



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL'DAKİ AK DUT (*Morus alba* L.) VE MAVİ  
ATLAS SEDİRİ [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca']  
POLENLERİNİN ALERJENİK PROTEİNLERİ

Demirhan ÇETEREİSİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman

Doç. Dr. Ash GELİNCİK

Haziran, 2014

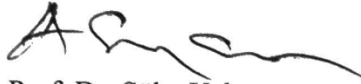
İSTANBUL

Bu çalışma 06.06.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**



Prof. Dr. Nazlı Arda (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



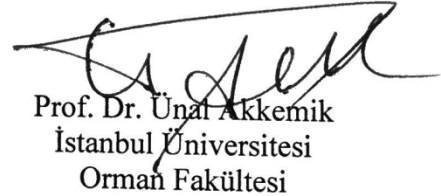
Prof. Dr. Süha Yalçın  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Suna Büyüköztürk  
İstanbul Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ayşegül Topal Sarıkaya  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Ünal Akkemik  
İstanbul Üniversitesi  
Orman Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 30217 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Lisans eğitimime başlarken kurmuş olduğum hayallere beni bir adım daha yaklaştıran, akademik kariyerimin ilk adımlarından biri olan bu yüksek lisans tezi aynı zamanda ileriye yönelik hedeflerimin şekillenmesinde ve büyümesinde benim için çok önemli bir yer teşkil etmektedir.

Bu süreçte bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışmalarımnda her türlü destek ve imkanı sağlayan, bana olan güveni ile tezimin her aşamasında beni cesaretlendirip güç veren sevgili Danışmanım Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasına kaynak oluşturan proje ve önerilerini benimle paylaşan ve klinik araştırmaları gerçekleştirerek sonuçların yorumlanmasına anlamlı katkılarda bulunan Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK, II. Danışmanım Doç. Dr. Aslı GELİNCİK ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'nın değerli çalışanlarına, polen örneklerini temin eden İ.Ü. Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. Ünal AKKEMİK ve Yard. Doç. Dr. Nurgül KARLIOĞLU'na, Grenoble (Fransa) Promethee Laboratuvarında çalışma imkanı sunarak tezime yeni bir boyut kazandıran Prof. Dr. Michel SEVE'e, Fransa Hükümeti'nin bursu ile BioHealth Computing Erasmus Mundus Yüksek Lisans programında öğrenim görme imkanı tanıyan Prof. Dr. Philippe SABATIER'ye derin şükranlarımı arz ederim. Son olarak yüksek lisansım sürecince bana her konuda yardımcı olan ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR, Araş. Gör. Dr. Murat PEKMEZ ve Biyolog Levent DALYAN'a çok teşekkür ederim.

Hayatımı şekillendirirken verdiğim her kararda yanımda olan, bana duydukları güven ve sunmuş oldukları sevgi ile hayatıma huzur katan Anne ve Babama, ayrıca tüm dostlarıma çok teşekkür ederim.

Haziran, 2014

Demirhan ÇETEREİSİ

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ .....	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>5</b>
2.1. ALERJİ.....	5
2.1.1. Alerji Mekanizması.....	6
2.1.2. Alerji Hastalarında Klinik Bulgular .....	9
2.1.3. Klinik ve Laboratuvar Destekli Alerji Tanısı.....	10
2.2. ALERJENLER .....	13
2.2.1. Polen Alerjenleri .....	17
2.2.1.1. Ak Dut ( <i>Morus alba L.</i> ) Polen Alerjenitesi.....	19
2.2.1.2. Mavi Atlas Sediri [ <i>Cedrus atlantica (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'</i> ] Polen Alerjenitesi .....	20
2.2.2. Çevresel Faktörlerin Alerji Hastalığı Üzerine Etkisi .....	21
2.3. ALERJENİK PROTEİNLERİN TANIMLANMASINDA İZLENEN GENEL STRATEJİ .....	22
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
3.1. POLEN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	25
3.2. POLEN EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	25
3.3. PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ .....	26
3.4. KLİNİK ANALİZLER.....	26
3.4.1. Hasta Serumlarının Toplanması.....	26
3.4.2. Deri Prik Testi .....	27
3.4.3. Nazal Provokasyon Testi.....	27

3.5.	ELEKTROFORETİK ANALİZLER.....	28
3.5.1.	Bir Boyutlu (1D-) Denatüre Jel Elektforezi.....	28
3.5.2.	İki Boyutlu (2D-) Jel Elektforezi .....	29
3.6.	BOYAMA İŞLEMLERİ .....	31
3.6.1.	Coomassie Boyama.....	31
3.6.2.	Gümüş Boyama.....	31
3.7.	ELEKTROTRANSFER VE WESTERN BLOTLAMA.....	32
3.8.	KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLER.....	34
3.8.1.	Proteinlerin Tripsinle Kesimi.....	34
3.8.1.1.	<i>Coomassie Boyama Yöntemi ile Boyanmış 1D-Jelindeki Proteinlerin Tripsinle Kesimi.....</i>	34
3.8.1.2.	<i>Gümüş Boyama Yöntemi ile Boyanmış 2D-Jelindeki Proteinlerin Tripsinle Kesimi.....</i>	35
3.8.2.	MALDI-TOF/TOF MS Analizi ve Proteinlerin Tanımlanması.....	35
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>37</b>
4.1.	POLEN EKSTRELERİ VE PROTEİN KONSANTRASYONU.....	37
4.2.	KLİNİK TESTLER .....	38
4.3.	POLEN PROTEİNLERİNİN BİR BOYUTLU (1D-) JEL ELEKTROFOREZİ .....	40
4.4.	POLEN PROTEİNLERİNİN BİR BOYUTLU JELDEN MEMBRANA AKTARIMI VE WESTERN BLOT ANALİZİ.....	42
4.5.	AK DUT POLEN PROTEİNLERİNİN İKİ BOYUTLU (2D-) JEL ELEKTROFOREZİ .....	45
4.6.	POLEN PROTEİNLERİNİN İKİ BOYUTLU (2D-) JELDEN MEMBRANA AKTARIMI VE WESTERN BLOT ANALİZİ.....	46
4.7.	KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLER.....	47
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
	<b>EKLER.....</b>	<b>65</b>
	EK 1. Etik kurul onay belgesi. ....	65
	EK 2. Bant 1'in protein tanımlama sonucu. ....	66
	EK3. Bant 2'nin protein tanımlama sonucu. ....	66
	EK 4. Bant 3'ün protein tanımlama sonucu. ....	67
	EK 5. Bant 4'ün protein tanımlama sonucu. ....	67
	EK 6. Bant 5'in protein tanımlama sonucu. ....	67
	EK 7. Spot 1'in protein tanımlama sonucu. ....	68

EK 8. Spot 2'nin protein tanımlama sonucu. ....	68
EK 9. Spot 5'in protein tanımlama sonucu. ....	69
EK 10. Spot 6'nın protein tanımlama sonucu. ....	69
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>70</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

- Şekil 2.1:** Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonunun erken fazında gerçekleşen olaylar (Abbas ve Lichtman, 2007).....6
- Şekil 2.2:** İmmunoglobulin E (IgE)'nin yapısı. I. Molekülün kapalı şekli, II. Molekülün açık şekli (Sabban, 2011). .....7
- Şekil 2.3:** Tip I alerji reaksiyonunda inflamatuvar salınımı (Broide, 2001).....8
- Şekil 2.4:** a) Deri prik testi'nin kol üzerine uygulanışı ( [http://www. Allergymedical group . com.au/about/skin-prik-testing/](http://www.Allergymedicalgroup.com.au/about/skin-prik-testing/), Ziyaret tarihi: 19 Kasım 2013) b) Yama testinin sırtta uygulanışı (<http://www.slu.edu/dermatology-home/general-dermatology/patch-testing-and-contact-dermatitis>, Ziyaret tarihi: 19 Kasım 2013)..... 11
- Şekil 2.5:** Nazal provakasyon testi. a) Hastaya farklı dilüsyonlarda hazırlanan alerjen ekstresinin uygulanması b) Ekstre uygulanışından sonra hava akımına karşı oluşan direncin cihaz aracılığı ile ölçülmesi. ....12
- Şekil 2.6:** a) Polen tanesinin ana kısımları ([http:// www. Yourarticlelibrary .com/ biology/ stamen -male-reproductive- organ- in-flowering plants/11816/](http://www.Yourarticlelibrary.com/biology/stamen-male-reproductive-organ-in-flowering-plants/11816/), Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014) b) Farklı bitkilere ait polen taneleri [I: Ribwort Plantain (*Plantago lanceolata*), II: Dandelion (*Taraxacum sp.*), III: Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*); Scanning electron microscopy (colorized)]([http://www. Vcbio .science. ru. nl/ en/ virtuallessons/pollenmorphology/](http://www.Vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/pollenmorphology/), Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014) .....17
- Şekil 2.7:** a) Ak dut ağacının çiçek ve yeni oluşan yaprakları ([http:// davesgarden. Com /guides/pf/showimage/296650/#b](http://davesgarden.Com/guides/pf/showimage/296650/#b), Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2013) b) Ak dut poleni (Olympus CX31, 100X).....20
- Şekil 2.8:** a) Mavi atlas sediri ağacının çiçek ve yaprakları ([http:// treesofsantacruzcounty .blogspot.com/2011/05/cedrus-atlantica-glauca-blue-atlas.html](http://treesofsantacruzcounty.blogspot.com/2011/05/cedrus-atlantica-glauca-blue-atlas.html), Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2013) b) Mavi atlas sediri poleni (Olympus CX31, 100X) .....21
- Şekil 3.1:** Western blotlama yönteminin aşamaları (<http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>, Ziyaret tarihi: 6 Mayıs 2014).....33
- Şekil 4.1:** Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan standart grafik ( $R^2= 0.9957$ ). Sığır serum albümin (BSA) standartlarının (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL)  $A_{562}$  değerleri kullanılarak çizilmiştir .....37
- Şekil 4.2:** Ak dut polen proteinlerine ait bant profillerinin gözlendiği örnek jeller a) Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü b) Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü (M: Marker; 1: Boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Bantların Gel Analyzer programı kullanılarak kırmızı alan içerisinde, üzerlerinde beyaz noktalarla gösterimi).....40



- Şekil 4.3:** Mavi atlas sediri polen proteinlerinin bant profilleri a) Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü b) Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü (M: Marker; 1: Boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Bantların Gel Analyzer programı kullanılarak kırmızı alan içerisinde, üzerlerinde beyaz noktalarla gösterimi).....41
- Şekil 4.4:** 1D-Jelde ayrılmış ve PVDF membrana aktarılmış ak dut polen proteinlerinin hasta serumlarıyla Western blotlama sonuçları. Hasta serumlarındaki IgE'yi bağlayan ak dut proteinleri HRP-konjuge anti-IgE antikoruna ile dolaylı olarak işaretlenerek (koyu bantlar) gösterildi ( M: marker; K: kontrol birey). .....42
- Şekil 4.5:** 1D-Jelde ayrılmış ve PVDF membrana aktarılmış mavi atlas sediri polen proteinlerinin Western blot sonuçları. Hasta serumlarındaki IgE'yi bağlayan mavi atlas sediri proteinleri (koyu bantlar) HRP-konjuge anti-human IgE antikoruna ile dolaylı olarak işaretlenerek gösterildi (M: marker; K1, K2: kontrol bireyleri)(K3-5 bireylerinde de benzer bir profil gözlemlendiğinden bu bireyler şekil içerisinde yer almamaktadır). .....44
- Şekil 4.6:** a) Coomassie boyama yöntemine göre boyanan 2-D jel b) Gümüş boyama yöntemine göre boyanan 2-D jel (M: marker). .....46
- Şekil 4.7:** MALDI-TOF/TOF MS analizi yapılan protein bantları ve spotlarının Western blot görüntüsü. a) Bant kesimi için referans alınan ve bant numaralandırılması yapılan 1D-Western blotlama membranı b) Spot kesimi için referans alınan ve spot numaralandırılması yapılan 2D-Western blotlama membranı (Bantlar ve spotlar oklarla belirtildi). .....48

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> Tip I alerjik reaksiyonların klinik bulguları (Abbas ve Lichtman, 2007; Adkinson ve diğ., 2014). .....	10
<b>Tablo 2.2:</b> Polenlerde bulunan başlıca alerjenik proteinler.....	18
<b>Tablo 3.1:</b> 1D-Jel elektroforezi için jel hazırlama.....	29
<b>Tablo 3.2:</b> İzoelektrik odaklama programı (50 $\mu$ A/şerit, 20°C).....	31
<b>Tablo 4.1:</b> Ak dut ve mavi atlas sediri polen ekstraktları uygulanmış alerjik rinit hastalarının SPT ve NPT sonuçları (K: kontrol olarak çalışmaya dahil olan sağlıklı bireyler; H: hiperreaktif). .....	39
<b>Tablo 4.2:</b> Ak dut polenindeki olası alerjenik proteinler. ....	49

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
<b>1D-SDS-PAGE</b>	: Bir boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (“1- Dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)
<b>2D-GE</b>	: İki boyutlu jel elektroforezi (“2-Dimensional gel electrophoresis”)
<b>APC</b>	: Antijen sunan hücreler (“Antigen presenting cells”)
<b>BSA</b>	: Sığır serum albumin (“Bovine serum albumin”)
<b>CHCA</b>	:Alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit (“ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid”)
<b>CID</b>	: Çarpışma hücresi (“Collision induced dissociation”)
<b>CO</b>	: Karbonmonoksit
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>DEP</b>	: Dizel egzoz partikülleri
<b>DTT</b>	: Ditiotreitol (“Dithiothreitol”)
<b>HRP</b>	: Yabancu peroksidazı (“Horseradish peroxidase”)
<b>IAA</b>	: İyodoasetamid
<b>IEF</b>	: İzoelektronik odaklama (“Isoelectric focusing”)
<b>IgM</b>	: İmmünglobulin M
<b>IgA</b>	: İmmünglobulin A
<b>IgE</b>	: İmmünglobulin E
<b>IgG</b>	: İmmünglobulin G
<b>IL4</b>	: İnterlökin 4
<b>IL5</b>	: İnterlökin 5
<b>MALDI-TOF/TOF MS</b>	: Matriks destekli lazer dezorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi/uçuş süresi kütle spektrometrisi (“Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry”)
<b>MHC</b>	: Majör histokompatibilite kompleksi (“Major histocompatibility complex”)
<b>MS</b>	: Kütle spektrometrisi
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	: Amonyum bikarbonat
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Azot dioksit
<b>O<sub>3</sub></b>	: Ozon
<b>PBS</b>	: Tuzlu fosfat tamponu (“Phosphate buffered saline”)
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden diflorür
<b>TFA</b>	: Trifloroasetik asit
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### İSTANBUL'DAKİ AK DUT (*Morus alba* L.) VE MAVİ ATLAS SEDİRİ [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] POLENLERİNİN ALERJENİK PROTEİNLERİ

Demirhan ÇETEREİSİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman : Doç. Dr. Aslı GELİNCİK

Solunumla alınan polen tanecikleri alerjik hastalıkların en sık rastlanan nedenlerinden biridir. Polenlerin yapıları, havadaki miktarları ve duyarlılaştırma kapasiteleri coğrafi bölgeye, iklime ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Bu nedenle hastanın yaşadığı bölgedeki polenlerin kimyasal bileşenlerinin ve alerjenik özelliklerinin bilinmesi, tanı ve tedavi bakımından önem taşımaktadır.

Bu tez projesinde İstanbul'da yaygın olarak bulunan ak dut (*Morus alba* L.) ve mavi atlas sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] polenlerinin alerjenik proteinleri araştırıldı.

Polen örnekleri disseminasyon dönemlerinde toplandı ve polen proteinleri ekstre edildi. Bu ekstreler daha önceden çeşitli ağaç polenlerine alerjik olduğu saptanmış hastalara (deney grubu) ve sağlıklı bireylere (kontrol grubu) deri prik ve nazal provokasyon testleri ile uygulandı. Hastalar semptom skorlarına ve anterior rinomanometri ile ölçülen hava akım oranlarına göre değerlendirildi.

Polen proteinleri bir boyutlu (1D-) sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırıldı ve farklı boyama yöntemleri ile görünür hale getirildi. 1D-jellerde ayrıştırılan proteinler elektrotroblotlama tekniği ile poliviniliden diflorür (PVDF) membranlara aktarıldı. Her bir membran önce bir hasta serumu ile, ardından da yabanturpu peroksidazı (HRP)-bağlı fare anti-insan IgE antikoru ile muamele edildi. Western blotlama ile belirlenen IgE-bağlayan proteinler klinik bulgularla birlikte değerlendirildi.

50-100 kDa arasındaki polipeptidlerin ak dut polen ekstresi uygulanmış tüm hastaların serumlarındaki spesifik IgE'ler ile,  $\leq 30$  kDa'luk polipeptidlerin ise bazı hastaların IgE'leri ile reaksiyon verdiği gözlemlendi. Ayrıntılı blot analizleri bazı hastalarda spesifik IgE'lerin 15 kDa'luk polen proteinlerine de bağlandığını gösterdi. Potansiyel alerjenik protein(ler)in 75-80 kDa ve/veya  $\sim 15$  kDa olabileceği sonucuna varıldı.

Mavi atlas sediri polipeptidlerinin Western blotlama sonuçları; genel olarak 30-130 kDa arasındaki polen polipeptidlerinin mavi atlas sediri polen ekstresi uygulanmış tüm hastaların serumlarındaki spesifik IgE'leri bağladığı gözlemlendi. Ancak 40-130 kDa arasındaki protein bantlarının çoğu, kontrol bireylerinin IgE'leri ile de reaksiyon verdiğinden, potansiyel alerjenik protein(ler)in  $\leq 30$  kDa molekül ağırlığında olabileceği öngörüldü.

Son olarak ak dut polen ekstresi 2-boyutlu (2D-) elektroforez ile ayrıştırıldı, membrana aktarıldı ve IgE bağlayan proteinleri belirlemek için hasta serumlarıyla işleme sokuldu. Western blotlama sonuçları referans alınarak 1D-jelden 5 bant (82, 79, 68, 56 ve 15 kDa) ve 2D-jelden 7 spot (78 kDa civarında 3; 51 kDa civarında 3 ve 36 kDa civarında 1 spot) kesildi ve MALDI-TOF/TOF MS (Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi/uçuş süresi kütle spektrometrisi) yöntemiyle analiz edildi. Daha sonra veriler Mascot ve Swisprot veritabanında biyoinformatik olarak değerlendirildi.

