

DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin immünfloresan görüntülerine bakıldığında 24-72 saat sonundaki kontrol hücrelerine kıyasla aktin filamentlerinin yapısının konsantrasyon artışına bağlı olarak bozulduğu gözlenmektedir (Şekil 4-21). 24 saat sonunda aktin filamentlerinin 80 nM konsantrasyonda tamamına yakınının yok

olduğu görülürken (Şekil 4-21d) 48 ve 72 saat sonunda aynı durumun 8 nM konsantrasyonda gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4-21g-j). Bu durum DT'nin zamana bağlı olarak hücrelerin aktin filamentlerinin yıkımına neden olduğunu göstermektedir.

24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4-22).



**Şekil 4-22: DT ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

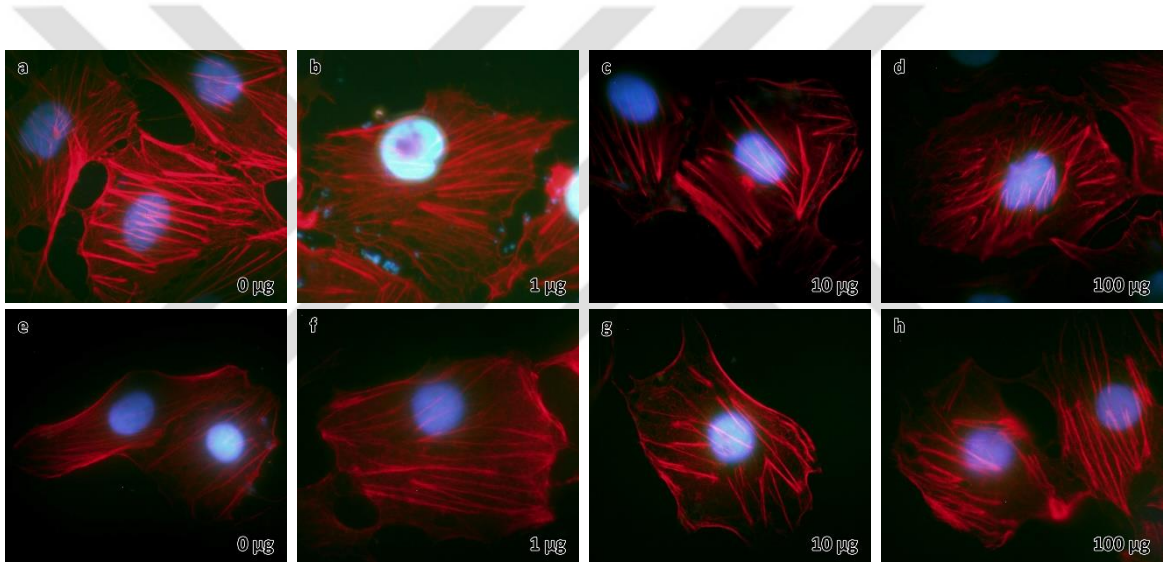
24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g, h; 72 saat: i, j, k, l. DT: a, e, i: Kontrol, b, f, j: 0,08 nM, c, g, k: 8 nM, d, h, l: 80 nM

1.1B4 hücreleri HUVEC hücreleri ile kıyaslandığında, DT'nin daha düşük konsantrasyonlarda da etkili olduğu gözlenmektedir. Elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısı incelendiğinde, özellikle 48 ve 72 saat sonunda 8 nM konsantrasyonda hücrelerinin aktin filamentlerinin büyük ölçüde yıkıma uğradığını söylemek mümkündür (Şekil 4-22g-k). Bu durum DT'nin 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinde HUVEC hücrelerinininkinden daha kısa sürede yıkıma neden olduğu ile açıklanabilir. 1.1B4 hücreleri ile gerçekleştirilen

immünfloresan boyama çalışmalarından elde edilen sonuçların, aynı hücre hattı ile yapılan MTT sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir (Şekil 4-18-20).

#### 4.5.2. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Baskılanmamış Polimer İle Etkileşimleri

Hücrelerin NIP etkisi altında aktin filamentlerinde meydana gelen yapısal değişimleri anlamak amacıyla immünfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirildi. HUVEC ve 1.1B4 hücreleri NIP ile muamele edilerek, hücrelerin aktin filamentleri incelendi. 24 ve 48 saat sürelerle NIP ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4-23).

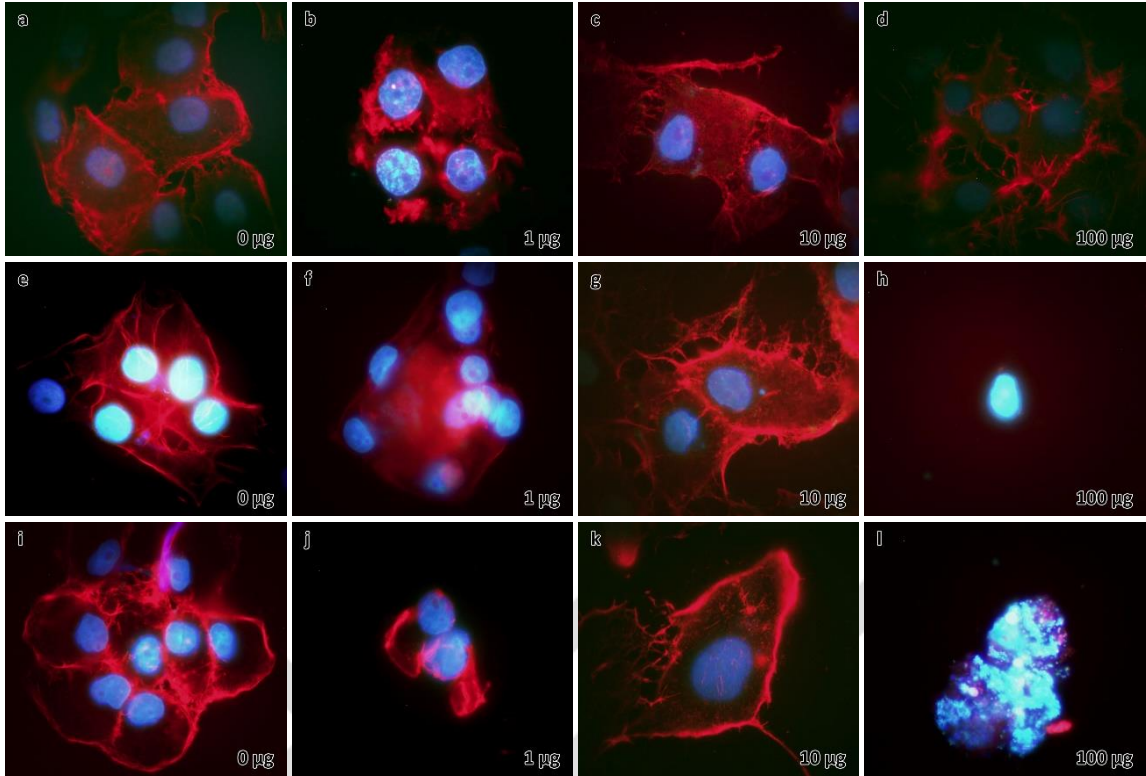


**Şekil 4-23: NIP ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin 24-48 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g, h. NIP: a, e: Kontrol, b, f: 1 µg/ml, c, g: 10 µg/ml, d, h: 100 µg/ml

NIP ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısına bakıldığında herhangi bir tahribat olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4-23). Bu sonuç, NIP'in HUVEC hücreleri ile yapılan MTT testlerinin sonuçları ile de örtüşmektedir (Şekil 4-15-17).

24, 48 ve 72 saat sürelerle NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4-24).



**Şekil 4-24: NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

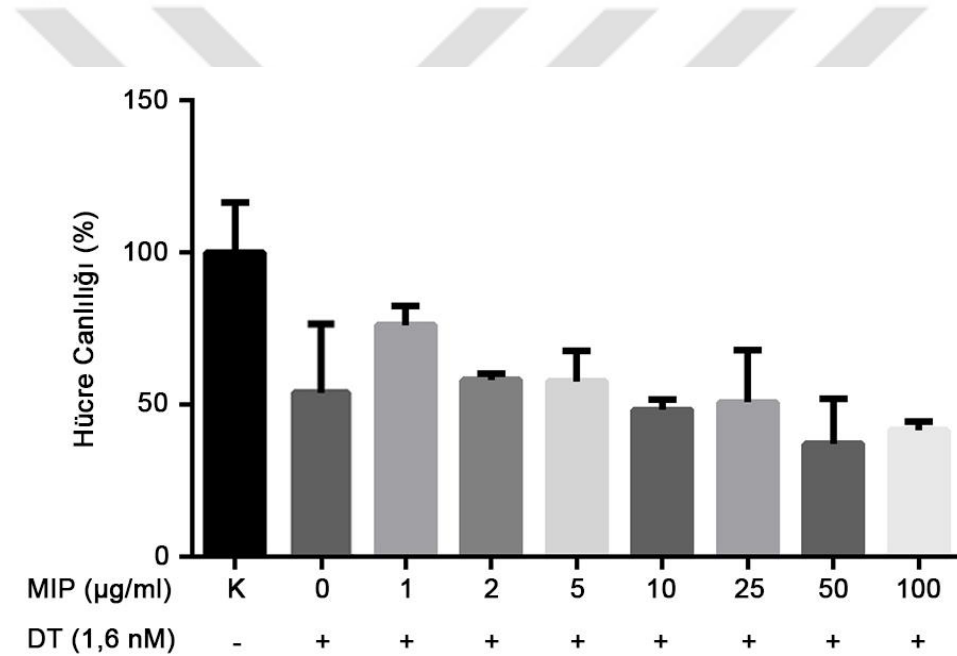
24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g, h; 72 saat: i, j, k, l. a, e, i: Kontrol, b, f, j: 1 µg/ml, c, g, k: 10 µg/ml, d, h, l: 100 µg/ml

NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısına bakıldığında NIP verilen hücreler ile kontrol hücrelerinin arasında farklılık görülmemektedir (Şekil 4-24). NIP ile muamele edilen 1.1B4 hücreleri ile yapılan MTT testlerinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda (Şekil 4-18-20) immünfloresan boyama sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir.