Ak dut'a ait protein veri bankası bulunmadığından, analiz edilen proteinler ile olası proteinler arasında düşük bir benzerlik gözlemlendi. Biyoinformatik analizler sonucunda sadece 82 kDa'luk bant 1 için teorik molekül ağırlığı 82054 Da olan 5-metiltetrahidropterioltriglutamat-homosistein metiltransferaz verisine ulaşıldı. Dolayısıyla bu proteinin ak dut polenindeki potansiyel alerjenlerden biri olabileceği öngörüldü.

Haziran 2014, 86 Sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *Morus alba*, *Cedrus atlantica*, alerji, polen alerjisi, alerjik protein

## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **ALLERGENIC PROTEINS OF WHITE MULBERRY (*Morus alba* L.) AND BLUE ATLAS CEDAR [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] POLLENS IN ISTANBUL**

**Demirhan ÇETEREİSİ**

**Istanbul University**

**Graduate School of Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. Nazlı ARDA**

**Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aslı GELİNCİK**

Inhalant pollen grains are one of the most common causes of allergic diseases. Structures, quantity in the air and sensitization capacity of pollens vary depending on the geographical region, climate and temperature. Therefore, knowing chemical constituents and allergenic features of the pollens within the region where the patient lives is important in respect to diagnosis and treatment.

In this thesis project, allergenic proteins from white mulberry (*Morus alba* L.) and blue atlas cedar [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] pollens, which widely distributed in Istanbul were investigated.

Pollen samples were collected during their dissemination period and pollen proteins were extracted. These extracts were subjected to patients who are diagnosed as allergic to pollens of various trees (experimental group) and healthy individuals (control group) by skin prick and nasal provocation tests. Patients were evaluated according to their symptom scores and nasal flow rates measured by anterior rhinomanometry.

Pollen proteins were separated by one dimensional (1D-) sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized with different staining methods. Proteins resolved on 1D-gels were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes by electroblotting technique. Each membrane was incubated first with a patient's serum then with horseradishperoxidase (HRP)-conjugated mouse anti-human IgE antibody. IgE-binding proteins detected by Western blotting were evaluated along with clinical symptoms.

Polypeptides between 50-100 kDa were observed to react with specific IgEs of all patients sera subjected with white mulberry pollen extract, whereas polypeptides of  $\leq 30$  kDa reacted with only IgEs of some patients. Detailed blot analyses revealed that specific IgEs of some patients also bound to pollen protein(s) with 15 kDa. It was concluded that potential allergenic proteins might be 75-80 kDa and/or 15 kDa.

Western blotting results of blue atlas cedar polypeptides indicated that generally pollen polypeptides with 30-130 kDa bound to specific IgEs in sera of all patients subjected with blue atlas cedar pollen extract. However, as most of the protein bands between 40-130 kDa were reacted with IgEs of control individuals, it was predicted that potential allergenic protein(s) might be  $\leq 30$  kDa.

Finally, white mulberry pollen extract was separated by 2-dimensional (2D-) gel electrophoresis, transferred to the membrane and incubated with patient's sera for detection of IgE-binding proteins. Five bands (82, 79, 68, 56 and 15 kDa) from 1D-gel and 7 spots (3 spots as 78 kDa, 3 spots as 51 kDa and 1 spot as 36 kDa) were picked based on Western blotting results, and analysed by MALDI-TOF/TOF MS ("Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry") technique. Afterwards, data were evaluated with bioinformatic tools by using Mascot and Swisprot database.

As the lack of protein databank for white mulberry, a low similarity was observed between the analyzed proteins and probable proteins. As a result of bioinformatic analyses, only "5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase" with 82054 Da theoretical molecular weight data was detected for band 1 of 82 kDa. Thus this protein was predicted as one of the potential allergenic proteins in white mulberry pollen.

June 2014, 86 Pages.

**Keywords:** *Morus alba*, *Cedrus atlantica*, allergy, pollen allergy, allergic protein

## 1. GİRİŞ

Polen tanecikleri, küf ve mantarların sporları, bazı bakteriler, ev tozu akarları, evcil hayvanların tüy ve derileri (epidermisleri), bazı yiyecekler ve bazı böcek ağları gibi solunum sistemi ile vücuda giren (inhalan) alerjenler; Tip I alerji sınıfına dahil üç ana alerjik hastalık olan alerjik rinit, astım ve atopik dermatit hastalıklarının tetikleyici etkenleridir (Puc, 2003; Reid ve Gamble, 2009).

Dünya popülasyonunun % 25'inden fazlasını etkileyen tip I alerjik reaksiyonlar, duyarlı kişilerde vücut tarafından yabancı maddelere (antijenler) karşı İmmünoglobulin E (IgE) üretimi ile başlar (González-Buitrago ve diğ., 2007). Avrupa popülasyonunun % 15'i mevsimsel alerjik rinit, çocuk popülasyonunun % 15-20'si atopik dermatit ve dünya genelinde 300 milyon kişi astım hastasıdır (Behrent ve Becker, 2001; Masoli ve diğ., 2004; O'Connel, 2004). Genel olarak, polen alerjenleri bir yandan IgE üretimini tetikleyip bir yandan da IgE'lerin mast ve bazofil hücrelerine bağlanmasıyla, histamin, triptaz, lipidler (lökotrien C4, prostaglandin D2) ve sitokinler gibi inflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasına neden olur. Bu mediyatörler ise burun kaşınması, yanma hissi ve göz nezlesi gibi klinik belirtilere yol açar (Broide, 2001; Puc, 2003).

Alerjik kişilerdeki klinik belirtilerin düzeyi ve dönemi havadaki alerjenlerin üretim dönemine ve yayılışına göre yıldan yıla farklılık gösterir. İnhalan alerjenlerin üretim dönemi ve yayılışı iklim ve hava koşulları ile yakından ilişkilidir (D'Amato ve diğ., 2007).

Her bitkinin polen saçma (disseminasyon) zamanı farklıdır. Ayrıca polen taneciklerindeki antijen üretimini artıran hava kirliliği farklı alerjik reaksiyonların oluşmasına yol açan önemli bir faktördür (Reid ve Gamble, 2009). Yapılan bazı çalışmalarda kentsel ve kırsal alanlarda yaşayan kişilerin polen alerjisine karşı farklı yanıt verdikleri ve kentte yaşayan kişilerde polen alerjisinin daha sık görüldüğü belirlenmiştir (D'Amato ve diğ., 2007).



Hava kirliliğine neden olan formaldehit, ozon, sülfür dioksit ve azot oksit gibi gazlar solunum sistemindeki mukus membranına etki edip mukus akışkanlığını değiştirerek alerjik kişilerde inflamasyona yol açmaktadır. Buna ek olarak, bu gazlar polen taneciklerinin solunum sistemine taşınmasında da etkili olabilmektedir (Puc, 2003; Platts-Mills ve Woodfolk, 2011). Solunan partikül sayısı ve boyutu, partikül üzerindeki yabancı madde karışımı ve maruz kalınan alerjen miktarı popülasyon içerisinde seçici bir şekilde IgE üretimine sebep olmaktadır (Platts-Mills ve Woodfolk, 2011). Alerjenler ve astım üzerine yapılmış çalışmalar, alerjenlere maruz kalma (1 ng-1 µg/gün) süresinin uzaması veya tekrarlanması ile duyarlı kişilerde astım riskinin arttığını ve diğer alerjik hastalıkların da gelişebildiğini ortaya koymuştur (Baxi ve Phipatanakul, 2010).

Alerjik reaksiyonlardan sorumlu en önemli molekül grubu proteinlerdir. Alerjen proteinler proteazlar, ligand bağlayan proteinler, yapısal proteinler, patojenez-ilişkili proteinler, lipid transfer proteinleri, profilinler ve kalsiyum bağlayan proteinler gibi biyolojik fonksiyonları ve yapıları farklı çeşitli sınıflara ayrılırlar. Polen alerjenleri ise Bet V homolog (patojenez-ilişkili 10 [PR-10]) proteinler, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler ve ekspanzinler olmak üzere dört ana grupta incelenir (Ferreira ve diğ., 2004; Chapman ve diğ., 2007). Günümüze kadar yapılmış proteomik çalışmalar polen alerjenlerinin genel olarak molekül ağırlığı 10-70 kDa arasında suda çözünebilir proteinler veya glikoproteinler olduklarını, bazılarının yüksek pH'a ve sıcaklığa dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur (Puc, 2003). Literatürde belirtilen ve günümüze kadar tanımlanmış olan polen alerjenleri arasında en fazla alerjen özelliğe sahip olanlar huş ağacından (*Betula verrucosa*) Bet V 1 proteini (Erler ve diğ., 2011), zeytin ağacından (*Olea europaea*) Ole e 1 proteini (Esteve ve diğ., 2012) ve servi ağacından (*Cupressus sempervirens*) Cup s 1 ve Cup s 3 proteinleri (Shahali ve diğ., 2012a)'dir. Tanımlanmış olan tüm alerjen polen proteinleri, farklı protein ailelerinden olmalarına rağmen bazı ortak özellikler taşımaktadırlar (Sastre, 2010).

Proteomik teknikler, karmaşık alerjen kaynaklarının veya ilgilenilen proteinlerin hızlı ve etkili bir şekilde tanımlanmasında avantaj sağlamaktadır. Örneğin, proteinlerin 2-boyutlu jel elektroforezi ile izoelektrik noktalarına ve molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılması, farklı alerjen izoformlarının ayrılması ve çalışılacak proteinlerin tek tek jelden kesilerek kütle spektrometrisi ile tanımlanması mümkündür (D'Amato ve diğ.,

2010; Rabilloud ve Lelong., 2011). Alerji çalışmalarında, 2D-elektroforez tekniğinin immüno-blotlama yöntemi ile kombine şekilde uygulanması (İmmünoproteomik) ile de IgE bağlayan proteinlerin tek tek saptanarak alerjenitenin klinik testlerle doğrulanması ve son aşama olan kütle spektrometrisi (MS) tekniği ile etkili bir şekilde tanımlanması mümkün olmaktadır (Nakamura ve Teshima, 2013).

Dutgiller (Moreceae) ailesinden ak dut ağacı ve çamgiller (Pinaceae) ailesinden mavi atlas sediri İstanbul'daki halka açık park ve bahçelerde yaygın olarak bulunur. Ak dut polenlerinin özellikle polen yayma döneminde (Nisan-Mayıs) astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi alerjik hastalıkları tetiklediği bilinmektedir (Singh ve diğ., 1987; Sneller ve diğ., 1993; Navarro ve diğ., 1997). Himalaya sediri (*Cedrus deodara*) polenlerinin alerjenitesi araştırılmış olmasına rağmen mavi atlas sedirinin alerjenitesi veya alerjik proteinlerinin tanımlanmasına dair herhangi bir çalışma yoktur (Rawat ve diğ., 2000).

Bu çalışmanın amacı; günümüze kadar polen alerjisi üzerine tamamlanan proteomik çalışmaların ışığında, ak dut (*Morus alba* L.) ve mavi atlas sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] polenlerinin alerjenitesini araştırmak ve alerjik proteinlerini tanımlamaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında polen disseminasyon döneminde İ.Ü. Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki uzman araştırmacılar tarafından toplanan ak dut ve mavi atlas sediri polenlerinden protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstreler İ.Ü. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'ndaki uzman hekimler tarafından dönemsel alerjik rinit hastalarına ve sağlıklı bireylere deri prik ve nazal provakasyon testleri ile uygulanarak bireylerin bu polen ekstrelerine karşı alerjik olup olmadığı klinik olarak belirlenmiştir. Alerjenitesi belirlenen ekstrelerdeki proteinler 1- ve 2-boyutlu jel elektroforezi ile ayrıştırılarak, hasta serumları ile muamele edilmek üzere 'Western Blotlama' tekniği ile membran üzerine aktarılmıştır. Membran üzerinde saptanan IgE bağlayan proteinler, jel üzerinde ayrıştırılmış proteinler ile karşılaştırılarak alerjen özelliğine sahip olanlar jelden kesilip MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ("Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry", Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi/uçuş süresi kütle spektrometresi) ile analiz

edilmiştir. Kütle spektrometresi ile dizisi belirlenen proteinler biyoinformatik analizlerle değerlendirilmiş ve literatürde daha önceden tanımlanmış olan polen alerjenleri ile benzerlikleri araştırılmıştır.

Ak dut ve mavi atlas sediri polenlerinin alerjenitesi hakkında literatürde geniş bir bilgi yoktur. Dolayısıyla günümüze dek bu ağaç polenlerinden herhangi bir alerjen protein de tanımlanmamıştır. Bu çalışma ile alerjenitesi belirlenen ak dut ve mavi atlas sediri polenlerinin IgE bağlayan proteinleri saptanmış, daha önceden tanımlanmış alerjenlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve potansiyel alerjenik proteinler ortaya konulmuştur. Böylece yeni alerjenlerin tanımlanması ve alerji panellerinin genişletilmesi için yürütülecek çalışmalara bir temel oluşturulmuş, alerjik hastalıkların tanı ve tedavisine yeni bir bakış açısı getirilmeye çalışılmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. ALERJİ

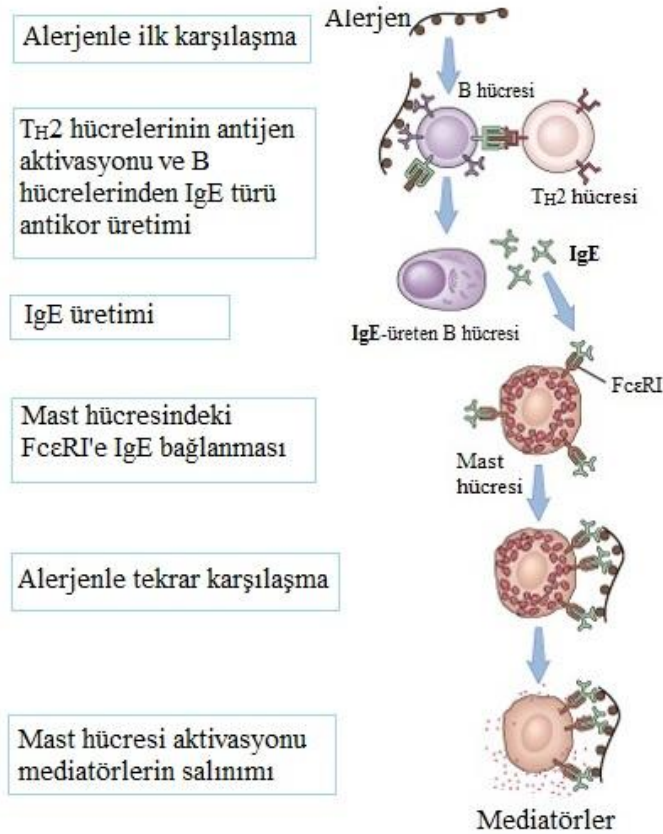
Alerji, aynı miktardaki yabancı maddelere (antijenler) maruz kalan bireylerden bazılarının vücudunda oluşan aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak tanımlanır. Bu aşırı duyarlılık reaksiyonu doğal immün savunma mekanizmasının bozulması sonucu meydana gelir. İmmün yanıtın yol açtığı bu bozukluklara aşırı duyarlılık hastalıkları da denir. Aşırı duyarlılık reaksiyonları, üretilen antikor ve etki mekanizmasına göre dört farklı gruba ayrılmaktadır. Bunlar Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV alerjik reaksiyonlardır (Gell and Coombs, 1968; Abbas ve Lichtman, 2007).

Tip I alerjik reaksiyon genellikle saman nezlesinde gözlenir ve alerjenler vücutta IgE üretimini tetikler. Üretilen IgE, mast ve bazofil hücre yüzeyine bağlanır ve alerjenlerle tekrar karşılaştığında inflamatuvar mediyatörlerin salgılanması ile alerjik reaksiyonlar gerçekleşir (alerjik reaksiyonun erken fazı) (Şekil 2.1) (Abbas ve Lichtman, 2007). Alerjene maruz kalma süresinin uzaması ile geç faz Tip I alerjik reaksiyon meydana gelir ve kronik inflamasyon oluşur. Reaksiyonun bu aşamasında inflamatuvar mediyatörlerin üretimi sadece alerjenler tarafından değil, belirsiz uyaranlar (zirai ilaçlar, formaldehit, fenol vs.) ve fiziksel faktörler (efor, sıcaklık, basınç vs.) tarafından da tetiklenir. Tip I alerjik reaksiyon sonucu gözlenen bulgular arasında, burun kaşıntısı, aksırma, burun içinde yanma hissi, mukus salgısı ve göz nezlesi sayılabilir. Ayrıca, Tip I alerjik reaksiyon anaflaktik şok, ürtiker, IgE-bağımlı şişkinlik ve bazı bronş astımlarına da yol açabilir (Knox ve Suphioglu, 1996; Puc, 2003).

Tip II alerjik reaksiyon, IgG ve IgM sınıfı antikorların varlığında gerçekleşir. Bu antikorlar hücre (kan ve kemik iliği hücreleri) membranı üzerinde alerjenle reaksiyona girerek hücre dekompozisyonuna neden olur.

Tip III alerjik reaksiyonda, alerjenler IgG, IgM, IgA sınıfı antikorlarla veya IgE'den oluşan immün komplekslerle doku inflamasyonuna neden olur. Bu tip reaksiyonlara genellikle ilaç, yabancı türlerin serumları, bazı yiyecekler, organik ve inorganik tozlar sebep olur.

Tip IV alerjik reaksiyon ise gecikmiş tip aşırı duyarlılık ya da hücre aracılı aşırı duyarlılık olarak bilinmektedir. Doku üzerindeki inflamatuvar reaksiyon, alerjenlerle uyarılan T lenfositleri tarafından üretilen sitokinler tarafından meydana getirilir (Puc, 2003; Abbas ve Lichtman, 2007).



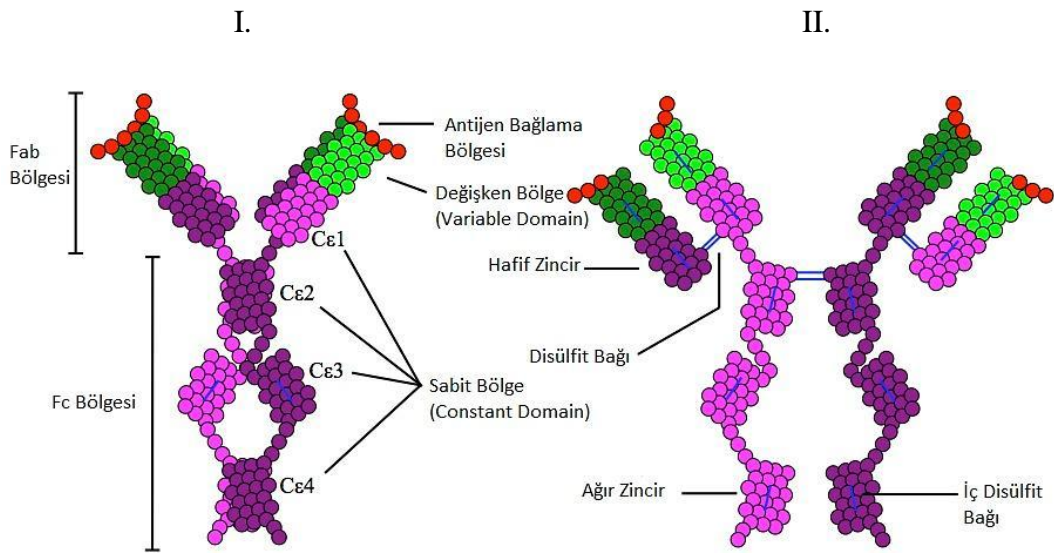
**Şekil 2.1:** Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonunun erken fazında gerçekleşen olaylar (Abbas ve Lichtman, 2007).