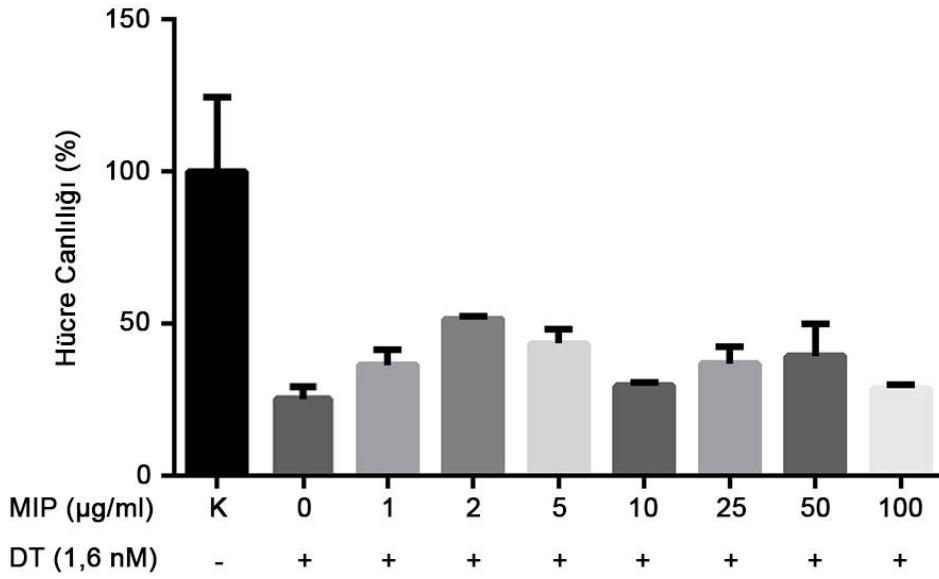
#### 4.6. Nötralizasyon Deneyleri

##### 4.6.1. HUVEC ve 1.1B4 Hücrelerinin Plastik Antikor ve Difteri Toksini İle Etkileşimleri

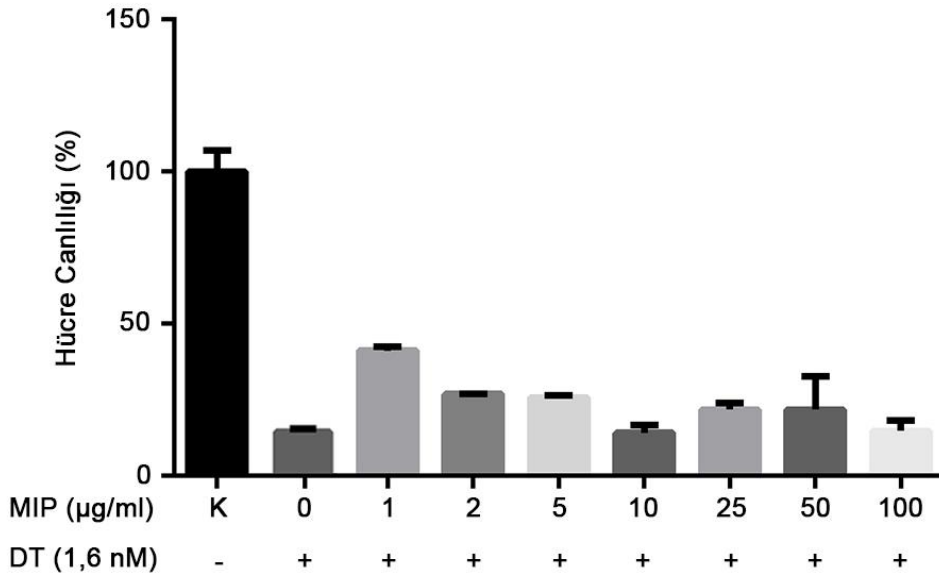
HUVEC ve 1.1B4 hücrelerine verilen DT ile plastik antikorun etkileşimleri MTT testleri ile belirlendi. Bunun için plastik antikor hücrelere DT ile birlikte verildi. Daha önce HUVEC hücreleri ile DT verilerek yapılan sitotoksosite deneylerinde, 24 saat sonunda hücrelerin yarısının öldüğü doz 1,6 nM olarak belirlendi (Şekil 4-6). Nötralizasyon deneyleri, hücrelere 1,6 nM DT verilerek gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ve plastik antikor ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler hesaplanarak grafikleri çizildi (Şekil 4-25-27).



Şekil 4-25: 1,6 nM DT ile birlikte hücrelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi



**Şekil 4-26: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 48 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi**



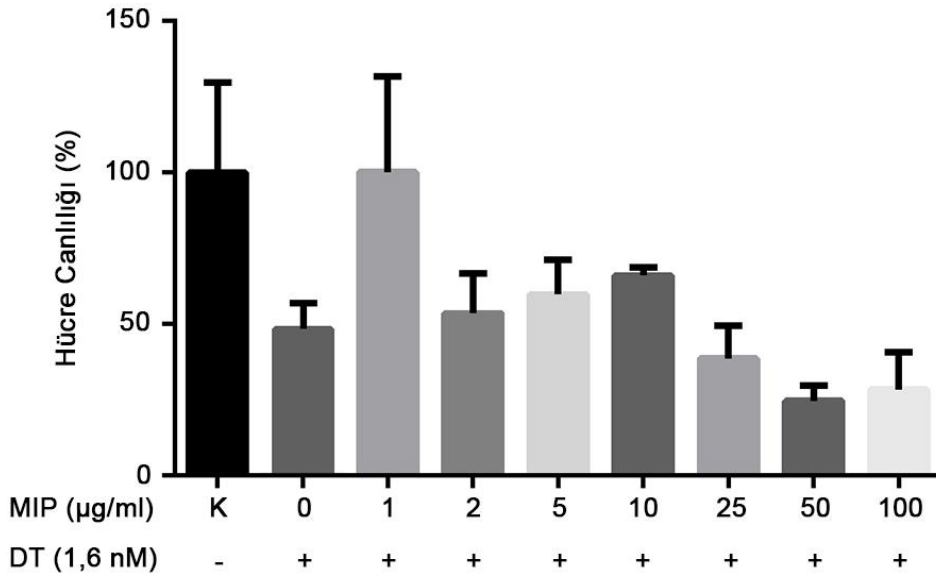
**Şekil 4-27: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun HUVEC hücrelerinin 72 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi**

HUVEC hücrelerine DT ve plastik antikor verilerek gerçekleştirilen nötralizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda plastik antikorun 1, 2 ve 5 µg/ml değerlerinde etkili olduğu gözlenmektedir. HUVEC hücrelerinin 1 µg/ml değerinde plastik antikor verilerek gerçekleştirilen nötralizasyon

deneyleri, DT'nin hücrelere tek başına verildiği MTT testleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılıklarında 24 saat sonunda % 25,04 artış görülmektedir (Şekil 4-6, 25). 48 saat sonuna bakıldığında hücre canlılığındaki artışın % 37,53'e kadar çıktığı gözlenmektedir (Şekil 4-7, 26). Bu durum plastik antikorun etkinliğinin 24 ile 48 saat arasında artışı gösterdiği şekilde yorumlanabilir.

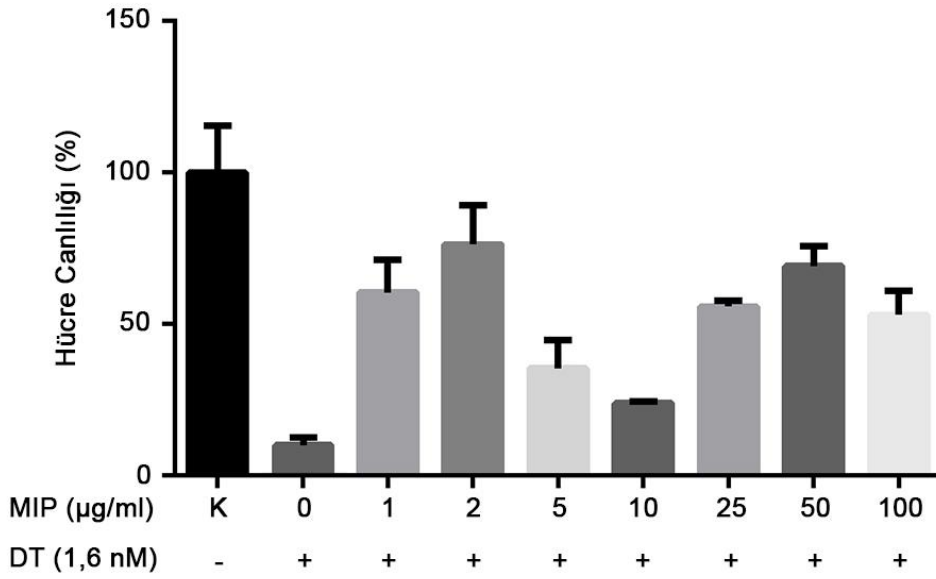
Buradan elde edilen sonuçlardan düşük miktarlarda verilen plastik antikorun (1, 2 ve 5  $\mu\text{g/ml}$ ), *in vitro* ortamda DT'nin hücreler üzerindeki toksik etkisini azalttığı anlaşılmaktadır.

24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ve plastik antikor ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin canlılıklarında meydana gelen değişimler MTT testi kullanılarak ve Epoch Microplate Spectrophotometer cihazından alınan veriler göz önünde bulundurularak hesaplandı (Şekil 4-28-30).

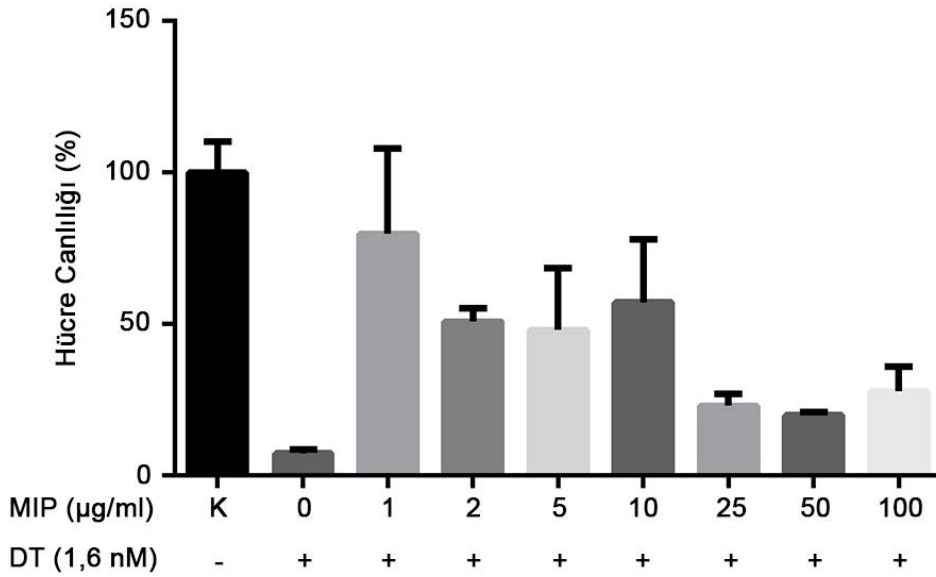


Şekil 4-28: 1,6 nM DT ile birlikte hücrelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi





**Şekil 4-29: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 48 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi**



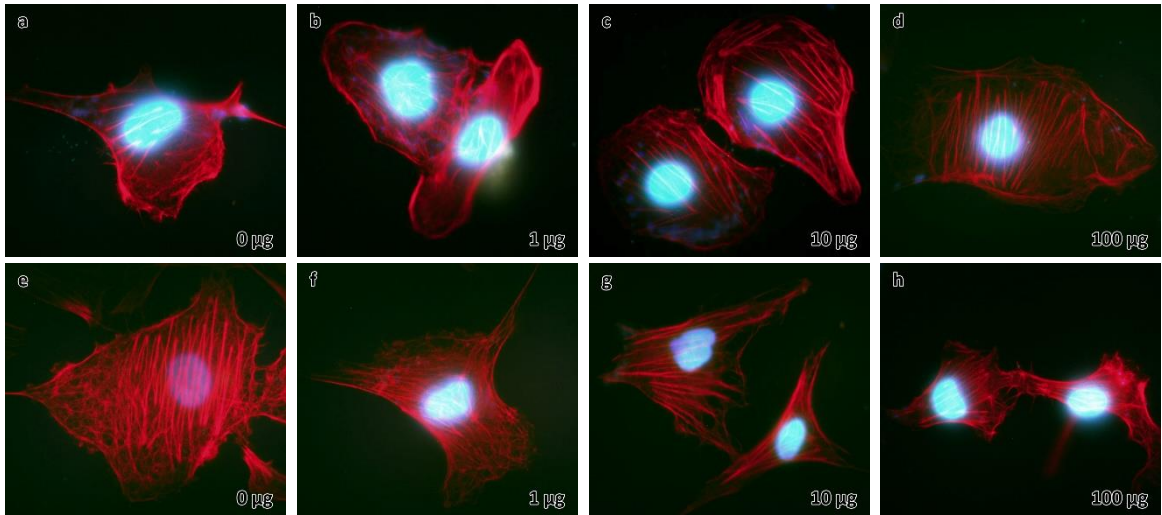
**Şekil 4-30: 1,6 nM DT ile birlikte hücelere verilen, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml plastik antikorun 1.1B4 hücrelerinin 72 saat sonundaki hücre canlılığına etkisi**

1.1B4 hücrelerine DT ve plastik antikor verilerek gerçekleştirilen nötralizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda plastik antikorun 1, 2 ve 5 µg/ml değerlerinde etkili olduğu gözlenmektedir. 1.1B4 hücrelerinin 1 µg/ml değerinde plastik antikor verilerek gerçekleştirilen nötralizasyon deneyleri, DT'nin hücelere tek başına verildiği MTT testleri ile karşılaştırıldığında, hücre canlılıklarında

24 saat sonunda % 51,08 artış görülmektedir (Şekil 4-12, 28). 1 µg/ml değerinde 48 saat sonuna bakıldığında hücre canlılığındaki artışın % 50,22 olduğu gözlenmektedir. 2 µg/ml değerinde gerçekleşen artışın ise % 66,05 olduğu görülmektedir (Şekil 4-13, 29). Buradan elde edilen sonuçlar, HUVEC hücreleri ile yapılan nötralizasyon testlerinin sonuçları ile benzer şekilde plastik antikorun etkinliğinin 24 ile 48 saat arasında arttığını göstermektedir.

Buradan elde edilen ve HUVEC hücreleri ile yapılan nötralizasyon testleri ile benzer şekilde, düşük miktarlarda verilen plastik antikorun (1, 2 ve 5 µg/ml), *in vitro* ortamda DT'nin hücreler üzerindeki toksik etkisini azalttığı anlaşılmaktadır.

Hücrelerin plastik antikor ve DT etkisi altında aktin filamentlerinde meydana gelen yapısal değişimleri anlamak amacıyla immünfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirildi. HUVEC ve 1.1B4 hücreleri plastik antikor ve DT ile muamele edilerek aktin filamentleri incelendi. 24 ve 48 saat sürelerle DT ve plastik antikor ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4-31).