### 2.1.1. Alerji Mekanizması

Alerji mekanizmasının en önemli elemanları; inflamatuvar mediyatörler, çeşitli hücre tipleri ve değişik yollardır. Bu yollardan önemli bir tanesi TH2 lenfositlerin regülasyonu ile IL-4 (IgE üretiminde önemli) ve IL-5 (eozinofil üretiminde önemli)

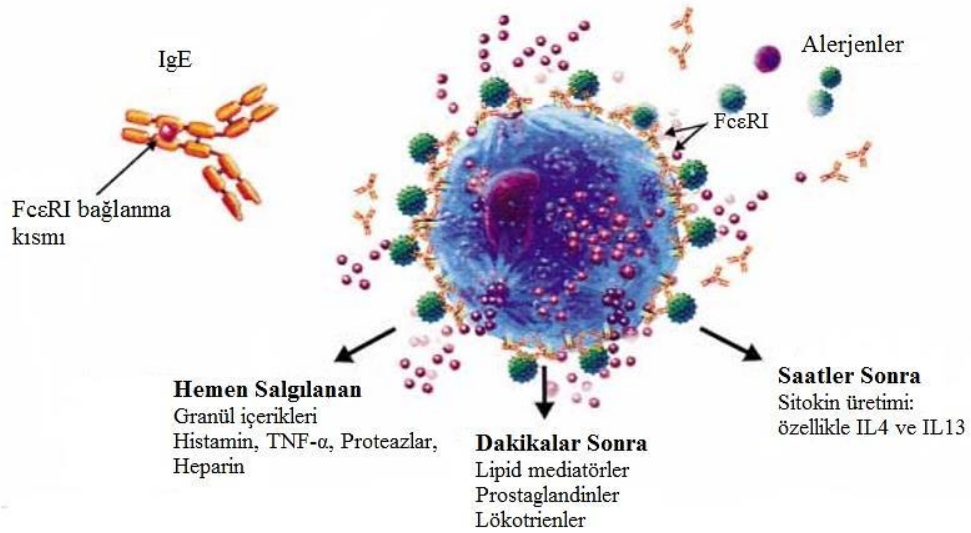
salınımıdır. IL-4, TH0 hücrelerinden TH2 oluşumunu uyararak B hücrelerinden IgE üretimine neden olur. Mast ve bazofil hücreleri üzerinde alerjen-IgE bağlantısı, hücrelerin degranülasyonuna neden olarak inflamatuvar mediyatörlerin (erken fazda), lipid mediyatörlerin ve sitokinlerin (geç fazda) sentezine ve salınımına neden olur. IL-5 ise progenitör hücrelerden eozinofil hücre oluşumunu sağlayarak alerjik inflamasyon oluşumunu artırır. Ayrıca, eozinofiller bronş hiperreaktivitesinde önemli bir rol oynar (Broide, 2001).

Tip I alerji mekanizmasında önemli rol oynayan IgE antikor, 1967 yılında tanımlanmıştır (Ishizaka ve Ishizaka, 1967). Alerjik hastalıklarda ve parazit enfeksiyonlarına karşı verilen immün cevaplarda önemli bir yer tutan bu molekül esas olarak farklılaşmış B hücreleri (plazma hücreleri) tarafından üretilir. İki hafif ve iki ağır zincirden oluşmakla birlikte, e-ağır zincirindeki sabit bölgenin dizisi ile diğer sınıf antikorlardan farklılık gösterir. Ayrıca IgE molekülü IgG'den farklı olarak; 4 ağır zincir sabit domeni ("constant domain", C $\epsilon$ 1-C $\epsilon$ 4) içermektedir. Alerjenlerin bağlanma kısmı, ağır ve hafif zincirleri üzerindeki değişken domenlerde ("variable domain") bulunur. Bununla birlikte, IgE molekülü yüksek ve düşük afiniteli IgE reseptörlerine (sırasıyla, Fc $\epsilon$ RI ve Fc $\epsilon$ RII) FC fragmenti ile bağlanır. Fragment üzerindeki reseptör bağlama bölgeleri ise C $\epsilon$ 3 domeninin farklı kısımlarında bulunur (Şekil 2.2) (Poole ve diğ., 2005).



**Şekil 2.2:** İmmunoglobulin E (IgE)'nin yapısı. I. Molekülün kapalı şekli, II. Molekülün açık şekli (Sabban, 2011).

IgE antikoru ile birlikte mast hücreleri de alerjik inflamasyonda önemli roller üstlenmektedir. IgE'lerin mast hücreleri üzerindeki yüksek-afiniteli reseptörlere (FcεRI) bağlanması ve alerjenlerin de IgE'lere bağlanarak IgE'ler arasında çapraz bağ oluşturmasının ardından mast hücreleri degranüle olmaya başlar (Turner ve Kinet, 1999). Böylece inflamatuvar mediyatörler (histamin, triptaz), yeni üretilmiş lipid mediyatörleri (lökotrien C4, prostaglandin D2) ve sitokinler (TNF) salınmaya başlar (Williams ve Galli, 2000) (Şekil 2.3). Bu mediyatörler hızlı bir şekilde bronşiyal mukozada ödem oluşumu, mukus salgısı ve düz kas kasılmalarına neden olur. Bazofil hücreleri üzerindeki IgE-FcεRI bağlantısının ardından alerjenle bağlantı da benzer şekilde degranülasyona neden olur ve önceden oluşmuş inflamatuvar mediyatörlerin (histamin, heparin, triptaz) salınımı ile lipid mediyatörlerin ve sitokinlerin sentezine neden olur (Broide, 2001).



**Şekil 2.3:** Tip I alerji reaksiyonunda inflamatuvar salınımı (Broide, 2001).

Vücutta buluna IgE antikoru mast, bazofil ve B hücreleri üzerinde bulunan yüksek ve düşük afiniteli IgE reseptörlerinin ekspresyon düzeyini kontrol edebilir. IgE bağlantılı reseptör ekspresyonunda, yüksek IgE miktarı mast ve bazofil hücreleri üzerindeki reseptörlerin ekspresyon seviyesini artırır. Örneğin, IgE-ilişkili FcεRI reseptör ekspresyonunun artışı ile mast ve bazofil hücrelerinin IgE'ye duyarlılığı artırılıp degranülasyon sağlanır. Degranülasyon sonucu salınan sitokinler (IL4) ise IgE üretimini ve reseptör oluşumunu yeniden tetikler (Broide, 2001).

IgE-eksik (“IgE-deficient”) farelerle yürütülen bir çalışmada, IgE üretiminin düşmesi ile mast hücreleri üzerindeki IgE reseptör düzeyinin ve buna bağlı olarak da, mast hücre degranülasyonunun ve inflamatuvar mediyatör üretiminin azaldığı gözlenmiştir (Yamaguchi ve diğ., 1997). Bu farelerin mast hücreleri üzerindeki FcεRI reseptörü kontrol grubuna göre 4 veya 5 kat daha düşük düzeydedir (Yamaguchi ve diğ., 1997). İnsanlarla yapılan çalışmalarda ise benzer bir etki bazofil hücreleri üzerinde saptanmasına rağmen, direkt olarak mast hücreleri üzerinde yoktur.

IgE bağlanması ile mast hücrelerinin aktivasyonu dışında; IgE, B hücreleri üzerinde bulunan ve düşük-afiniteli reseptörlere (FcεRII [CD23]) de bağlanarak bu hücrelerin fonksiyonunu etkiler (Waldschmidt ve Tygrett, 1992). Bunun dışında, IgE-ilişkili reseptör üretimi B hücreleri üzerinde bulunan FcεRII reseptörü üzerinde de etkilidir. IgE seviyesindeki artış B hücreleri üzerindeki FcεRII reseptörlerinin de artışı sağlayarak alerjik yanıtın oluşmasına katkıda bulunur (Oettgen ve Geha, 1999). IgE-eksik farelerle yapılan çalışmada aynı şekilde, IgE-eksik farelerin B hücreleri üzerindeki reseptör seviyesinin de kontrol grubuna göre 3 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Kisselgof ve Oettgen, 1998). Ayrıca FcεRII-eksik farelerde IgE bağlantılı herhangi bir alerjik yanıtın oluşmadığı rapor edilmiştir (Kisselgof ve Oettgen, 1998). Dolayısıyla Tip I alerjik reaksiyonların gelişiminde kilit moleküller IgE ve IgE reseptörleri (FcεRI ve FcεRII [CD23])’dir.

### **2.1.2. Alerji Hastalarında Klinik Bulgular**

Mast hücrelerinden salınan mediyatörlerin miktarına ve salgılandıkları dokuya bağlı olarak ani aşırı duyarlılık reaksiyonları farklı klinik bulgular sergiler. Her bir hastada tek ya da birden fazla klinik bulgu gözlenebilir. Tip I alerji sınıfına; alerjik rinit, astım, rinokonjonktivit, ürtiker, anjiyoödem, egzama ve anafilaksi hastalıkları girmektedir (Abbas ve Lichtman, 2007; Adkinson ve diğ., 2014). Bu hastalıklarda gözlenen klinik ve patolojik bulgular Tablo 2.1.’de belirtilmiştir.



**Tablo 2.1:** Tip I alerjik reaksiyonların klinik bulguları (Abbas ve Lichtman, 2007; Adkinson ve diğ., 2014).

Klinik sendrom	Klinik ve patolojik bulgular
Alerjik rinit	Artmış mukus salgısı, burun kaşıntısı, tıkanma, burun akıntısı, koku algı kaybı, aksırma ile üst hava yollarının ve sinüslerin inflamasyonu
Astım	Hırıltılı solunum, nefessizlik, göğüs sıkışması, öksürük, bronşlarda aşırı duyarlılık ve geç faz reaksiyonda inflamasyon ile doku hasarı
Rinokonjunktivit	Sulu ve kaşıntılı göz ile alerjik rinit bulguları
Ürtiker	Deri üzerinde kızarıklık ve kaşıntı
Anjiyoödem	Deri üzerinde kızarıklık ve kaşıntı (daha derin seviyede) ve deride şişlik
Atopik Egzama (Atopik Dermatit)	Deri üzerinde bölgesel kızarıklık ve inflamasyon ile birlikte diğer alerjik bulgular
Anafilaksi	Damar genişlemesi sonucu kan basıncının düşmesi (şok), laringeal ödeme bağlı hava yolu tıkanıklığı

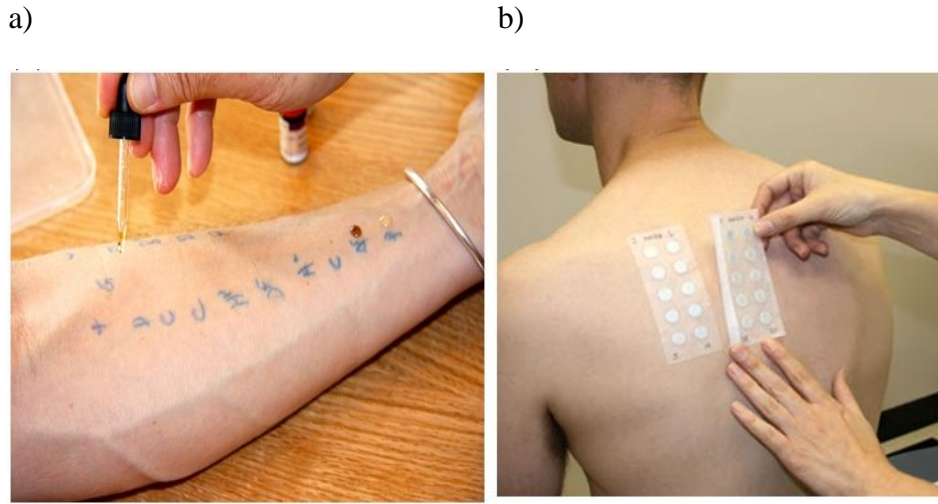
### 2.1.3. Klinik ve Laboratuvar Destekli Alerji Tanısı

Alerjinin klinik tanısında kullanılan başlıca *in vivo* testler; deri prik, yama, nazal provakasyon ve besin yükleme testleridir. Bunların arasında deri prik testi, çoğu alerjinin tanısında yüksek hassasiyet gösteren hızlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntemdir. Reaksiyon düzeyinin saptanmasında fikir verir ve sonucu görsel bir şekilde hastaya hemen belirtme imkanı sunar (Williams ve diğ., 2008).

Bu yöntemde, bir damla alerjen deri üzerine (genellikle kolun iç yüzeyine) uygulanır ve bistüri yardımı ile deriye nüfuzu sağlanır. Alerjik bireyin vücudunda, uygulanan alerjene karşı histamin salgılanıp salgılanmadığı derideki kızarıklık çapına göre değerlendirilip pozitif veya negatif reaksiyon olarak tanımlanır. Deri üzerindeki

kızarıklık çapı mm cinsinden değerlendirilir ve elde edilen sonuçlar, pozitif kontrol olarak uygulanmış histamin'in deri üzerinde oluşturduğu kızarıklık çapı ve negatif kontrol olarak uygulanmış çözücü'nün kızarıklık çapı ile karşılaştırılır. Kızarıklık çapı genel olarak  $\geq 3$  mm olduğunda pozitif reaksiyon olarak kabul edilir (Şekil 2.4.a) (James, 2002; Williams ve diğ., 2008; Lim ve Leong, 2010).

Benzer bir şekilde uygulanan diğer bir test ise yama testidir. Genellikle egzama tanısında kullanılan bu test, bilinen konsantrasyonlarda alerjen içeren yapışkan bantların hastanın sırt kısmına uygulanıp 48 saat sonra kızarıklık derecesinin incelenmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 2.4. b) (Necas, 2013).



**Şekil 2.4:** a) Deri prik testi'nin kol üzerine uygulanişı ( [http://www. Allergymedical group.com.au/about/skin-prik-testing/](http://www.Allergymedicalgroup.com.au/about/skin-prik-testing/), Ziyaret tarihi: 19 Kasım 2013) b) Yama testinin sırtta uygulanişı ( <http://www.slu.edu/dermatology-home/general-dermatology/patch-testing-and-contact-dermatitis>, Ziyaret tarihi: 19 Kasım 2013).

Deri prik testi ve diğer tanı yöntemlerine ek olarak ve tanının kesinliğini artırmak amacı ile kullanılan diğer bir yöntem ise nazal provakasyon testidir (Şekil 2.5). Bu test, kontrollü bir şekilde uygulanan alerjenlere karşı nazal mukozada oluşacak yanıtın anlaşılmasını sağlar. Bu yanıt; kaşınma, aksırma, burun akıntısı (rinore), nazal mukozada ödem oluşumu ve hava akımına karşı oluşan direnç ile tanımlanır. Alerjik rinit hastalığında, hastanın klinik geçmişi ve deri prik test sonuçlarının değerlendirilmesinde ortaya çıkabilecek çelişkinin giderilmesinde ek bir tanı yöntemi olarak kullanılır. Ayrıca, alerjene karşı oluşacak hassasiyetin belirlenmesi (alerjen dozuna bağlı olarak), tedavinin etkinlik ve güvenlik profiline oluşturulması ve nazal

yanıtın hücre veya mediyatör aracılı patofizyolojik mekanizmasının araştırılmasında kullanılır. Buna ek olarak, alerji kökenli solunum hastalıkları hakkında bilgi verir (Dordal ve diğ., 2011).

a)



b)



**Şekil 2.5:** Nazal provakasyon testi. a) Hastaya farklı dilüsyonlarda hazırlanan alerjen ekstresinin uygulanması b) Ekstre uygulandıktan sonra hava akımına karşı oluşan direncin cihaz aracılığı ile ölçülmesi.

Klinik tanıda kullanılan *in vivo* tanı yöntemlerine ek olarak teknolojiye ilerlemeler sayesinde yeni laboratuvar yöntemleri de geliştirilmiştir. Alerjen-spesifik IgE'lerin serum içerisindeki veya bazofil hücreleri üzerindeki miktarı *in vitro* olarak belirlenebilir. *In vitro* yöntemler; kesin miktar tayini, güvenilirlik ve ilaç etkileşimlerini ortadan kaldırması gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte hata ihtimali gibi dezavantajı da bulunur (Hamilton ve diğ., 2004). *In vitro* testler arasında RAST ("radioallergosorbent test") IgE tanısında rutin olarak kullanılan bir test olmakla birlikte, daha sonraları yerini ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") yöntemine bırakmıştır. Alerjen-antikor ilişkisinin kantitatif olarak saptandığı ELISA yönteminde, plastik yüzey üzerine kaplanmış antijene karşı antikor varlığı enzim işaretli ikinci bir antikor ile araştırılır. Son yıllarda ise mikroçip teknolojisi, saflaştırılmış doğal alerjenlere veya rekombinant alerjenlere karşı spesifik IgE ölçümüne olanak tanımaktadır. Bu teknoloji sayesinde az miktardaki serum örneği ile çok miktarda alerjene karşı spesifik IgE belirlenmesi mümkün olmaktadır (Elshal ve Mccoy 2006; Lucas, 2010; Sastre, 2010).

Alerjik hastalıkların tanısında kullanılan *in vivo* ve *in vitro* testlerin yanı sıra hastanın klinik geçmişi kesin tanıda büyük önem taşır. Bulguların sıklığı ve süresi, gece veya gündüz oluşum sıklığı, deri üzerinde oluşan bulgularda lezyonun şekli, boyutu ve rastgele dağılışı, farklı koşullar ve tetikleyici faktörler karşısında oluşum sıklığı, kişinin bulunduğu çalışma koşulları ve hobileri, hayat standartları, yiyecek, içecek ve spor alışkanlıkları, kişisel ve ailevi geçmişi, almış olduğu güncel tedaviler vb. faktörlerin tümü göz önünde bulundurulmalıdır.