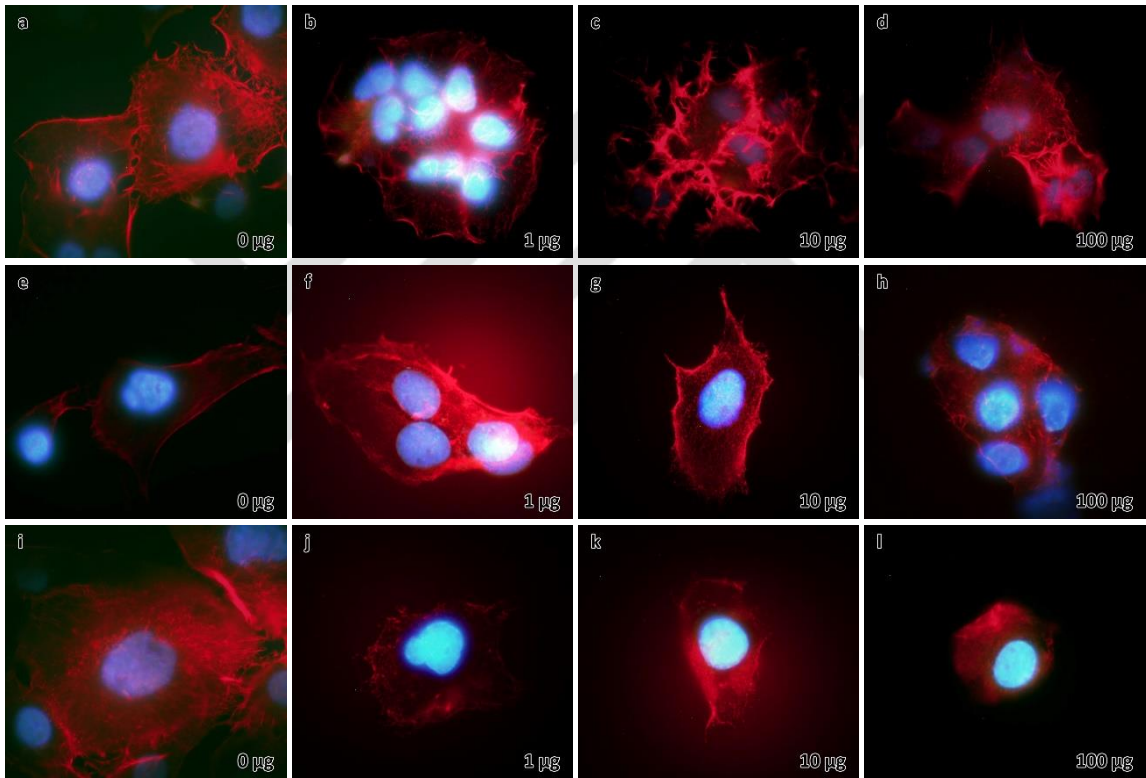
**Şekil 4-31: 1,6 nM DT ile 0, 1, 10, 100 µg/ml plastik antikor verilen HUVEC hücrelerinin 24-48 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g, h. DT: a, e: Kontrol, b, c, d, f, g, h: 1,6 nM; Plastik antikor: a, e: Kontrol, b, f: 1 µg/ml, c, g: 10 µg/ml, d, h: 100 µg/ml

Plastik antikor ve DT ile muamele edilen HUVEC hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısına bakıldığında plastik antikor ve DT verilen hücreler ile kontrol

hücreleri arasında pek farklılık görülmemektedir (Şekil 4-31). Plastik antikor ve DT ile muamele edilen HUVEC hücreleri ile yapılan MTT testlerinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda (Şekil 4-25-27) immünfloresan boyama sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir.

24, 48 ve 72 saat sürelerle DT ve plastik antikor ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinde meydana gelen morfolojik değişimleri anlamak için hücreler immünfloresan mikroskopu altında görüntülendi (Şekil 4-32).



**Şekil 4-32: 1,6 nM DT ile 0, 1, 10, 100 µg/ml plastik antikor verilen 1.1B4 hücrelerinin 24-48-72 saat sonundaki immünfloresan boyama görüntüleri**

24 saat: a, b, c, d; 48 saat: e, f, g, h; 72 saat: i, j, k, l. DT: a, e, i: Kontrol, b, c, d, f, g, h, j, k, l: 1,6 nM; Plastik antikor: a, e, i: Kontrol, b, f, j: 1 µg/ml, c, g, k: 10 µg/ml, d, h, l: 100 µg/ml

Plastik antikor ve DT ile muamele edilen 1.1B4 hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısına bakıldığında plastik antikor ve DT verilen hücreler ile kontrol hücreleri arasında pek farklılık görülmemektedir (Şekil 4-32). Benzer şekilde DT ile yapılan immünfloresan çalışmalarına kıyasla (Şekil 4-21-22) aktin filamentlerinin yapısının daha iyi durumda olduğu gözlemlendi. Plastik antikor ve DT ile muamele edilen 1.1B4 hücreleri ile yapılan MTT testlerinden elde edilen sonuçlar göz önünde

bulundurduğunda (Şekil 4-28-30) immünfloresan boyama sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir.

Yapılan sitotoksisite, immünfloresan boyama ve nötralizasyon deneylerinin sonunda, HUVEC ve 1.1B4 hücreleri üzerinde toksik etki gösteren DT'nin, plastik antikor kullanılarak hücre canlılığına etkisinin azaltıldığı ve bu sayede hücre canlılığının artırıldığı gösterilmiştir.



## 5. TARTIŞMA

Plastik antikorlar, moleküler baskılama yöntemi ile geliştirilen ve baskılanması hedeflenen kalıp moleküle karşı antikor benzeri ilginlik gösteren nano boyuttaki polimer yapılarıdır. Hedeflenen kalıp moleküle özgü üretilen plastik antikorlar, bu molekülleri tanıma, bağlama ve serbest bırakma özelliklerine sahiptirler. Biyolojik kökenli yapay antikorlar ile kıyaslandıklarında üretimleri daha kolay ve ucuzdur. Ayrıca üretim aşamasında hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaması plastik antikorların diğer bir avantajlı yönünü teşkil etmektedir.