## 2.2. ALERJENLER

İmmün sistemi uyaran ve alerjik reaksiyonların oluşmasına neden olan antijenler **alerjen** olarak adlandırılır. Birçok alerjen biyolojik kökenli olup başlıca inhalan alerjenler; polen tanecikleri, mantar (küf, fungus) sporları, bakteri, ev tozu akarları, evcil hayvan epidermisleri, bazı yiyecek alerjenleri ve bazı böcek ağlarını içermektedir (Puc, 2003). Doğal çevreden kökenlenen ve tanımlanan birçok inhalan alerjen genellikle 10-50 kDa arasında olan ve suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinlerdir (Reid ve Gamble, 2009). Mantar sporlarından kaynaklı alerjenler ise genel olarak 6-90 kDa arası proteinler ya da glikoproteinler olup, bazı durumlarda ise proteinlerle ilişkili karbohidrat kısımları yüksek alerjenite özelliği gösterir (Burge ve Rogers, 2000).

Proteinlerin alerjenitesi, genel olarak iki açıdan ele alınır: immünojenisite ve çapraz reaksiyon özellikleri. İmmünojenisite, bu proteinlerin IgE antikorunun üretilmesini tetikleme özelliğini; çapraz reaksiyon ise IgE antikorunun hedef proteinle reaksiyona girme özelliğini belirtir. Bu iki özelliğe ek olarak protein(lerin) IgE bağlama potansiyeline ek olarak klinik bulgu oluşturması da önemlidir. Proteinlerin klinik bulgu oluşturmasında ise fiziksel özellikler (kararlılık, boyut vb.) ve immünolojik özellikler (afinite, epitop valans vb.) tarafından sağlanır. Alerjen ve alerjen olmayan proteinlerin immünojenisitesi ile çapraz reaksiyon özelliklerinin anlaşılmasına yönelik olarak yapısal benzerlik ve farklılıklarını inceleyen çalışmalarda, 40 alerjenik proteinin (ya da alerjenik protein kısmının) analizi gerçekleştirilmiş ve bu proteinler 4 yapısal sınıfa ayrılmıştır. Bunlar, antiparalel  $\beta$ -iplikleri, antiparalel  $\beta$ -tabakaları,  $\alpha$ + $\beta$  yapıları ve  $\alpha$ -sarmal yapılarıdır. Antijen yapılarına yönelik yapılan sınıflandırmalara rağmen,

antijenlerin immün sistemi ve mast hücrelerini uyaracak karakteristik herhangi bir yapısal özelliğe sahip olmadığı anlaşılmıştır (Aalberse, 2000).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda birçok farklı kaynaktan önemli alerjen proteinler izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu alerjenler, fonksiyon ve yapılarına göre farklı protein ailelerinde sınıflandırılmıştır. En çok bilinen alerjenler, non-spesifik lipid transfer proteinleri, depo proteinleri, patogenez-ilişkili protein ailesi 10 (PR-10, “pathogenesis-related protein family 10”) proteinleri, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler, serum albüminler, parvalbuminler, tropomiyosinler ve lipokalinler gibi protein ailelerinin üyeleridir (Sastre, 2010).

Klinikte kullanılan alerjen proteinler bilimsel isimlerinin kısaltması ile anılır. Örneğin, ‘Ole e 1’, *Olea europea*’dan alerjen 1 anlamına gelir. Protein içeren hemen her şey alerjen özelliği gösterebilir ve her alerjen kaynağı çok sayıda alerjik bileşen içerebilir. Her bir alerjik bileşen üzerinde genelde birkaç farklı epitop (ilgili antikorun bağlanmasından sorumlu üç boyutlu bağlanma bölgesi) bulunur. Tüm alerjenler ya da epitoplar için bilinen ortak bir yapı yoktur. Fakat her bir tür, türe özel alerjen epitopuna sahiptir ve bu epitopa karşı üretilen antikorlar, sadece bu türe ait alerjen epitopuna bağlanır. Bununla birlikte biyolojik olarak yakın türlerde aynı ya da benzer yapıda alerjenler bulunabilir. Bir proteine karşı üretilen antikorlar aynı ya da benzer yapıda üretilmiş farklı türlerin proteinlerine de bağlanabilir. Böylelikle **çapraz reaksiyon** (“cross-reactivity”) olarak adlandırılan reaksiyon meydana gelir (Sastre, 2010).

Klinikte kullanılan alerjenlerle ilgili olarak bir diğer özellik ise protein kararlılığıdır. Sıcaklığa ve sindirime dayanıklı olan alerjenler daha ağır klinik reaksiyonlara neden olurken, dayanıklı olmayanlar daha hafif ve bölgesel bulgulara yol açar. Sonuç olarak, bir alerjen proteinin yapısı, bağlı olduğu protein ailesi, sıcaklık ve sindirime karşı dayanıklılığı duyarlı kişilerde oluşturacağı alerjik reaksiyonun şiddetini belirler (Sastre, 2010).

Alerjik yanıtın oluşmasında, IgE antikorunun Fab kolu ile antijene, Fc kolu ile de mast ve bazofil hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik IgE reseptörlerine (FcεRI) bağlanır. En az iki IgE molekülünün antijene bağlanması durumunda ise FcεRI reseptörleri arasında çapraz bağlanma meydana gelip hücre içi sinyaller başlar ve inflamatuvar mediyatörler

salınır. Çapraz bağlanmanın meydana gelmesi için her bir alerjenin en az iki IgE bağlanma epitopuna sahip olması gerekir. Bu IgE-bağlanma epitoplarının her biri de en az 15 amino asitten oluşmaktadır. Böylelikle her bir protein alerjenin minimum 30 amino asite (~ 3 kDa) sahip olabileceği sonucuna varılır. Genel olarak her bir alerjen ikiden fazla IgE-bağlanma epitopuna sahiptir (Huby ve diğ., 2000).

Alerjen proteinlerin IgE üretimini tetiklemesi için B hücre yüzey reseptörleri tarafından tanınmasını sağlayan 'B epitop'una; T hücreleri tarafından tanınması için de 'T epitop'una sahip olması gerekir. B hücrelerinden IgE üretimi için gerekli olan sinyallerden ilki B hücre yüzey reseptörünün antijen üzerindeki B epitopuna bağlanması ile sağlanır. İkincisi ise; antijen sunan hücreler ("antijen presenting cell", APC) tarafından işlenmiş ve MHC ("major histocompatibility complex") sınıf II molekülleri ile birlikte hücre yüzeyinden, Th2 hücrelerine sunulan antijen fragmentlerinin (T epitopu içeren) T hücre reseptörüne bağlanması ile sağlanır. Böylelikle B hücrelerinden IgE üretimi antijen üzerindeki T epitopu aracılığıyla ve T hücreleri ile kontrol edilebilir (Huby ve diğ., 2000).

Proteinlerin alerjenitesi dikkate alındığında bir diğer özellik ise molekül içi disülfid bağlarıdır. Örneğin, bölgesel yönlendirilmiş mutasyon ile disülfid bağı oluşumu engellenmiş Der p 1 ve Lep d 2 alerjenik proteinlerinin, alerji hastalarında IgE'ye bağlanma yeteneğini kaybettiği belirlenmiştir (Smith ve Chapman, 1996; Olsson ve diğ., 1998). Ayrıca bu bağlardaki bozulmanın T epitopunun serbest bırakılmasına ve yıkımına da yol açabileceği öne sürülmüştür (Collins ve diğ., 1991). Dolayısıyla disülfid bağları gerek antijenlerin işlenmesinde gerekse kararlılığında çok etkilidir ve alerjeniteyi öngörülecek bir şekilde etkileyebilir.

Post-translasyonel modifikasyonlardan biri olan glikozilasyon endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşen ana biyosentetik olaylardan biridir. Birçok çözünebilir ve membrana bağlı glikoprotein ER'da sentezlenip daha sonra hücre dışına gönderilir. Sitozoldeki proteinlerin çok azı glikozillenmiş olup bunlar da basit şeker modifikasyonlarıdır (serin ve treonin amino asitlerine N-asetilglikozamin grubunun eklenmesi). Ökaryotik hücrelerde, protein sentezinden kısa bir süre sonra oligosakkaritler doğal bir şekilde proteinlere eklenebilir. Bu glikozilasyon olayı oligosakkaritlerin birincil amino asit dizisindeki asparajin (N-glikozit bağı) veya serin/treonin (O-glikozit bağı) amino

asitlerine kovalent bağlanması ile gerçekleşir. Oligosakkaritlerin asparajin amino asitinin NH<sub>2</sub> grubuna transfer edilmesi ile oluşan yapı 'N-bağlı' ya da 'asparajin-bağlı' glikoprotein olarak adlandırılır. Bu transfer, aktif kısmı ER'nin lümeninde bulunan membrana bağlı enzim kompleksi 'oligosakkarit transferaz' tarafından gerçekleştirilir. Glikozilasyon işlemi kullanılan öncü oligosakkaritler (N-asetilglukozamin, mannoz, glukoz vb.) ER'nin membranında 'dolikol' olarak adlandırılan özel bir lipid ile tutulur. Protein translokasyonu sırasında, dolikol tarafından tutulan oligosakkaritler tek bir enzimatik basamakla ER lümenine geçerken hedef asparajine aktarılır. Ayrıca, dolikol lipidi ile oligosakkaritler arasındaki yüksek enerjili fosfat bağı glikozilasyon reaksiyonu için gerekli enerji kaynağını sağlar (Alberts ve diğ., 2008).

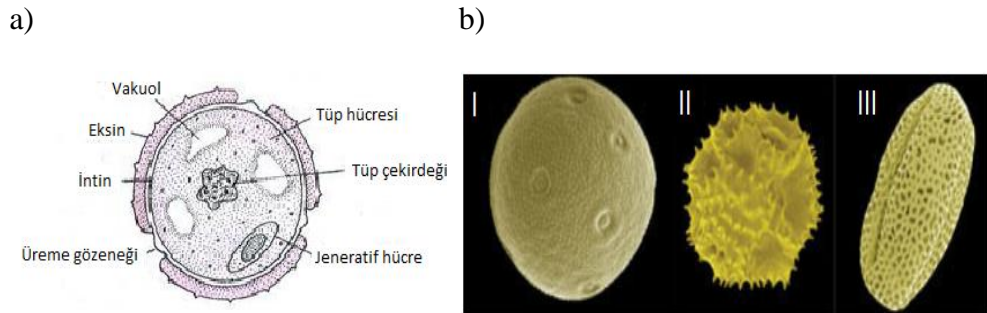
Glikanlar, proteinlerin katlanmasında, doğru protein yapısının oluşmasında, üçüncül yapısının kararlılığında ve proteinleri proteolizden korumakta önemli bir rol oynar (Gamblin ve diğ., 2009). Böylelikle proteine eklenen şeker kısmı, proteinin kararlılığını, çözünürlüğünü, hidrofobitesini ve elektrik yükünü değiştirebilir. Bu değişiklikler de proteinin antijenik ve alerjenik potansiyeli üzerinde etkili olur. Birçok protein alerjen glikozillenmiş durumdadır ve glikozil grupları alerjenitelerine katkıda bulunabilir. Glikozilasyon, protein üzerindeki B ve T hücre epitoplarını değiştirerek proteinlerin immünolojik karakterlerini etkileyebilir (Mouritsen ve diğ., 1994; Petersan ve diğ., 1998; Huby ve diğ., 2000) .

Yapılan bazı çalışmalarda, proteinin biyolojik aktivitesinin de alerjenite üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Huby ve diğ., 2000). Enzimatik aktiviteye sahip olan proteinlerin alerjenik reaksiyonları tetikleme daha yüksek bir olasılıktır ve alerjenler çeşitli biyolojik aktivitelere (proteoliz, ligand bağlama, yapısal görevler vs.) sahip olabilirler. Tanımlanan bazı alerjen mekanizmalarında biyolojik aktivitenin alerjenlerin etkinliği üzerine direkt katkısı olabileceği öne sürülmektedir. Örneğin, ev tozu akarlarından elde edilen Der p 1 alerjeni için yapılan aktivite çalışmalarında, bu proteinin proteolitik aktiviteye sahip olduğu ve bu aktivitenin bronşiyal epitelyumun geçirgenliğini artırarak alerjenlerin alınımını böylelikle de inflamatuvar sitokinlerinin üretimini etkileyebileceği gösterilmiştir (Herbert ve diğ., 1995). Ayrıca, Der p 1'in bazı lökositlerin yüzeyinde sentezlenen CD23 ve CD25 reseptörlerinin ayrılmasına yol açtığı ve immün cevapta düzensizlik oluşturarak IgE üretimini artırdığı saptanmıştır (Shakib ve diğ., 1998).

### 2.2.1. Polen Alerjenleri

Polenler, çiçekli bitkilerin erkek gametlerini taşıyan kısımlarıdır (Şekil 2.6). Biyolojik fonksiyonu dişi gametofitini dölmektir. Polenler doğada farklı şekil (genellikle küre şeklinde) ve boyutlarda (12-300 µm çapında) bulunurlar. Polen taneciklerinin dış duvarı ekzin olarak adlandırılır ve sporopollenin denilen bir tabakadan oluşur. Bu yapı polen taneciklerini fiziksel ve kimyasal etkilerden korumada büyük önem taşır. İç duvar (intin) ise polen yapı ve şeklini desteklemese de içerisinde organeller, vejetatif ve generatif (üreme ile ilgili) hücreleri içeren sitoplazmayı çevreler (Taketomi ve diğ., 2006; Alberts ve diğ., 2008 ).

Polen kaynaklı alerjenler genellikle suda çözünebilen proteinler ya da glikoproteinlerdir. Bu proteinler genel olarak 10-70 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip olup, bazıları sıcaklık ve pH değişimlerine dirençlidir (Puc, 2003). Polen alerjenlerini tanımlamak üzere yapılmış çalışmalar sonucu bu alerjenler başlıca; Bet v homolog [patogenez-ilişkili 10 (PR-10)] proteinler, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler ve ekspansinler olmak üzere dört ana polen alerjen ailesine ayrılmışlardır (Ferreira ve diğ., 2004; Chapman ve diğ., 2007). Alerjik reaksiyon oluşumuna neden olan ve iyi bilinen polen alerjenleri ile alerjen kaynakları Tablo 2.2' de belirtilmiştir.



**Şekil 2.6:** a) Polen tanesinin ana kısımları

(<http://www.yourarticlelibrary.com/biology/stamen-male-reproductive-organ-in-flowering-plants/11816/>, Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014) b) Farklı bitkilere ait polen taneleri [I: Ribwort Plantain (*Plantago lanceolata*), II: Dandelion (*Taraxacum* sp.), III: Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*); Scanning electron microscopy (colorized)](<http://www.Vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/pollenmorphology/>, Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014)



**Tablo 2.2:** Polenlerde bulunan başlıca alerjenik proteinler

Ağaç polenleri			Ot polenleri			Çimen polenleri		
Bitki	Alerjen(M <sub>w</sub> )	Kaynak	Bitki	Alerjen(M <sub>w</sub> )	Kaynak	Bitki	Alerjen	Kaynak
Huş ağacı ( <i>Betula verrucosa</i> )	Bet v 1 (17 kDa) Bet v 2 (15 kDa) Bet v 4 (7-8 kDa)	Swoboda ve diğ., 2008	Kanarya otu ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> )	Amb a 1 (38 kDa)	Mohapatra ve diğ., 2008	Çayır otu ( <i>Phleum pratensis</i> )	Phl p 1 (27 kDa) Phl p 2 (10-12 kDa) Phl p 4 (55 kDa) Phl p 5 (32 kDa) Phl p 6 (11 kDa) Phl p 7 (6 kDa) Phl p 11 (20 kDa)	Esch, 2008
Kızıl ağaç ( <i>Alnus glutinosa</i> )	Aln g 1 (18 kDa)	Sastre, 2010	Misk otu ( <i>Artemisia vulgaris</i> )	Art v 1 (28 kDa) Art v 3 (12 kDa)	Mohapatra ve diğ., 2008	Bermuda çimeni ( <i>Cynodon dactylon</i> )	Cyn d 1 (32 kDa)	Mohapatra ve diğ., 2005
Fındık ağacı ( <i>Corylus avellana</i> )	Cor a 1 (17 kDa)	Sastre, 2010	Yapışkan otu ( <i>Parietaria judaica</i> )	Par j 1 (15 kDa) Par j 2 (10-14 kDa)	Asturias ve diğ., 2003			
Zeytin ağacı ( <i>Olea europaea</i> )	Ole e 1 (16 kDa) Ole e 2 (15 kDa) Ole e 7 (9-10 kDa) Ole e 9 (46 kDa)	Esteve ve diğ., 2012	Devedikeni ( <i>Salsola kali</i> )	Sal k 1 (43 kDa)	Carnes ve diğ., 2003			
Japon çamı ( <i>Crytomaria japonica</i> )	Cry j 1 (41-45 kDa) Cry j 2 (45 kDa)	Fujimura ve diğ., 2004	İngiliz sinir otu ( <i>Plantago lanceolata</i> )	Pla l 1 (18 kDa)	Calabozo ve diğ., 2001			
Sedir ( <i>Cupressus arizonica</i> )	Cup a 1 (43 kDa)	Arilla ve diğ., 2004						
Çınar ( <i>Platanus acerifolia</i> )	Pla a 1 (18 kDa) Pla a 2 (43 kDa)	Asturias ve diğ., 2006						
Kauçuk ağacı ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	Hev b 1 (14 kDa) Hev b 3 (24 kDa) Hev b 5 (16 kDa) Hev b 6 (20 kDa) Hev b 8 (15 kDa)	Posch ve diğ., 1998; Raulf-Heimsoth ve diğ., 2007						

### 2.2.1.1. Ak Dut (*Morus alba L.*) Polen Alerjenitesi

Dutgiller (Moraceae) ailesinin bir üyesi olan ak dut (*Morus alba L.*) esas olarak Çin, Japonya, Tayland ve Malezya kökenlidir. Günümüzde Doğu ve Orta-Batı Amerika dahil olmak üzere tüm dünya genelinde yetişmektedir. Türkiye’de ise Erzincan, Elazığ, Ankara, Malatya ve Tunceli başta olmak üzere her bölgede yetişmektedir (Gençer ve diğ., 2013).

Bu türün ağaçları, 18-20 m boylanabilen kışın yapraklarını döken ve geniş bir tepe oluşturan bir yapıya sahiptir. Gövde kabuğu açık gridir ve yaprakları yeşil, elsi veya kalp şeklindedir. Ak dut ağacı ilkbaharda çiçeklenip 2 cm uzunluğunda yeşilimsi-sarı çiçekler açar (Şekil 2.7.). Bu ağaç kendiliğinden dölllenme gösterip rüzgar yardımı ile polenlerini yayar.