Moleküler baskılama teknolojisi ile ilişkilendirilebilecek ilk çalışmalar 1930'lu yılların başlarında görülse de 1980'lerin son yıllarından günümüze kadar geçen sürede dünyada moleküler baskılamaya yönelik çalışmalarda gözle görülür bir artış yaşanmıştır. Bu süreçte, dünyanın farklı bölgelerinde çalışmalar yürüten birçok araştırmacı tarafından yayına dönüştürülmüş çok sayıda makale bulunmaktadır. 1989 yılında yapılan bir çalışmada, kalıp molekül olarak fenilalanin anilid seçilerek, iyonik ve hidrojen bağlama etkileşimleri de dahil olmak üzere kovalent olmayan etkileşimler ile polimerizasyon öncesi çözelti içindeki kalıp molekülün ve fonksiyonel monomerlerin önceden düzenlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit kullanılmıştır (O'Shannessy ve ark. 1989). 1993 yılında Nature dergisinde yayınlanmış başka bir çalışmada moleküler baskılanmış polimerlerin yarışmalı bağlanma testiyle antikorların yerine başarılı bir şekilde kullanılabildiğine yer verilmiştir (Vlatakis ve ark. 1993). 2000 yılında yapılmış olan diğer bir çalışmada, moleküler baskılanmış polimerler, buzağı idrarından klenbuterol temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Berggren ve ark. 2000). 2001 yılında, MIP'lerin biyolojik reseptörlerin işlevlerini taklit etme yeteneğinin, antikorlar ile birlikte anıldığı çalışmalar görülmektedir. Bu çalışmaların birinde MIP'lerin yüksek hassasiyet ve seçiciliğinin artırılması yönünde yaklaşımlara yer verilmiştir (Jenkins 2001). Aynı yıl yayınlanan diğer bir çalışmada, molekül ağırlığı yaklaşık 15.000 g/mol olan poli(alilamin hidroklorür) kalıp molekül olarak kullanılmış ve hidrojel yapıda üretilen MIP ile moleküler baskılama yaklaşımına yer verilmiştir. (Wizeman ve Kofinas 2001). 2010 yılına gelindiğinde, monomer yapıda 2,8 kDa molekül ağırlığına sahip bal arısının iğnesindeki zehir olan melitin peptid toksininin kalıp molekül olarak seçildiği bir makale

yayınlanmıştır. 2010 yılında yayınlanmış olan bu çalışmada, melitine karşı geliştirilen sentetik organik polimer nanoparçacıkların, toksini canlı farenin kan dolaşımında yakalayıp temizlediği *in vivo* deneyler ile gösterilmiştir (Hoshino ve ark. 2010). 2017 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, polikarbonat plastik üretiminde kullanılan bisfenol s, kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kalıp molekülün hızlı tespit edilebilmesi amacıyla, üzeri grafen kuantum noktaları ile kaplı içi boş nikel nanosferler kullanılarak düzenlenmiş camsı karbon elektrodundan yola çıkılarak, yeni bir moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir (Rao ve ark. 2017).

*Corynebacterium diphteriae* bakterilerinin neden olduğu difteri, bir solunum yolu ve deri hastalığıdır. Bu bakteri 0,1 mg/kg vücut ağırlığının altındaki dozlarda bile insanlar için ölümcül olan DT'yi salgılar (Pappenheimer Jr. 1977; Gill 1982). DT (62 kDa), A (22 kDa) ve B (40 kDa) olmak üzere iki fragmentten oluşur (Bennett ve ark. 1994). DT'nin toksik olan fragmenti FA, sitoplazmaya girerek ADP-ribozilasyonunu inhibe eder. Bu yolla translokaz olarak da bilinen uzama faktörü 2'nin (EF-2) inaktivasyonuna neden olur (Burch ve ark. 1968). Böylece ribozomal translokasyonu inhibe ederek ökaryotik hücreyi öldürür. FA'nın taşınmasında FB etkin rol oynar. FB'de bulunan R bölgesi ile hücre yüzey reseptörünün (HB-EGF) bağlanması sonucunda endositoz gerçekleşir (Morris ve ark. 1985). Bu sayede FA'nın sitoplazmaya girişi kolaylaşır (Bennett ve ark. 1994). FA translokasyon ile sitoplazmaya ulaştıktan sonra C bölgesi, ADP-ribozun NAD'den EF-2'nin post-translasyonel değiştirilmiş histidine (difamid) transferini katalize eder (Van Ness ve ark. 1980). Böylece protein sentezini durdurarak hücrenin ölümüne neden olur (Collier 1975).

Bu tez çalışmasında, kalıp molekül olarak DT'nin A fragmenti (FA) tercih edilmiştir. FA'nın baskılanmasıyla, fragmente olabilme özelliğine sahip olan DT'nin tamamının yakalanabilmesi amaçlanmıştır. DT'nin, daha önce yapılmış olan moleküler baskılama çalışmalarında kullanılan kalıp moleküllere kıyasla daha büyük molekül ağırlığına sahip olması göz önünde bulundurulduğunda bu yaklaşım öne çıkmaktadır. Büyük molekül ağırlığına sahip kalıp moleküllerin baskılanmasındaki olumsuzlukların giderilmesi ve plastik antikorların tıpta ve biyolojide daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi (tanı ve tedaviye yönelik olarak) yönünden sağlayacağı imkanlar düşünüldüğünde bu yaklaşımın önemi artmaktadır. MTT testleri ile gerçekleştirilen hücre canlılığı deneyleri ve immunfloresan boyama çalışmalarından elde edilen

sonuçlar neticesinde, bu yaklaşımla baskılanmış olan plastik antikorun, tüm toksini tanıma özelliği ortaya konmuştur. Son derece önemli olan bu sonuç, büyüklükleri nedeni ile teknik olarak baskılanmasında zorluk yaşanan büyük moleküllerin (enzimler, yapısal ve işlevsel proteinler, bakteri toksinleri vb.) fragmente edilerek baskılanmaları halinde, plastik antikor tarafından tanınabilmesinin mümkün olabileceğini ortaya koymuştur.

DT'nin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin ve nötralizasyon deneylerinde, plastik antikorun aktin filamentlerinin morfolojisindeki etkilerinin incelendiği immünfloresan boyama çalışmalarından elde edilen sonuçlar, yaptığımız çalışmanın önemini gösteren belirleyici bulgulardır. HUVEC ve 1.1B4 hücrelerine, 0,08-1,6 nM konsantrasyon aralığında DT verilerek, 24-72 saat aralığında gerçekleştirilen deneylerin sonunda, DT'nin hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu veriler literatürle uyum içindedir (Gill 1982). Özellikle nötralizasyon deneylerinden elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri, plastik antikorun etkinliğinin görsel olarak anlaşılması açısından önemlidir. Bu bulgular, plastik antikorun etkinliğini çok net şekilde ortaya koymaktadır.

Yaptığımız hücre canlılığı testlerinde, hücrelerin metabolik aktivitelerini belirlemek amacıyla kolorometrik bir analiz olan MTT testi kullanılmıştır. MTT testlerinin ve immünfloresan boyama çalışmalarının sonuçları incelendiğinde, plastik antikorun 1, 2 ve 5  $\mu\text{g/ml}$  değerlerinde hücredeki DT etkisini 24-72 saat aralığında nötralize ettiği gözlenmiştir. Bir bakteri toksini olan DT ile yapılmış olan bu alışma, DT'nin molekül ağırlığı göz önünde bulundurulduğunda, bakteri toksinleri ile yapılacak diğer çalışmalara da öncülük etmektedir.

Sağlık ekonomisi açısından bakıldığında plastik antikor, diğer yapay antikorlara kıyasla, bakteri toksinlerine karşı geliştirilen bir tedavi yaklaşımı olması nedeniyle toksinlerle savaşmakta önemlidir. Bu yaklaşımın benzer şekilde tanı testlerinde de kullanılabilmektedir.

2017 yılında süt ve süt tozundan pırralin tespit edilmesi için çekirdek-kabuk modeli kullanılarak, metal-organik yapıda moleküler baskılanmış polimerler geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada, histopatolojik çalışmalara göre ileri glikasyon son ürünlerinin, insan vücudunun farklı doku ve organlarında birikerek yaşlanmada ve diyabetik nefropati, Alzheimer hastalığı ve ateroskleroz gibi diğer kronik hastalıkların

gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Liu ve ark. 2017). Bu konu ile ilgili yapılmış olan diğer çalışmalar da incelendiğinde, diyabet hastalarının serumundaki ileri glikasyon son ürünlerinden olan pirralin konsantrasyonunun sağlıklı kişilerinkinden daha yüksek olduğunu görülmektedir (Chuyen 2006). Ayrıca immünolojik çalışmaların sonunda, pirralinin ateroskleroz hastalarının glomerüler bazal membranında birikerek böbrek yetmezliğine yol açtığı gözlenmiştir.

Gıda sektöründe kullanılan moleküler baskılama teknolojisi ile ilgili çalışmalar biyolojik sistemlerde gerçekleştirilen çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, kalıp moleküllere karşı geliştirilen baskılanmış polimerlerin immünolojik test sistemlerinde kullanılabilmesinin mümkün olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada FA'nın başarılı bir şekilde baskılanması ve bu sayede DT'nin yakalanabilmesinin mümkün olması, bu tür çalışmaların geliştirilmesinde etkili olacaktır.

Çalışmamızda hücre canlılığının anlaşılması yönünden büyük öneme sahip olan aktin, 1942 yılında Straub tarafından kas dokusunda keşfedilmiştir (Galler 2015). 150'den fazla proteinle etkileşime girerek, hücre hareketliliğinde önemli rol oynayan aktin, kompleks proteinlerin hücrede bulunmasına ve taşınmasına da yardımcı olur (Pollard ve Borisy 2003; Carlier ve Pantaloni 2007). Aktin, monomerik (G-aktin) ve polimerize (F-aktin) yapılar da bulunmaktadır (Oosawa ve Asakura 1975). Lifli bir yapıya sahip olan F-Aktin, kas dokuların tümünde bulunan ince filamentin ana bileşenidir. Aktin, bir iskelet proteini olup, ökaryotik hücrelerin çoğunda en bol bulunan proteindir. Sitotoksik olan DT'nin, protein sentezini engellemesi sonucu aktin filamentleri depolarize olur. DT'nin toksik olan fragmenti FA, hem G-aktin hem de F-aktin ile etkileşime girebilir (Bektaş ve ark. 2009). DT'nin ve FA'nın aktinle olan bu ilişkisini göz önünde bulundurarak gerçekleştirmiş olduğumuz immünfloresan boyama çalışmaları ile DT'nin hücreler üzerindeki toksik etkileri görüntülenmiştir. Benzer şekilde hücrelere DT'ye karşı geliştirilen plastik antikor ve DT birlikte verildiğinde, hücrelerin aktin filamentlerinin, yalnız DT verilen hücrelere göre daha iyi durumda olduğu görülmektedir.

Moleküler baskılama çalışmaları arasında epitop baskılama yaklaşımının kullanıldığı 2017 yılında yapılmış olan bir çalışmada sığır serum albümininin (BSA) belirlenmesi, elektrokimyasal ölçüm yöntemiyle birleştirilen epitop baskılanmış



teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kalıp molekül olarak BSA'dan ayrılan nonapeptid kullanılmıştır. Burada moleküler baskılanmış polimerin BSA yüzeyindeki epitopu tanıyarak BSA'yı yakalaması hedeflenmiştir (Li ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda bu yaklaşım yerine toksinin fragmentini baskılamayı tercih etmemizin nedeni ise tripsin ve DTT kullanılarak kısmi sindirimini gerçekleştirdiğimiz DT'nin A ve B fragmentlerinin aralarındaki bağın oldukça kuvvetli olmasıdır. Bu sayede FA'yı baskılamamız durumunda DT'yi de yakalamamız mümkün olmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular neticesinde nötralizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar dikkate alındığında DT'nin başarılı bir şekilde baskılandığını söylemek mümkündür. Plastik antikor ve DT'nin hücrelere birlikte verildiği nötralizasyon deneylerinde, plastik antikoron HUVEC hücrelerinin hücre canlılığını 24 saat sonunda 1 µg/ml değerinde % 25,04 oranında arttırdığı görülmektedir. Benzer şekilde 1.1B4 hücrelerine plastik antikor verilerek yapılan nötralizasyon deneylerinde 24 saat sonunda 1 µg/ml değerinde plastik antikoron hücre canlılığını % 51,08 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Baskılamada kullanılan plastik antikoron hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı, yapılan hücre canlılığı testleri ile ortaya konmuştur.

Elde edilen bulgular FA'ya karşı baskılanmış olan bu molekülün tedaviye yönelik olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir. Ancak bu sonuçların hayvan deneyleri ve pre-klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda bu bulgular, DT'ye karşı geliştirilen plastik antikoron immünolojik test sistemlerinde kullanılabilmesinin önemli bir göstergesidir.

## KAYNAKLAR

Ali, W.H., Derrien, D., Alix, F., Perollier, C., Lepine, O., Bayoudh, S. ve ark. (2010). Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6668–6673.

Bektaş, M., Günçer, B., Güven, C., Nurten, R. ve Bermek, E. (2004). Actin-an inhibitor of eukaryotic elongation factor activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 1061-1066.

Bektaş, M., Hacıosmanoğlu, E., Özerman, B., Varol, B., Nurten, R. ve Bermek, E. (2011). The effect of cytochalasin D and the involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2 in the release of diphtheria toxin fragment a into the cytosol. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43, 1365-1372.

Bektaş, M., Varol, B., Nurten, R. ve Bermek, E. (2009). Interaction of diphtheria toxin (fragment A) with actin. *Cell Biochemistry and Function*, 27, 430-439.

Bennett, M.J., Choe, S. ve Eisenberg, D. (1994). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Science*, 3, 1444–1463.

Berggren, C., Bayoudh, S., Sherrington, D. ve Ensing, K. (2000). Use of molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective clean-up of clenbuterol from calf urine. *Journal of Chromatography*. 889, 105–110.