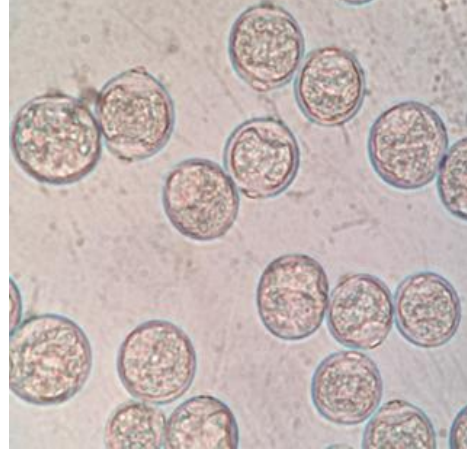
Ak dut polenlerinin astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi alerjik hastalıkları tetiklediği bilinmektedir (Navarro ve diğ., 1997). İspanya ve Hindistan’da yapılan klinik çalışmalar ak dut polenin, özellikle polen-yayma döneminde (Nisan-Mayıs) önemli bir inhalan alerjen olduğunu ortaya koymuştur (Singh ve diğ., 1987; Sneller ve diğ., 1993). Temas yoluyla ürtiker hastalığını tetiklediği de rapor edilmiştir (Munoz ve diğ., 1995).

Ak dut poleni ile yürütülen alerjenite çalışmaları (Singh ve diğ., 1987; Sneller ve diğ., 1993; Navarro ve diğ., 1997) güçlü bir alerjen kaynağı olduğunu ortaya koysa da bu türe ait herhangi bir alerjen günümüze dek tanımlanamamıştır (<http://www.pollenlibrary.com/Specie/Morus+alba/>, Ziyaret tarihi: 27 Kasım 2013; <http://www.allergen.org/>, Ziyaret tarihi: 27 Kasım 2013).

a)



b)



**Şekil 2.7:** a) Ak dut ağacının çiçek ve yeni oluşan yaprakları  
(<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/296650/#b>, Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2013)  
b) Ak dut poleni (Olympus CX31, 100X)

#### **2.2.1.2. Mavi Atlas Sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. 'Glauca'] Polen Alerjenitesi**

Çamgiller (Pinaceae) ailesine ait olan mavi atlas sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. cv. Glauca"] genel olarak Kuzey Afrika, Cezayir, Fas ve Atlas Dağlarında yetişen bir sedir ağacı türüdür (Şekil 2.8). Türkiye’de yetişen türü *Cedrus libani*’dir.

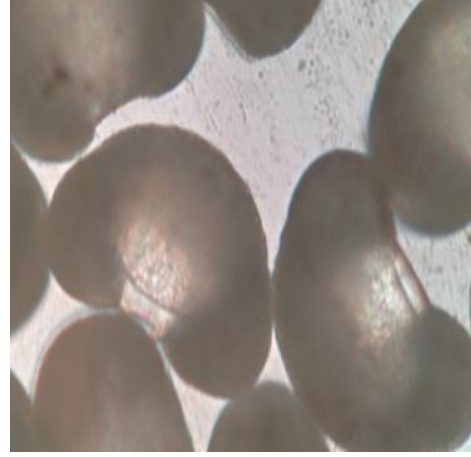
Ağaç, genç döneminde hızlı büyüme gösterir ve 9-40 m boyuna kadar ulaşabilir. Yaprakları kısmen mavi, açık yeşil ya da gümüş mavidir. Kozalakları parlak açık kahverengi, 5-8 cm uzunlukta dik durur ve uç kısmı basıktır. Bu türe ait erkek çiçekler 5 cm’ye kadar, dişi çiçekler ise 1,5 cm’ye kadar uzayabilir. Erkek ve dişi çiçekler aynı ağaç üzerinde farklı dallarda oluşur. Polen üretimi bulunduğu yükseklik, bölge ve hava şartlarına bağlı olarak sonbahar sonlarına (Eylül-Ekim) doğru gerçekleşir (Pijut, 2000).

*Cedrus* cinse ait diğer bir tür olan Himalaya sediri (*Cedrus deodara*)’ne ait polen ekstrelerinin alerjenitesi incelenmiş ve spesifik Ig-E üretimine neden olan proteinleri saptanmıştır (Rawat ve diğ., 2000). Ancak mavi atlas sedirinin polen alerjenitesi konusunda bugüne dek herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

a)



b)



**Şekil 2.8:** a) Mavi atlas sediri ağacının çiçek ve yaprakları (<http://treesofsantacruzcounty.blogspot.com/2011/05/cedrus-atlantica-glauca-blue-atlas.html>, Ziyaret tarihi: 28 Kasım 2013) b) Mavi atlas sediri poleni (Olympus CX31, 100X)

### 2.2.2. Çevresel Faktörlerin Alerji Hastalığı Üzerine Etkisi

Alerjik reaksiyonlar, genetik ve doğal faktörlerin etkisiyle farklı yaş aralıklarında ve değişik organlarda bulgu veren, çok etkenli heterojen sağlık sorunları olarak tanımlanabilir. Alerji gelişiminde genetik faktörlerin araştırılmasına yönelik yapılan ikiz çalışmalarında, genetik faktörün % 50'den fazla ve kalıtsallığın ise % 36-79 arasında etkili olduğu gösterilmiştir (Lawson ve diğ., 1998; Renz ve diğ., 2011; Jenerowicz ve diğ., 2012). Dolayısıyla, alerji hastalığı genetik yatkınlık ve doğal koşulların bir etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır.

Atmosferdeki karbon dioksit ( $\text{CO}_2$ ) ve diğer sera gazlarının artmasından kaynaklanan iklim değişiklikleri de, sıcaklık ve nem oranının artmasına neden olup inhalan (solunumla vücuda giren) alerjenlerin üretimi, dağılımı ve alerjenik içeriğinde etkili olmaktadır. İklim değişikliği, inhalan alerjen üretimi yapan bitki (yabani otlar, çimen, ağaçlar) ve organizmaların (mantar, küf) dağılımı ve büyümesi üzerinde de etkilidir. İnhalan alerjenlerin üretimi ve bunlara maruz kalma süresi alerji hastalığının görülme sıklığında ve bulgularda değişiklikler yaratır. Hava kirletici gazlar [ozon ( $\text{O}_3$ ), azot dioksit ( $\text{NO}_2$ ), kükürt dioksit ( $\text{SO}_2$ ), karbon monoksit ( $\text{CO}$ ), parçacıklı maddeler (PM, "particulate matter"), dizel egzoz partikülleri (DEP, "diesel exhaust particles")] bağımsız bir şekilde ya da alerjenlerle birlikte alerjik reaksiyonlara veya bu reaksiyonların şiddetlenmesine sebep olur (Reid ve Gamble, 2009). Yapılan hayvan

deneylerinde, ovalbumine karşı olan IgE-ilişkili aşırı duyarlılığın, eş zamanlı olarak DEP ya da ozon gazına maruz bırakılanlarda yüksek olduğu saptanmıştır (Takizawa, 2011). Buradan yola çıkarak hava kirletici gazların alerjik reaksiyonları epitelde değişiklikler yaratarak, immün sistemi etkileyerek veya antijenlerin alerjenitesini artırarak güçlendirebileceği öne sürülmektedir (Jenerowicz ve diğ., 2012).

İklim değişikliklerinden kaynaklanan polen üretim sezonunun süresi ve dönemindeki değişiklikler kişilerin polen alerjenlerine maruz kalma süresini de değiştirerek bu alerjenlere karşı oluşacak duyarlılık şiddetini etkilemektedir (Root ve diğ., 2003). Bunun dışında, farklı habitatlarda bulunan bazı bitki türlerinin değişik habitatlara taşınması ile de bölgeye yeni polen girişi olur. Bu değişiklik popülasyonda alerji hastalığının artışına ve daha önce herhangi bir polene karşı alerjik reaksiyon göstermeyen kişilerde bile alerjik bulguların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Asero, 2002).

Özellikle Avrupa'da iklim değişikliklerinin ve çevresel faktörlerin inhalan alerjenler ve alerjik hastalıklar üzerine etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, dünya üzerindeki diğer bölgelerde izlenecek yaklaşımlara ışık tutmaktadır. Önemli inhalan alerjenler için tamamlanmış çalışmalar, bu alerjenlerin üretimi ve dağılımları ile ilgili raporlar ve alerjik hastalıklar üzerindeki etkisinin epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmesi, daha iyi bir analiz için ilk adımı oluşturacaktır (Reid ve Gamble, 2009).

### **2.3. ALERJENİK PROTEİNLERİN TANIMLANMASINDA İZLENEN GENEL STRATEJİ**

Son yıllarda, proteomik yöntemler alerjik araştırmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Protein alerjenleri üzerine yapılan araştırmalar ve tanımlanmış alerjenlerin sayısı giderek artmaktadır. Birçoğunun amino asit dizisi veri bankalarına işlenmiş olup farklı alerjen aileleri şeklinde gruplandırma yapılmıştır. Aynı aileye ait proteinlerin amino asit dizileri arasındaki benzerlik derecesi değişiklik gösterse de uyuşumsal yapıları (konformasyonları) yüksek derecede korunmuştur. Böylece protein ailelerine ait bilgiler yeni alerjenlerin tanımlanması açısından da ipucu sağlamaktadır (Rodriguez ve diğ., 2007).

Yeni bir alerjenin tanımlanmasında iki temel yaklaşım izlenebilir. İlki, protein ayırma ve protein tanımlama tekniklerinin birleşimi, diğeri ise protein mikroçip yaklaşımıdır. Genel olarak ilk yaklaşım yeni bir alerjenin keşfinde daha çok tercih edilirken, protein mikroçip yaklaşımı bireylerin hangi alerjene karşı hassas olduğunu tespit etmekte yaygın olarak kullanılır (Gonzalez-Buitrago ve diğ., 2007) .

Alerjen bir kaynaktan elde edilen proteinlerin ayrışımı alerjen tanımlanmasında ilk adımı oluşturur. Protein ayrıştırılmasında standart olarak kullanılan yöntem ise iki boyutlu jel elektroforez (2D-GE) yöntemidir. Bu yöntemde proteinler birinci boyutta izoelektrik odaklama (IEF) işlemi ile öncelikle izoelektrik noktalarına (pI) göre, daha sonra da ikinci boyutta denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. Ayırım işleminden sonra jel uygun boyama yöntemi ile boyanarak proteinler görünür hale getirilir (Fey ve Larsen, 2001).

İlgilenilen alerjenin (IgE\_bağlayan protein) jel üzerinde saptanması için kullanılan esas yöntem immünoblotlama yöntemidir. Bu yöntemde, jel üzerinde ayrılan proteinler elektrotransfer ile membrana aktarılır ve öncelikle alerjik hasta serumu ile veya monoklonal antikor ile muamele edilir. Ardından, işaretlenmiş anti-insan-IgE antikor muamelesi ve işaretin saptanması ile immünreaktivite tespit edilir.

İlgilenilen antijenlerin tanımlanması ise kütle spektrometrisi (MS) ile yapılır. MS ile tanımlama yönteminde iki farklı yaklaşım izlenebilir. Proteinlerin tripsinle kesiminden sonra, MALDI-TOF MS ile gerçekleştirilen ‘peptid kütle parmakizi’ yöntemi ya da ardışık MS (MS/MS) ile gerçekleştirilen ‘peptid dizileme’ yöntemi takip edilir.

Peptid kütle parmakizi yönteminde triptik ürünlerin moleküler kütlesi ölçülür ve protein dizisi bilinen triptik fragmentlerle eşleştirilir. Peptid dizileme yönteminde ise seri şeklinde iki MS analizi gerçekleştirilir. İyonizasyon işleminden sonra yüklü peptidler ilk MS’e girer ve burada peptidler kütle/yük oranına göre ayrılır. Ardından sadece spesifik peptidlerin daha küçük fragmentlere ayrıldığı çarpışma hücresi (“collision cell”) bölümüne aktarılıp ikinci bir MS analizine tabi tutulur. Bu yöntemde fragmentler arasındaki kütle farkı amino asit dizisini belirler (Gonzalez-Buitrago ve diğ., 2007).

Günümüze dek birçok alerjen yukarıda anlatılan proteomik yaklaşımlarla tanımlanmıştır. Örneğin; Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens*)'ne ait polen alerjenlerinin (Shahali ve diğ., 2012a) ve buğday'dan serpin,  $\alpha$ -amilaz inhibitörü ve  $\alpha$ -glaidin gibi alerjenlerin tanımlanmasında (Akagawa ve diğ., 2007) benzer yaklaşımlar uygulanmıştır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. POLEN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Polen örnekleri İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki uzmanlar tarafından 2012 yılında, disseminasyon döneminde (*Morus alba*, Nisan-Mayıs; *Cedrus atlantica*, Eylül-Ekim aylarında) İ.Ü. Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenlerle kağıt zarflara toplandı. Polenlerin erkek çiçek kurullarından dökülmesi için, erkek çiçek kurulları 1 gün boyunca kurutma kağıdının üzerinde bekletildi. Polenler, polen eleme cihazında farklı gözeneklere (250, 180, 90 milimikronluk) sahip eleklerden geçirilerek en alttaki toplama kabında biriktirildi. Toplama kabında biriken polenler dijital hassas terazide ağırlıkları belirlendikten sonra protein ekstraksiyonu için kullanılmaya dek derin dondurucuda (-86°C) özel tüplerde saklandı.

#### 3.2. POLEN EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi'nden temin edilen polen örnekleri 1:12 (ağırlık: hacim) oranında 125 mM amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) çözeltisi ile 4 °C'de 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Polen kalıntıları santrifüj edilerek (13 000xg, 4°C, 1 saat) uzaklaştırıldı (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Üst sıvı filtrasyon sisteminde (Sigma, Millipore Sterifil Vacuum Filtration System) önce Whatman filtre kağıdı (125 mm) daha sonra da 125 µm ve 0.45 µm por çaplı filtrelerden (Millipore) geçirilerek partiküllerden arındırıldı. Elde edilen filtrat 48 saat süreyle 4°C'de saf suya karşı diyaliz tüpü içerisinde (Sigma-Aldrich, 43 mm) diyaliz işlemine tabi tutuldu (Lacovacci ve diğ., 1998). Diyaliz aşaması tamamlanan örnekler kuru toz haline gelinceye dek liyofilizatörde (CHRIST/ALPHA 1-4 LD Plus) liyofilize edildi. Liyofilize haldeki polen ekstraktları klinik ve proteomik analizlerde kullanılmaya dek derin dondurucuda (-80°C) saklandı.



### 3.3. PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Klinik ve proteomik analizlerde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonunu saptamak için bişinkoninik asit yöntemine (Walker, 2002) göre çalışan BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific) kullanıldı. Protein örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık:hacim) oranında çözündürüldükten sonra 96 kuyucuklu kaplara 3 tekrarlı ve her bir kuyucukta 25 µL olacak şekilde eklendi. Üzerine 200 µL, kit içeriğindeki A reaktifi ile B reaktifinin 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan BCA belirteci eklenerek 37°C’de 30 dk bekletildi. Ardından 562 nm’de kör örneğe (saf su) karşı absorbans ölçümü alındı (VarioScan Flash Image System, BIO-RAD). Standart grafiğın oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”, BSA) standartı ve kör örnek olarak saf su kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (0.031-1.500 mg/mL) hazırlanan standart protein örneklerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Polen ekstrelerinin protein konsantrasyonu bu grafik için elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı.

### 3.4. KLİNİK ANALİZLER

#### 3.4.1. Hasta Serumlarının Toplanması

Klinik analizler, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan alınan Etik Kurul Onay belgesi (Ek 1) alınarak gerçekleştirildi. İstanbul Üniversitesi, Dahili Tıp Bilimleri İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı’na başvuran hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek onam formları imzalatıldı ve klinik çalışmalar aynı birimdeki uzman hekimler tarafından gerçekleştirildi.

Ak dut poleninin alerjenitesini araştırmak için 23 alerjik rinit hastasına (17 kadın, 6 erkek; 21-56 yaşları arasında); mavi atlas sediri poleninin alerjinitesini araştırmak için 21 alerjik rinit hastasına (12 kadın, 9 erkek; 21-56 yaşları arasında) ve her iki deney grubu için de kontrol grubunu oluşturacak 5’er sağlıklı bireye (ak dut için: 2 kadın, 3 erkek; mavi atlas sediri için: 4 kadın, 1 erkek; 21-56 yaşları arasında) polen ekstreleri uygulandı. Hastalar daha önceden farklı ağaç polenlerine karşı alerjisi olanlar arasından seçildi.

Her bir bireyin, araştırılacak olan polen örneğine karşı alerjik reaksiyonu olup olmadığı deri prik ve nazal provakasyon testi ile belirlendi. Bu testler uygulanmadan önce, hastalardan kan örneği alınarak 14.000 devir/dakika (Eppendorf), 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hasta serumları (üst sıvı) separatör jel içeren farklı tüplere aktarılarak Western blotlama yönteminde kullanılmaya dek derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Kan örneklerinin toplanması ve serumların ayrıştırılması işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'ndaki sağlık personeli tarafından gerçekleştirildi.

### **3.4.2. Deri Prik Testi**

Deri prik testinde, her bir hastanın genel alerji profilini saptamak için ticari alerjen ekstresi (ALBIO) ile ak dut ve mavi atlas sediri polen ekstraktları eş zamanlı olarak uzman hekimler tarafından hastalara uygulandı.

Liyofilize haldeki ak dut ve mavi atlas sediri polen ekstraktları serum fizyolojik ile sulandırılıp 1/1000, 1/100, 1/10, 1/1 oranlarında seyreltilerek her bir hastanın kol içi üzerine eşit hacimde uygulandı. 20 dk sonra deri üzerindeki kızarıklık çapı 3 mm'yi aşan hastalarda, negatif kontrol olarak uygulanmış serum fizyolojinin çapı ile kıyaslama yapılarak pozitif reaksiyon olup olmadığı incelendi. Deri üzerindeki kızarıklık çapı  $\geq 3$  mm olan hastalar, çalışılan polen proteinine karşı alerjik (pozitif hasta) olarak kabul edildi.

### **3.4.3. Nazal Provakasyon Testi**

Nazal provakasyon testine serum fizyolojik ile başlanıp pozitif sonuç alınana kadar 1/1000, 1/100, 1/10, 1/1 dilüsyonlarındaki polen ekstraktları ile devam edildi. Anterior rinometri (Masterscope Spirometre, Jaeger) cihazı ile nazal direnç ve semptom skorları her bir hasta için uygulamaya başlamadan önce ve uygulamadan sonra ölçüldü ve skorlara bağlı olarak pozitif hastalar (alerjik reaksiyon oluşturan hastalar) belirlendi.