Burch, G.E., Sun, S.C., Sohal, R.S., Chu, K.C. ve Colcolough, H.L. (1968). Diphtheritic myocarditis. A histochemical and electron microscopic study. *The American Journal of Cardiology*, 21, 261-268.

Carlier, M.F. ve Pantaloni, D. (2007). Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.*, 282, 23005–23009.

Chuyen, V.N. (2006). Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction on the relationship of 304 food-AGE and biological-AGEs. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50, 1140–1149.

Collier, R.J. (1975). Diphtheria Toxin: Mode of Action and Structure. *Bacteriological Reviews*. 39, 54-85.

Collier, R.J. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*, 39, 1793–1803.

Corman, M.E., Armutcu, C., Uzun, L., Say, R. ve Denizli, A. (2014). Self-oriented nanoparticles for site-selective immunoglobulin G recognition via epitope imprinting approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 831–837.

Galler, S. (2015). Forgotten research from 19th century: science should not follow fashion. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36, 5-9.

Gill, D.M. (1982). Bacterial toxin. A table of lethal amount. *Microbiological Reviews*, 46, 86–94.

Harford, J.B. (2003). Cell Culture. İçinde *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1.0.1–1.0.2.

Harford, J.B. (2004). Preparation and Isolation of Cells. İçinde *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2.0.1–2.0.2.

Hoshino, Y., Koide, H., Urakami, T., Kanazawa, H., Kodama, T., Oku, N. ve Shea, K.J. (2010). Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody. *Journal of the American Chemical Society*. 132, 6644-6645.

Jaffe, E.A. (1980). Culture of Human Endothelial Cells. *Transplantation Proceedings*. 12, 49–53.

Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. ve Todaro, G.J. (1969). Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology*. 4, 549-553.

Jenkins, A.L., Yin, R., Jensen, J.L. (2001). Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water. *Analyst*. 126, 798-802.

Justice B.A., Badr N.A. ve Felder R.A. (2009). 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today*, 14, 1-2.

Kryscio, D.R. ve Peppas, N.A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, 8, 461–473.

Li, M., Wang, X., Zhang, L., Wei, X. (2017). A high sensitive epitope imprinted electrochemical sensor for bovine serum albumin based on enzyme amplifying. *Analytical Biochemistry*. 530, 68-74.

Liu, H., Mu, L., Chen, X., Wang, J., Wang, S., and Sun, B. (2017). Core–Shell Metal–Organic Frameworks/Molecularly Imprinted Nanoparticles as Absorbents for the Detection of Pyrraline in Milk and Milk Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 986–992.

McCluskey, J.T., Hamid, M., Guo-Parke, H., McClenaghan, N.H., Gomis, R., ve Flatt, P.R. (2011). Development and Functional Characterization of Insulin-releasing Human Pancreatic Beta Cell Lines Produced by Electrofusion. *The Journal Of Biological Chemistry*, 286, 21982–21992.

Morris, R.E., Gerstein, A.S., Bonventre, P.F. ve Saelinger, C.B. (1985). Receptormediated Entry of Diphtheria Toxin Into Monkey Kidney (Vero) Cells: Electron Microscopic Evaluation. *Infect Immunology*. 150, 721-727.

Oosawa, F. ve Asakura, S. (1975). Thermodynamics of the Polymerization of Protein (Academic, 1975)

O’Shannessy, D.J., Anderson, L.I. ve Mosbach, K. (1989). Molecular recognition in synthetic polymers. Enantiomeric resolution of amide derivatives of amino acids on molecularly imprinted polymers. *Journal Of Molecular Recognition*. 2, 1-5.

Pappenheimer A.M. Jr., (1977). Diphtheria toxin. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 69–94.

Pastan, I., Chaudhary, V. ve Fitzgerald, D.J. (1992). Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents. *Annual Review of Biochemistry*. 61, 331-354.

Phelan, M.C. (1998). Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. İçinde *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1.1.1-1.1.9.

Pollard, T.D. ve Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453–465.

Rao, H., Zhao, X., Liu, X., Zhong, J., Zhang, Z., Zou, P., Jiang, Y., Wang, X. ve Wang, Y. (2017). A novel molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene quantum dots coated on hollow nickel nanospheres with high sensitivity and selectivity for the rapid determination of bisphenol S. *Biosens Bioelectron.* 100, 341-347.

Sandvig, K. ve Olsnes, S. (1988). Diphtheria Toxin-Induced Channels In Vero Cells Selective For Monovalent Cations. *Journal of Biological Chemistry.* 263, 12352-12359.

Say, R., Gültekin, A., Ozcan, A.A., Denizli, A. ve Ersöz, A. (2009). Preparation of new molecularly imprinted quartz crystal microbalance hybride sensor system for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine determination. *Analytica Chimica Acta,* 640, 82–86.

Todaro, G.J. ve Green, H. (1963). Quantitative Studies of The Growth of Mouse Embryo Cells In Culture And Their Development Into Established Lines. *The Journal of Cell Biology,* 17, 299-313.

Unlu, A. (2011). *Aktin Ve Aktin Bağlayan Proteinlerin Etkileşimlerinin Homoloji Modellemesi Yöntemi İle İncelenmesi.* İstanbul: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Doktora Tezi.

Van Ness, B.G., Howard, J.B. ve Bodley, J.W. (1980). ADP-Ribosylation of Elongation Factor 2 by Diphtheria Toxin. *Journal of Biological Chemistry.* 255, 10710-10716.

Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., and Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences.* 12, 5908–5945.

Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R. ve Mosbach, K. (1993). Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature.* 361, 645-647.

Wizeman, W.J. ve Kofinas, P. (2001). Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding. *Biomaterials.* 22, 1485-1491.

## DİFTERİ TOKSİNİNE KARŞI MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLEN PLASTİK ANTİKORUN IN VITRO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

### ORIJINALLIK RAPORU

<b>%7</b>	<b>%5</b>	<b>%5</b>	<b>%5</b>
BENZERLIK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	<b>%1</b>
<b>2</b>	<b>Guo, H.. "MCM-41 mesoporous material modified carbon paste electrode for the determination of cardiac troponin I by anodic stripping voltammetry", Talanta, 20051115</b> Yayın	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>M. I. Walsh. "Second-Derivative Synchronous Fluorescence Spectroscopy for the Simultaneous Determination of Fluphenazine Hydrochloride and Nortriptyline Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations", Journal of Fluorescence, 05/06/2009</b> Yayın	<b>%1</b>
<b>4</b>	<b>Fratelli, F.. "An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin", Toxicon, 201106</b> Yayın	<b>%1</b>