### 3.5. ELEKTROFORETİK ANALİZLER

#### 3.5.1. Bir Boyutlu (1D-) Denatüre Jel Elektrofözezi

Protein konsantrasyonu saptanan polen ekstrerezi 1:1 oranında 60 mM Tris HCl, pH 6.8, %1 SDS, %10 sukroz, 71.5 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, % 0.05 bromofenol mavisini içeren örnek yükleme tamponu ile 1:1 (hacim:hacim) oranında karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra her bir kuyucukta 20  $\mu$ g protein olacak şekilde jele yüklendi. Polen ekstresinde bulunan proteinleri moleköl ağırlıklarına göre ayırmak amacıyla, farklı konsantrasyonda akrilamid içeren iki kısımlı jeller hazırlandı ve ayırım Walker (2002) tarafından önerilen kesikli sistemde gerçekleştirildi. Jelin hazırlanmasında öncelikle Tablo 3.1'den yararlanarak %10 oranında akrilamid içeren 1. kısım (ayırma jeli) cam kasetler (10.1x7.3 cm) arasına dökölüp polimerize olması için üzeri 1 mL distile su ile kapatıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat) jel üzerindeki su uzaklaştırılarak, %5 oranında akrilamid içeren jelin 2. kısmı (yükleme jeli) (bkz. Tablo 3.1) dökölüp kuyu oluşumunu sağlamak için tarak yerleştirildi. Yükleme jeli polimerize olduktan sonra (yaklaşık 30 dakika) tarak çıkartılıp jel kaseti distile su ile yıkandı ve yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) doldurulmuş elektroföze tankına yerleştirildi. Polen ekstrerezi jel kasedine yüklenerek elektroföze aletine (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirildi. Elektroföze işlemine sabit voltajda (200 V), bromofenol mavisine ait bant jelin alt kısmına ulaşana dek (~40 dakika) devam edildi (Walker, 2002).

Ayırım işleminden sonra elektroföze sonlandırıldı ve jeller kasetlerden çıkartıldı. Jel üzerindeki protein bantları iki farklı boyama yöntemi (Coomassie parlak mavisini veya gümüş nitrat) ile görünür hale getirildi (bkz. 3.6).

**Tablo 3.1:** 1D-Jel elektroforezi için jel hazırlama

Çözeltiler	Ayrırma jeli (%10 Akrlamid)	Yükleme Jeli (% 5 Akrlamid)
Stok akrilamid çözeltisi (%30 akrilamid, %0.8 bis)	13.3 mL	1.35 mL
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	8.0 mL	-
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	-	1.0 mL
%10 SDS	0.4 mL	0.1 mL
Saf su	18.1 mL	7.5 mL
%10 Amonyum persülfat (APS)(taze hazırlandı)	0.2 mL	0.05 mL
Karışımın havası alındı		
TEMED	14 µL	14 µL
Jel kasetine döküldü		

### 3.5.2. İki Boyutlu (2D-) Jel Elektroforezi

Polen ekstrelerindeki proteinlerin 2 boyutlu analizi Goldman ve diğ. (1980) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirildi. Proteinlerin izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırımını sağlayan birinci boyut ‘Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System’ (Amersham, Bioscience) aleti ile izoelektrik odaklama şeritleri (Immobiline™ DryStrip, GE HealthCare, pH 3-10, 13 cm, linear gradient) kullanılarak gerçekleştirildi. İkinci boyut (SDS-PAGE) için PROTEAN II XL (BIO-RAD) jel elektroforez aleti kullanıldı.

İzoelektrik odaklama işlemine başlamadan önce liyofilize polen ekstrelerindeki olası kontaminantları uzaklaştırmak amacıyla asetonla çöktürme tekniği uygulandı (Wessel ve Flügge, 1984). Bu amaçla, ultra saf su içerisinde çözündürülerek BCA yöntemi ile protein konsantrasyonu saptanan örnekler her bir mikrotüpe 300 µg/200 µL olacak şekilde porsiyonlara ayrıldı. Örneklerin üzerine 800 µL, daha önceden buz üzerinde soğutulmuş %100 aseton eklenip karıştırıldı. Derin dondurucuda (-20 °C) bir gece bekletilen karışımlar santrifüjlendi (15.000xg, 4°C, 10 dakika) (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra üzerine pellet üzerine soğutulmuş %80’lik aseton eklenip tekrar aynı şartlarda santrifüjlendi. Bu işlem üç defa tekrarlandıktan sonra pellet oda sıcaklığında (25 °C) 30 dakika boyunca kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler ultra saf su ile çözündürülerek BCA yöntemi ile (bkz. 3.3) protein konsantrasyonları saptandı.

Aseton çöktürmesi ile elde edilmiş örneklerin 600 µg proteine eşdeğer hacmi, 260 µL 2D rehidrasyon/örnek tamponu (9 M Üre, 60 mM CHAPS, 65 mM DTT, %1 (v/v) GE Healthcare amfolit pH 3-10, %5 (v/v) Orange G) ile karıştırılarak 13 cm'lik seramik şerit tepsisine döküldü. İzoelektrik odaklama şeritleri oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildikten sonra, içerisinde protein örneğin de bulunduğu seramik şerit tepsisinin üzerine, şerit ile örnek arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Şeritlerin üzeri 1 mL mineral yağ ile kaplanarak 30 V'luk akım altında 8 saat boyunca aktif rehidrasyon işlemi ve ardından izoelektrik odaklama işlemi Tablo 3.2'de belirtilen programa göre gerçekleştirildi.

İzoelektrik odaklama işlemi tamamlandıktan sonra, şeritler seramik tepsilere alınıp üzerlerindeki mineral yağdan arındırıldı. Her bir şerit cam tüp içerisinde Dengeleme Tamponu I (6 M Üre, %2.5 SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, %50 Gliserol, 52 mM DTT) ve II (6 M Üre, %2.5 SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, %50 Gliserol, 220 mM İyodoasetamid) ile muamele edildi. Bu amaç için, şeridin içinde bulunduğu cam tüpe 5 mL Dengeleme Tamponu I eklendi ve çalkalayıcıda (30 devir/dakika) 15 dakika çalkalandı. Dengeleme Tamponu I uzaklaştırıldıktan sonra şeritler 10 mL ultra saf su ile çalkalayıcıda 1 dakika boyunca çalkalanıp tamponun iyice uzaklaştırılması sağlandı. Saf su dökülüp şeritlerin üzerine 5 mL Dengeleme Tamponu II eklendi ve çalkalayıcıda (30 devir/dakika) 15 dakika çalkalandı. Dengeleme Tamponu II uzaklaştırılarak, ikinci boyuta (SDS-PAGE) uygulanıncaya kadar 15 mL 1xYürütme Tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) içinde çalkalayıcıda en fazla 30 dakika bekletildi.

Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılacağı ikinci boyut (SDS-PAGE) için %10 akrilamid içeren jeller hazırlandı (Walker, 2002). Dengeleme işlemi tamamlanan şeritler jel kasedi üzerine yerleştirilerek, şeritlerin jele yapışmasını sağlamak amacıyla üzerleri kapatma çözeltisi (0.5 % Agaroz, 25 mM Tris, 192 mM Glisin, 0.1% SDS, Bromofenol mavisi/eser miktarda) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplandı. Agarozun polimerize olması için 5 dakika beklendikten sonra jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1xYürütme Tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) ile dolduruldu. Elektroforez işlemi 30 dakika 60 V'da, ardından ~7 saat 20 mA/jel akım geçecek şekilde 10 °C'de gerçekleştirildi. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset

arasından çıkartıldı ve Bölüm 3.6'da verilen boyama işlemlerine geçildi. Boyanan jeller EXQuest Spot Cutter (BIO-RAD) cihazında tarandı ve analiz edildi.

**Tablo 3.2:** İzoelektrik odaklama programı (50  $\mu$ A/şerit, 20°C)

Basamaklar	Voltaj (V)	Süre/Voltaj modu
1.Basamak	500 V	1 saat/lineer
2.Basamak	1.000 V	2 saat/gradient
3.Basamak	8.000 V	3 saat/gradient
4.Basamak	8.000 V	2.4 saat/lineer

### 3.6. BOYAMA İŞLEMLERİ

#### 3.6.1. Coomassie Boyama

Bu boyama yönteminde, proteinlerin kütle spektrometrik analizleri için uygun olan Imperial Protein Stain™ (Thermo Scientific) boyası kullanıldı. Boyanın kullanım talimatına göre, jel plastik bir kaba alındıktan sonra üzerine ultra saf su eklenerek 5 dakika boyunca çalkalayıcıda (50 devir/dakika) bekletildi. Bu işlem saf su tazelenerek üç kez tekrarlandı. Son yıkama suyu dökülerek jelin bulunduğu kaba boya (Imperial™ Protein Stain Coomassie R-250) konuldu. Jel boya çözeltisinde 2 saat boyunca çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) (50 devir/dakika, oda sıcaklığında) inkübe edildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra fazla boyanın jelden uzaklaştırılması için, jel ultra saf su içine alınıp istenilen saydamlık elde edilene kadar çalkalayıcıda (50 devir/dakika) bekletildi.

#### 3.6.2. Gümüş Boyama

Proteinlerin kütle spektrometrik analizlerine uygun olarak gerçekleştirilen bu boyama yönteminde tüm çözeltiler ultra saf su ile hazırlandı ve jel plastik bir kaba konularak en az 2 saat, en fazla tüm gece boyunca Fiksatifte [%50 (v/v) etanol, %12 (v/v) asetik asit] bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra Jel Yıkama Çözeltisi [%36.5 (v/v) etanol] ile üç defa, 5'er dakika yıkandı. Jel Hassaslaştırma Çözeltisi [%0.02 (w/v) sodyum tiyosülfat] ile 2 dakika muamele edildikten sonra üç defa ultra saf su ile 5'er dakika yıkandı.

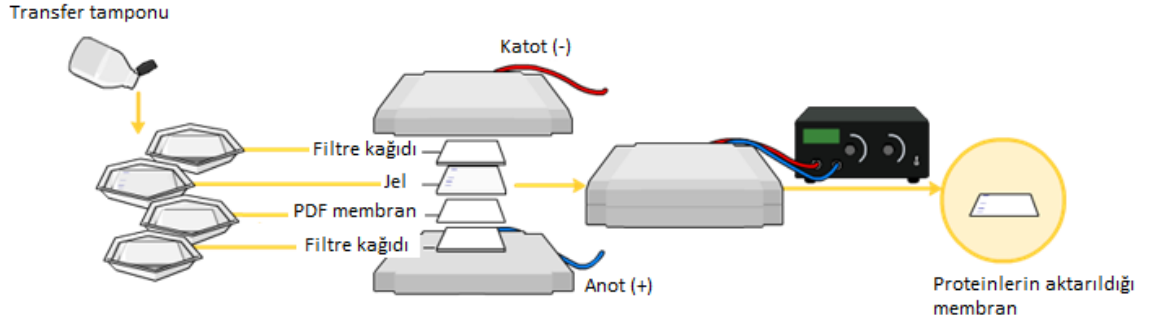
Ardından 20 dakika boyunca soğuk (4 °C) su ile hazırlanmış Boyama Çözeltisi [%0.2 (w/v) gümüş nitrat] ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Jel iki defa ultra saf su ile hızlıca çalkalandıktan sonra Görüntü Oluşturma Çözeltisi [%6 (w/v) sodyum karbonat, %0.01 (v/v) formaldehit, %0.0016 (w/v) sodyum tiyosülfat] ile istenilen yoğunlukta protein spotları gözlenene dek (~10 dakika) inkübe edildi. Protein spotları oluştuktan sonra Görüntü Oluşturma Çözeltisi uzaklaştırılıp reaksiyon oluşumunu durdurmak amacı ile Durdurma Çözeltisi [%50 (v/v) etanol, %12 (v/v) asetik asit] ile 10 dakika muamele edildi (Shevchenko ve diğ., 1996). İşlem sonunda jel %1 asetik asit çözeltisine alınıp spot kesimine kadar 4 °C’de (maksimum 1 hafta) saklandı. Tüm aşamalar çalkalayıcı üzerinde 50 devir/dakika hızda çalkalanarak gerçekleştirildi ve boyanan jeller EXQuest Spot Cutter (BIO-RAD) cihazında tarandı ve analiz edildi.

### 3.7. ELEKTROTRANSFER VE WESTERN BLOTLAMA

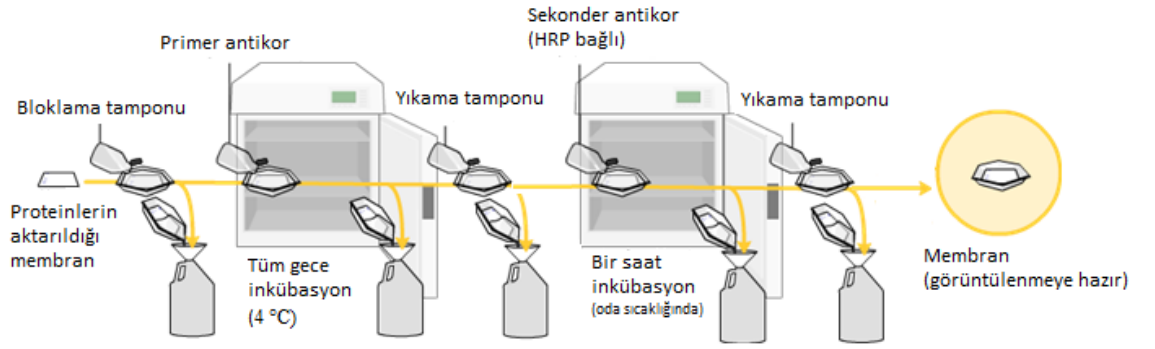
Çalışmanın bu aşamasında 1D-SDS-PAGE ile ayrılan proteinler Yarı Kuru Blotlama Sistemi (Trans-Blot SD, BIO-RAD) ile 2D-GE ile ayrılan proteinler ise Trans-Blot Elektroforetik Transfer Hücresi (Trans-Blot Cell, BIO-RAD) ile poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı.

Proteinlerin transfer edildiği membranlar %0.05 Tween-20 içeren PBS içinde hazırlanmış %5 (w/v) süt tozu ile bir saat bloke edildikten sonra, 1:4 oranında (hasta serumu (IgE):süt tozu) hazırlanan primer antikor ile 4 °C’de, çalkalayıcı üzerinde tüm gece boyunca inkübe edildi. Ardından yıkama solüsyonu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS) ile 15’er dakika üç defa yıkama işlemi uygulandı. Son yıkama işleminden sonra membran 1 saat boyunca, oda sıcaklığında, süt tozu içinde 1:1000 (sekonder antikor:süt tozu) oranında hazırlanmış sekonder antikor [fare anti-insan IgE (Fc)-HRP antikor (SouthernBiotech)] ile muamele edildi. Membranlar tekrar yıkama solüsyonu ile üç defa yıkandıktan sonra, spesifik protein bantları ‘ECL Plus Western Blotting System (Amersham)’ kullanılarak Chemidoc™ XRS+Systems (BIO-RAD) cihazında tarandı ve analiz edildi. Bu çalışmada izlenen strateji Şekil 3.1’de şematik olarak gösterildi.

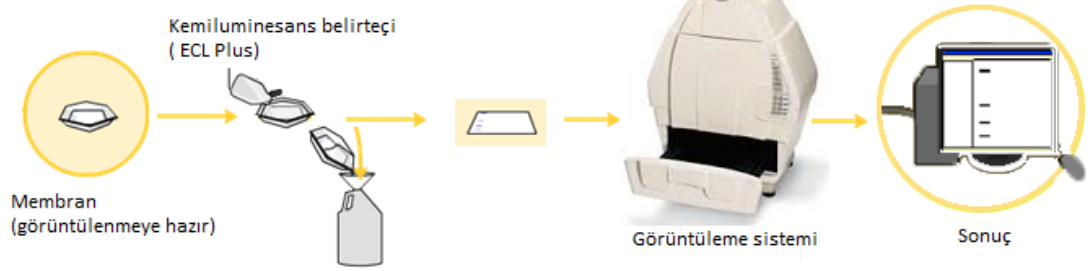
### I. Transfer aşaması



### II. Protein saptama aşaması



### III. Görüntüleme aşaması



**Şekil 3.1:** Western blotlama yönteminin aşamaları (<http://protocolsonline.com/protein-science/western-blotting/>, Ziyaret tarihi: 6 Mayıs 2014)



### 3.8. KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLER

#### 3.8.1. Proteinlerin Tripsinle Kesimi

##### 3.8.1.1. Coomassie Boyama Yöntemi ile Boyanmış 1D-Jelindeki Proteinlerin Tripsinle Kesimi

IgE bağlayan spesifik protein bantları Western Blotlama yöntemi ile saptandıktan sonra 1D-SDS jeldeki karşılıkları tespit edildi. Bu bantlar jelden kesilip küçük parçalara ayrılarak tüplere aktarıldı. İlk aşama olarak, boya ve SDS'i ortamdaki uzaklaştırmak için jel parçacıkları 100 mM amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Ardından  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  çözeltisi uzaklaştırılarak jel üzerine %100 asetonitril (ACN) eklenip 10 dakika bekletildi. Tekrardan  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ile 10 dakika muamele edilip daha sonra asetonitril ile 10 dakika inkübe edildi. Bu dört aşamalı 'boyayı uzaklaştırma' işlemi jelde istenilen berraklık elde edilene kadar tekrarlandı (en fazla 3 defa). Asetonitril uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ağızları açık bir şekilde, 37 °C'de 30 dakika bekletildi.

Redüksiyon ve alkilasyon işlemleri için gel parçacıkları; 3:43 oranında 1 M ditiotritol (DTT): 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  karışımında 1 saat, 37 °C'de bekletildi. Ardından, bu karışım uzaklaştırılıp 135 mM iyodoasetamid (IAA) ile 30 dakika karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi. Redüksiyon ve alkilasyon aşamasından sonra jel parçacıkları sırası ile, 1:1 oranındaki 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ : %100 asetonitril karışımı, %100 asetonitril, 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ve son olarak %100 asetonitril ile 5'er dakika yıkandı. Son aşamadan sonra asetonitril solüsyonu uzaklaştırılıp jeller 37 °C'de 20 dakika kurutuldu. Kuru jel parçacıklarının üzerine 1:7 (v/v) oranında hazırlanmış tripsin (1 µg/10 µL oranında 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  içinde hazırlandı): sürfaktan (%0.01 (w/v) oranında 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  içinde hazırlandı) karışımından 10 µL eklenip 15 dakika buz içerisinde kesim için bekletildi. Kesim işleminden sonra jel üzerindeki tripsin:sürfaktan karışımı uzaklaştırılıp jel parçacıkları 30 µL (w/v) %0.01 sürfaktan ile 2 saat, 37 °C'de çalkalayıcıda muamele edildi. Bu aşamadan sonra örnekler 13.000 devir/dakika (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) hızda 10 saniye döndürülerek üst sıvılar farklı tüplere alındı ve kesim işlemi tamamen durdurmak amacı ile her bir tüpe 0.4 µL trifloroasetik asit (TFA) eklenip karıştırıldı. Örnekler Concentrator plus (Eppendorf)

cihazında 20 dakika kurutulup tuzları uzaklaştırma ve saflaştırma aşamasına kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

### ***3.8.1.2. Gümüş Boyama Yöntemi ile Boyanmış 2D-Jelindeki Proteinlerin Tripsinle Kesimi***

Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jeldeki IgE bağlayan protein spotları kesilerek jel parçaları tüplere aktarıldı. Gümüş nitratin uzaklaştırılması için, jel parçaları iki defa ultra saf su ile yıkandı, ardından boya uzaklaştırma solüsyonu (ultra saf su içinde taze hazırlanmış 30 mM potasyum ferrisiyanür ve 100 mM sodyum tiyosülfat karışımı) eklendi. Jel parçaları berrak hale gelene kadar (~10 dakika) bu solüsyon içerisinde bekletildi. Ardından iki kez ultra saf su ile yıkanıp 37 °C’de, 20 dakika kurutuldu.

Kuru haldeki jel parçaları (redüksiyon ve alkilasyon işlemleri uygulanmadan) sırası ile 1:1 (v/v) oranında 100 mM amonyum bikarbonat:%100 asetonitril karışımı, %100 asetonitril, 100 mM amonyum bikarbonat ve son olarak %100 asetonitril ile 5’er dakika muamele edildi. Ardından 37 °C’de, 20 dakika kurutuldu.

Tripsinle kesim aşamasında 1D-SDS jelden elde edilen örnekler için 1:7 tripsin:sürfaktan oranından farklı olarak 2D-jel spotları için 1:14 oranında tripsin (1 µg/10 µL oranında 50 mM amonyum bikarbonat içinde hazırlandı) ve sürfaktan (%0.01 oranında 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde hazırlandı) karışımı kullanıldı. Bu farklılık haricinde tüm aşamalar yukarıda anlatıldığı gibi olup işlem sonunda örnekler tuzları uzaklaştırma ve saflaştırma aşamasına kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

### **3.8.2. MALDI-TOF/TOF MS Analizi ve Proteinlerin Tanımlanması**

Tripsinle kesim aşaması tamamlanmış kuru örnekler 1% ACN ve 0.1% TFA (trifloroasetik asit) karışımı içerisinde çözündürülüp, C18 mikro kolon Zip-Tip (Millipore) kullanılarak tuzlarından arındırılıp saflaştırıldı. Bu işlemten sonra 0.5 µL peptid karışımı 0.5 µL matriks solüsyonu (α-siyano-4-hidroksisinnamik asit, CHCA) [10 mg/mL CHCA; %70 asetonitril (v/v), %0.1 (v/v) trifloroasetik asit içinde hazırlandı] ile MALDI plağı üzerine yüklenip 30 dakika kurumaya bırakıldı.

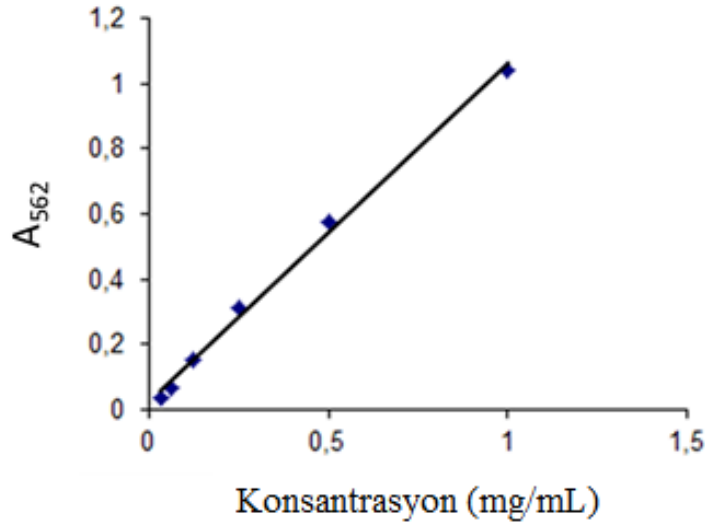
Analizler MALDI-TOF/TOF 4800 ("Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry", Matriks destekli lazer dezorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi/uçuş süresi kütle spektrometresi) (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Peptid kütle aralığı 700-4000 Da olarak ayarlandı. Analiz öncesi Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kullanılarak cihazın kalibrasyonu yapıldı. MS analizinden sonra MS/MS analizleri için, CID ("Collision Induced Dissociation") aktivasyon modu kullanıldı. MS analizi sonucunda elde edilen ilk 30 (S/N>30) iyona MS/MS analizi uygulandı. Prekürsör toleransı 50 ppm, MS/MS fragment toleransı 0.1 Da ve iyon yükü +1 olarak ayarlandı.

MS ve MS/MS analizlerinden elde edilen spektrumlar Protein Pilot 3.0 yazılımı kullanılarak Mascot ve Swissprot veritabanındaki bilgilerle eşleştirildi. Taramalarda modifikasyon olarak; karbamidometilasyon (C modu), deamidated (NQ modu) ve oksidasyon (HW ve M modu) şeklinde değerlendirildi. Peptid karışımının hangi protein olabileceğine dair elde edilen verilerde, sadece istatistiksel olarak önemli skorlar (Mascot protein score) (>70) dikkate alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. POLEN EKSTRELERİ VE PROTEİN KONSANTRASYONU

Polen ekstrelerindeki protein konsantrasyonu Pierce BCA Protein Assay Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak belirlendi. Çalışma süresince hazırlanan ekstrelerin protein konsantrasyonları sığır serum albümin (BSA) standartları (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL) ile çizilen standart grafik yardımı ile saptandı (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1:** Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan standart grafik ( $R^2= 0.9957$ ). Sığır serum albümin (BSA) standartlarının (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL)  $A_{562}$  değerleri kullanılarak çizilmiştir

Çalışmalar sırasında kullanılan polen ekstrelerinin protein konsantrasyonları, 600  $\mu$ L su içerisinde çözündürülen 5 mg *Morus alba* poleni için 4.780 mg/mL olup, aynı hacimdeki su içinde çözündürülen *Cedrus atlantica* örneği için 0.700 mg/mL olarak saptandı. Elde edilen veriler doğrultusunda, çalışılan iki polen örneğinden *Morus alba* türüne ait polenlerin *Cedrus atlantica* polenlerine göre daha yüksek oranda protein içerdiği belirlendi.

## 4.2. KLİNİK TESTLER

Çalışmaya dahil olan alerjik rinit hastalarının ve kontrol bireylerinin polen ekstrelerine karşı deri prik (SPT) ve nazal provokasyon (NPT) testlerinde vermiş oldukları yanıtlar Tablo 4.1’ de gösterildi.

Yapılan testlerde uygulanan polen örneğine karşı semptom (SPT için kızarıklık, NPT için hava akım oranı) belirmesi durumu pozitif reaksiyon olarak tanımlandı. Deri prik testlerinde; deri üzerinde oluşan kızarıklık çapının 3 mm’ den büyük olması durumunda hastalar ‘pozitif= pozitif reaksiyon’ olarak kabul edildi. Alerjenlerin (polenlerin) çözündürüldüğü serum fizyolojiğe dahi yüksek derecede cevap veren hastalar ‘hiperreaktif’ olarak tanımlandı. Nazal provokasyon testlerinde ise uygulanan polen ekstresine karşı nazal direnç gösteren hastalar ‘pozitif=pozitif reaksiyon’ olarak kabul edildi. Örnekler her iki test için de farklı dilüsyonlarda (1/1000, 1/100, 1/10, 1) uygulanıp pozitif reaksiyon saptanan dilüsyon oranları Tablo 4.1’de belirtildi.

Tablo 4.1’de belirtilen sonuçlara göre, ak dut grubu için; 23 hasta içerisinde 20’si SPT veya NPT’den birine karşı pozitif yanıt verdi. 3 hastada (6, 11 ve 22) ise herhangi bir yanıt oluşmadı. Hastalardan bazılarının (7, 8, 12, 13, 17, 21 ve 23) polen örneğine karşı NPT’de hiperreaktif yanıt verdiği saptandı. Kontrol bireylerinden 3’ü (K1, K2, K3) klinik testlerde herhangi bir reaksiyon vermezken 1 birey (K5) NPT’ye pozitif yanıt bir birey (K5) ise NPT’ye hiperreaktif yanıt verdi.

Mavi atlas sediri grubu için ise; 5, 12 ve 16 no.lu hastalar hariç tüm hastalarda SPT ve/veya NPT’e karşı pozitif yanıt alındı. 6 hasta (7, 8, 9, 10, 11 ve 20) polen örneğine karşı NPT’de hiperreaktif yanıt verdi. Kontrol bireylerinden birinde (K3) NPT’ye karşı pozitif yanıt gözlemlendi.

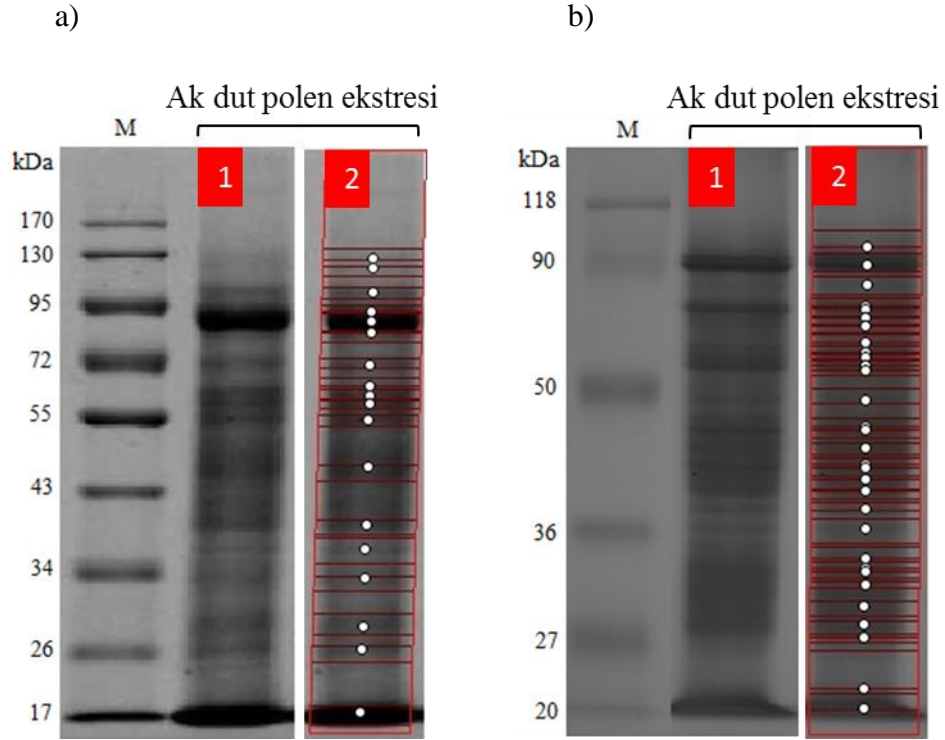
**Tablo 4.1:** Ak dut ve mavi atlas sediri polen ekstraları uygulanmış alerjik rinit hastalarının SPT ve NPT sonuçları (K: kontrol olarak çalışmaya dahil olan sağlıklı bireyler; H: hiperreaktif).

Ak dut polen ekstresi uygulanmış hasta grubu			Mavi atlas sediri polen ekstresi uygulanmış hasta grubu		
Alerjik rinit hastaları	SPT	NPT (dölasyon oranı)	Alerjik rinit hastaları	SPT	NPT (dölasyon oranı)
1	+	+ (1/100)	1	-	+ (1/1000)
2	+	+ (1/10 )	2	+	+ (1/10)
3	+	+ (1/10)	3	+	+ (1/100)
4	+	+ (1/100)	4	+	+ (1/1)
5	+	+ (1/100)	5	-	-
6	-	-	6	+	+ (1/1000)
7	+	+ (H)	7	+	+ (H)
8	-	+ (H)	8	+	+ (H)
9	+	+ (1/10)	9	-	+ (H)
10	-	+ (1/100)	10	-	+ (H)
11	-	-	11	+	+ (H)
12	+	+ (H)	12	-	-
13	-	+ (H)	13	-	+ (1/1000)
14	+	+ (1/100)	14	-	+ (1/10)
15	+	-	15	+	+ (1/10)
16	+	+ (1/1000)	16	-	-
17	-	+ (H)	17	+	-
18	+	+	18	-	+ (1/10)
19	+	-	19	+	+ (1/100)
20	+	+ (1/100)	20	-	+ (H)
21	+	+ (H)	21	-	+ (1/1000)
22	-	-	K1	-	-
23	-	+ (H)	K2	-	-
K1	-	-	K3	-	+
K2	-	-	K4	-	-
K3	-	-	K5	-	-
K4	-	+ (H)			
K5	-	+ (1/100)			

### 4.3. POLEN PROTEİNLERİNİN BİR BOYUTLU (1D-) JEL ELEKTROFOREZİ

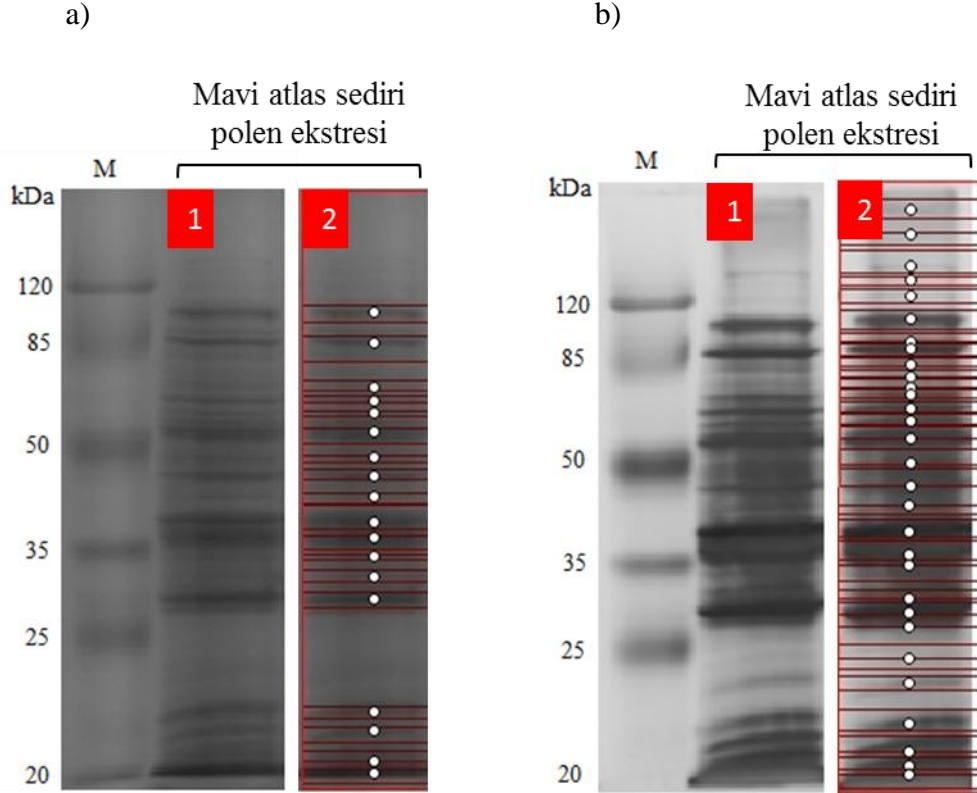
Liyofilize haldeki polen ekstraktları saf su içerisinde çözündürülüp protein konsantrasyonu saptandıktan sonra, her bir kuyucukta 20 µg protein olacak şekilde örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 1D-SDS-PAGE jellerine yüklendi. Proteinlerin ayrıştırılma işlemi tamamlandıktan sonra jel üzerindeki proteinler Coomassie ve gümüş boyama yöntemleri ile görünür hale getirildi.

Ak dut polen proteinlerine ait bant profilleri Şekil 4.2'de, mavi atlas sedirine ait bant profilleri Şekil 4.3'deki gibi gözlemlendi.



**Şekil 4.2:** Ak dut polen proteinlerine ait bant profillerinin gözlemlendiği örnek jeller a) Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü b) Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü (M: Marker; 1: Boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Bantların Gel Analyzer programı kullanılarak kırmızı alan içerisinde, üzerlerinde beyaz noktalarla gösterimi).

Gel Analyzer programı kullanılarak yapılan bant analizi sonucunda ak dut polen ekstresinin ayrıştırıldığı Coomassie boyası ile boyanmış jelde 18 tane bant saptandı (17-134 kDa). Bunların içinde en yoğun bantlar 95 ve 17 kDa'na karşılık gelen bölgelerde izlendi. Aynı örneğin gümüş boyama uygulanmış jelinde ise 31 bant (20-110 kDa) saptandı.



**Şekil 4.3:** Mavi atlas sediri polen proteinlerinin bant profilleri a) Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü b) Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jel görüntüsü (M: Marker; 1: Boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Bantların Gel Analyzer programı kullanılarak kırmızı alan içerisinde, üzerlerinde beyaz noktalarla gösterimi)

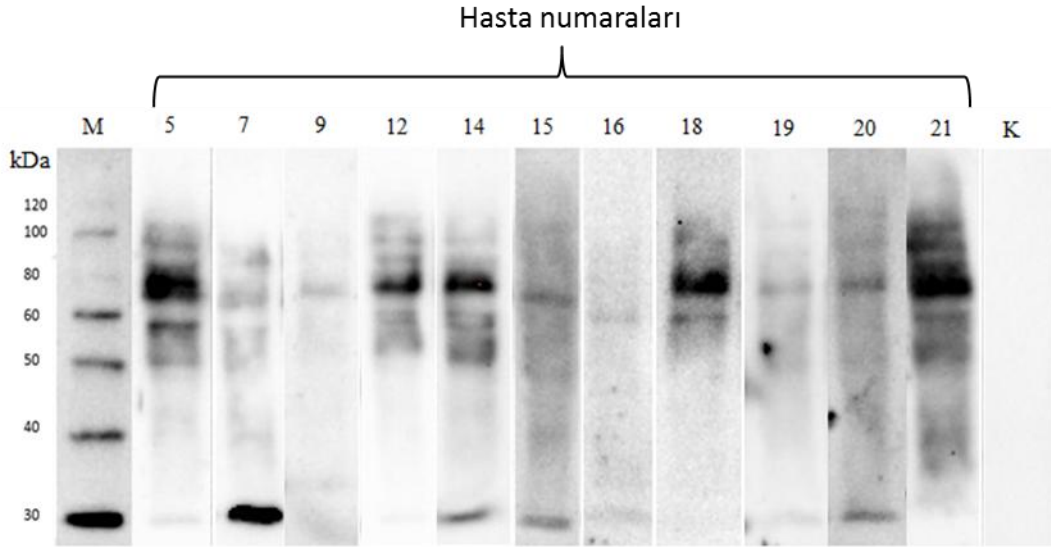
Mavi atlas sediri polen ekstresinin 1D-PAGE'den sonra Coomassie boyama ile 18 bant (20-104 kDa) şeklinde ayrıştığı saptandı. Bu bantlar arasında en yoğun olanlar 104, 86, 54, 44, 36, 34, 28 ve 20 kDa'da gözlemlendi. Bu örneğe ait gümüş boyanmış jelde ise 30 tane bant gözlemlendi. Bu boyama ile molekül ağırlığı >120 kDa olan proteinler de (133, 145, 177, 207 kDa) görüntülendi, ancak marker sınırları dışında kaldığından bu verilerin çok güvenilir olmadığı düşünüldü.



#### 4.4. POLEN PROTEİNLERİNİN BİR BOYUTLU JELDEN MEMBRANA AKTARIMI VE WESTERN BLOT ANALİZİ

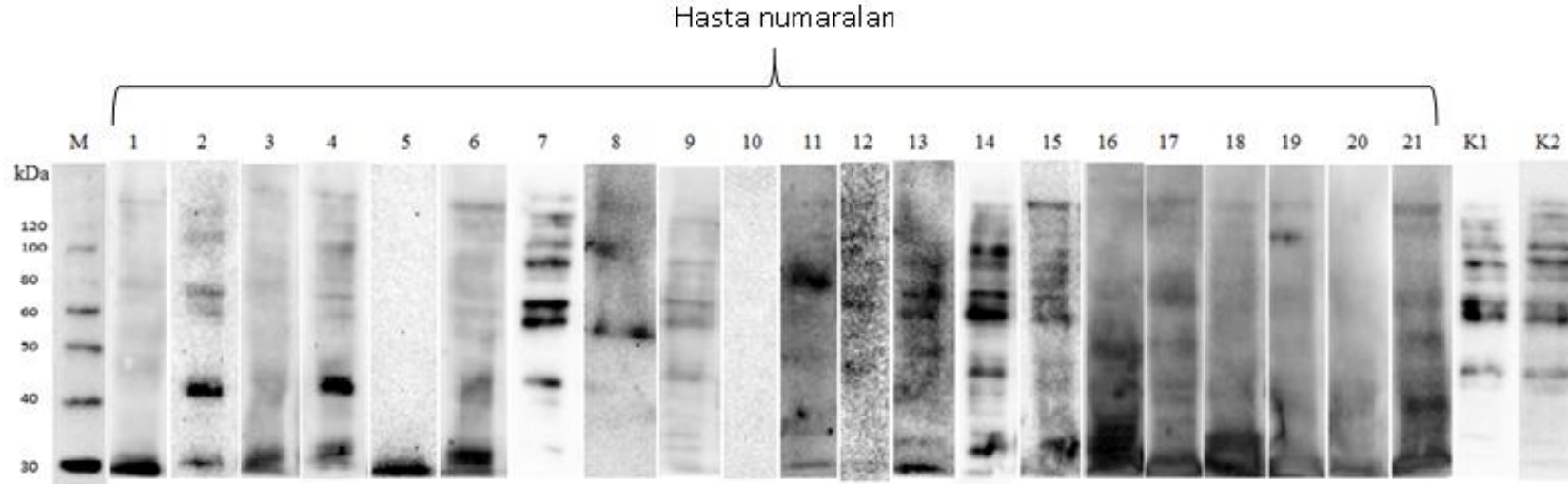
1D-SDS-PAGE ile molekül ağırlığına göre ayrılan polen proteinleri Bölüm 3.7’de anlatılan yöntemle göre PVDF membranlara aktarıldı. Aktarım sonrasında her bir membran hasta serumu veya kontrol olarak kullanılan sağlıklı bireylerden elde edilen serum örneği ile muamele edildi. Uygulanan polen proteinlerine karşı hasta serumlarında spesifik IgE’nin varlığını saptamak amacıyla membranlar sekonder antikorla [fare anti-insan IgE (Fc)-HRP antikor (SouthernBiotech)] muamele edildi. Son olarak spesifik IgE bağlayan protein bantları “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)” kullanılarak Chemidoc™ XRS+Systems (BIO-RAD) cihazında görüntülendi.

Polen ekstresi uygulanmış hastaların serumlarıyla (spesifik IgE içerir) yapılan Western blotlama deneyinin sonuçları ak dut için Şekil 4.4’te, mavi atlas sediri için Şekil 4.5’te verildi.



**Şekil 4.4:** 1D-Jelde ayrılmış ve PVDF membrana aktarılmış ak dut polen proteinlerinin hasta serumlarıyla Western blotlama sonuçları. Hasta serumlarındaki IgE’yi bağlayan ak dut proteinleri HRP-konjuge anti-IgE antikor ile dolaylı olarak işaretlenerek (koyu bantlar) gösterildi ( M: marker; K: kontrol birey).

Ak dut polen ekstraları uygulanmış hasta grubuna ait 23 hasta içerisinden, SPT ve/veya NPT’de pozitif yanıt vermiş 20 hastadan (bkz. Tablo 4.1) 11’inin (5, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20 ve 21. hastalar) serumlarında polen proteinlerine karşı spesifik IgE’nin varlığı Western blotlama yöntemi ile ortaya konuldu. Geriye kalan 9 hastada (1, 2, 3, 4, 8, 10, 13, 17, 23); SPT ve NPT’lerinden birinde pozitif yanıt alınmış olsa bile bu bireylere ait serumlarda ak dut proteinlerine spesifik IgE’nin bulunmadığı saptandı. Deney grubundaki 3 hastada (6, 11 ve 22 no.lu hastalar) klinik bulgu gözlenmedi. Klinik testlerde (-) (K1-3) ve (+) (K4-5) yanıt oluşturan kontrol grubu bireylerin serumlarında spesifik IgE’nin bulunmadığı saptandı. Western blot üzerindeki bantlar incelendiğinde hasta serumlarındaki spesifik IgE’lerin çoğunlukla 50-100 kDa arasındaki ak dut polen proteinlerine bağlandığı ve özellikle 75-80 kDa civarındaki proteinlere karşı daha yoğun bir afinite gösterdiği anlaşıldı. Bazı hastalarda ~30 kDa’luk ak dut proteinine bağlanan IgE varlığı gözlendi. 12 no.lu hastanın Western blot analizi sonuçları göz önünde bulundurularak 82, 79, 68, 56 ve 15 kDa ağırlığına karşılık gelen bantlar 1D-jelden kesilerek tripsinize edildi ve MS analizleri gerçekleştirildi (bkz. Şekil 4.7 a).



**Şekil 4.5:** 1D-Jelde ayrılmış ve PVDF membrana aktarılmış mavi atlas sediri polen proteinlerinin Western blot sonuçları. Hasta serumlarındaki IgE'yi bağlayan mavi atlas seridi proteinleri (koyu bantlar) HRP-konjuge anti-human IgE antikoruna ile dolaylı olarak işaretlenerek gösterildi (M: marker; K1, K2: kontrol bireyleri)(K3-5 bireylerinde de benzer bir profil gözlemlendiğinden bu bireyler şekil içerisinde yer almamaktadır).

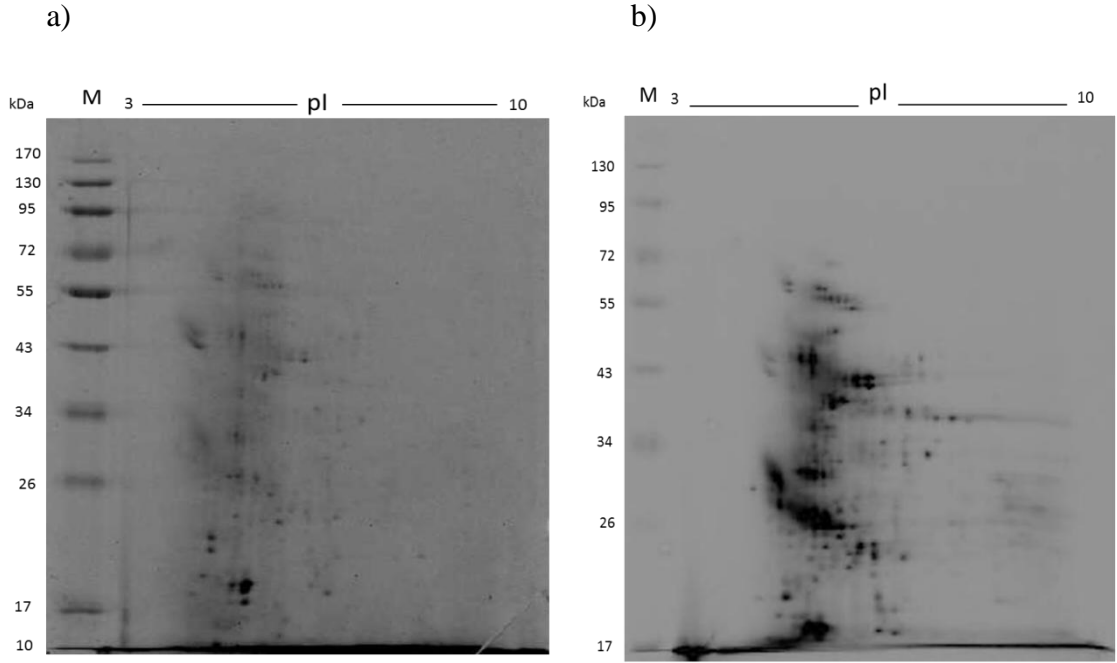
Mavi atlas sediri polen ekstresi uygulanmış 21 hasta ile kontrol bireylerinin Western blot analizleri incelendiğinde; kontrol grubunda 40-130 kDa arasında gözlenen bantların bir kısmı, deney grubundaki hastaların çoğu için de (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 no.lu hastalar) gözlendiğinden non-spesifik bağlanmalar olarak değerlendirildi. 8 ve 10 no.lu hastalar hariç deney grubunda molekül ağırlığı 40 kDa'un altında olan bant(lar) gözlendi. Deney grubundaki 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ve 21 no.lu hastalar için ortak olan 30 kDa civarındaki proteinler, kontrol grubunda belirgin olmadığından potansiyel alerjenlerin bu molekül ağırlığına sahip olabileceği düşünüldü.

#### **4.5. AK DUT POLEN PROTEİNLERİNİN İKİ BOYUTLU (2D-) JEL ELEKTROFOREZİ**

Çalışmanın bu aşamasında, suda çözündürülen ak dut polen proteinlerine asetonla çöktürme tekniği uygulanarak kontaminatlar uzaklaştırıldı. Ardından, proteinler önce izoelektrik noktalarına göre (pH 3-10) odaklandı, daha sonra ikinci boyutta molekül ağırlıklarına göre ayrıldı.

Ayrıştırılan proteinler Coomassie ve gümüş boyama yöntemleri ile görünür hale getirildi. Paralel jeller boyama işlemine tabi tutulmadan Western blotlama yöntemi ile membrana aktarılıp hasta serumları ile muamele edildi.

Coomassie boyama yöntemi ile 10-72 kDa ve pI 5-7 aralığındaki proteinlerden ancak bir kısmı (en az 72 tane) görüntülenirken, gümüş boyama yöntemi daha çok sayıda (en az 150 tane) proteinin görüntülenmesini sağladı. Bu boyama yöntemi ile ak dut polenine ait proteinlerden 10-72 kDa ve pI 5-7 aralığındaki proteinler etkili bir şekilde görüntülenebildi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** a) Coomassie boyama yöntemine göre boyanan 2-D jel b) Gümüş boyama yöntemine göre boyanan 2-D jel (M: marker).

#### 4.6. POLEN PROTEİNLERİNİN İKİ BOYUTLU (2D-) JELDEN MEMBRANA AKTARIMI VE WESTERN BLOT ANALİZİ

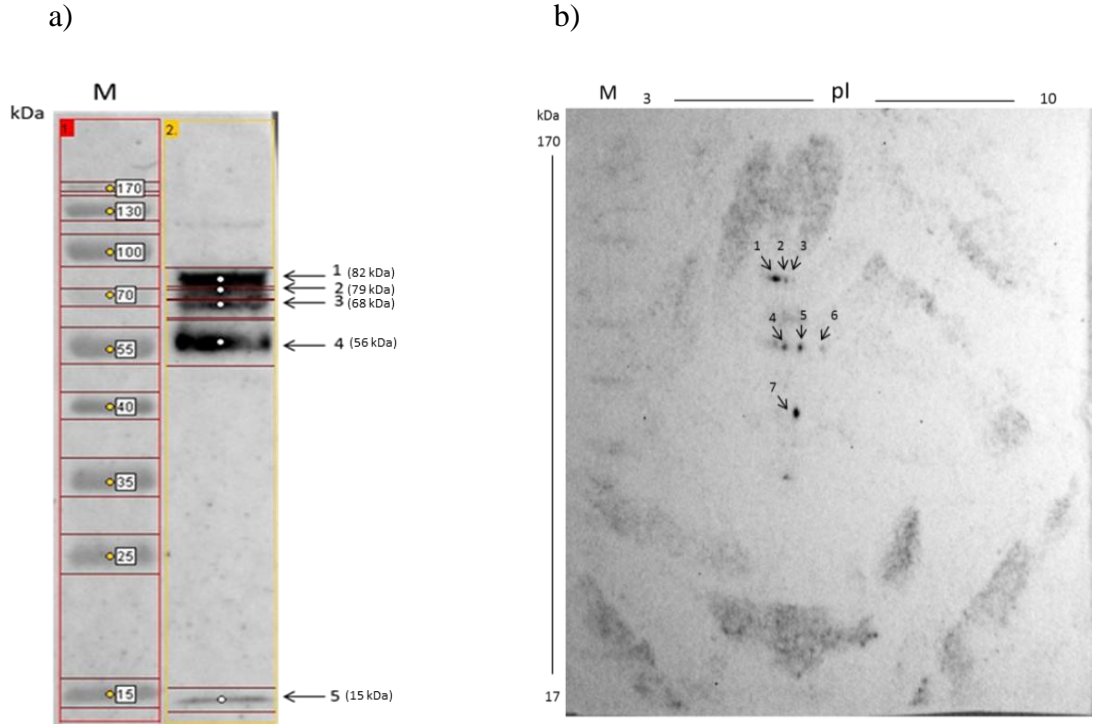
İzoelektrik noktaları ve molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılan ak dut polen proteinler Bölüm 3.7’de anlatılan yönteme göre PVDF membrana aktarılıp 5, 12, 14, 18 ve 21 no.lu hastaların serumu ile muamele edildi. 1D-Western blot analizleri temel alınarak seçilen hasta serumlarından sadece 12 no.lu hasta serumu ile muamele edilen membranda IgE bağlayan proteinler spot şeklinde belirlenebildi (Şekil 4.7b).

2D-Western blot analizi ile 78 kDa, 51 kDa ve 36 kDa civarında 7 protein spotu saptandı. Bu sonuç aynı hastanın 1D-Western blot analizi ile tutarlılık göstermektedir. 2D-Western blotlama ile saptanan spotlara karşılık gelen spotlar gümüş nitrat ile boyanmış jelden kesilerek tripsinize edildi ve MS analizleri gerçekleştirildi.

#### 4.7. KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLER

Ak dut polen proteinlerinin 1D-Western blot ve 2D-Western blot analizlerinden yola çıkarak alerjik protein adayları 1D-jel ve 2D-jelden kesilerek farklı tüplere alındı (Şekil 4.7). Ardından tripsinle kesilip MALDI-TOF/TOF MS Analizleri yapıldı.

Analizler sırasında peptid kütle aralığı 700-4000 Da olarak ayarlandı. MS analizinden sonra MS/MS analizleri için, CID (“Collision Induced Dissociation”) aktivasyon modu kullanıldı. MS ve MS/MS analizlerinden elde edilen spektrumlar Protein Pilot 3.0 yazılımı kullanılarak Mascot ve Swissprot veritabanlarındaki bilgilerle eşleştirildi. Taramalarda modifikasyon olarak; karbomidometilasyon (C), deamidated (NQ) ve oksidasyon (HW ve M) koşulları değerlendirildi. Peptid önerileri için sadece istatistiksel olarak önemli skorlar (“Mascot protein score”) dikkate alındı. 2D-jelden kesilen 7 spot içerisinde sadece 4 tanesinin analizi gerçekleştirilebildi. Geri kalan 3 spot (3, 4, 7 no.lu spotlar) için olası proteinler saptanamadı.



**Şekil 4.7:** MALDI-TOF/TOF MS analizi yapılan protein bantları ve spotlarının Western blot görüntüsü. a) Bant kesimi için referans alınan ve bant numaralandırılması yapılan 1D-Western blotlama membranı b) Spot kesimi için referans alınan ve spot numaralandırılması yapılan 2D-Western blotlama membranı (Bantlar ve spotlar oklarla belirtildi).

MALTI-TOF/TOF MS analizi sonucunda tanımlanan bant ve spotlara ait alerjik protein adayları Tablo 4.2’de verildi.

**Tablo 4.2:** Ak dut polenindeki olası alerjenik proteinler.

Protein bandi/spotu	Protein adı	Giriş adı	Molekül ağırlığı (Da)	Skor	pI	Eşleşme	Dizi benzerliği yüzdesi (%)
Bant 1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	METE_MESRC	85054	297	5.9	35	23
Bant 2	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2	PGMC2_ARATH	63670	50	5.56	25	18
Bant 3	Trypsin	TRYP_PIG	25078	39	7	7	15
Bant 4	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	TMLH_RAT	50106	32	8.66	15	17
Bant 5	Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase	GAUT1_ARATH	77780	55	9.5	55	46
Spot 1	Conotoxin pr6d	CO6D_CONPI	38600	11	4.9	1	15
Spot 2	Probable Fe(2+)-trafficking protein	FETP_PSEA6	10625	34	5.39	2	54
Spot 5	WD repeat-containing protein 74	WDR74_BOVIN	43042	7	8.48	2	1
Spot 6	Cell division protein SepF	SEPF_MYCA9	23796	29	5.24	6	18



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alerjenik proteinlerin tanımlanması, alerji tanısında büyük önem taşır. Son yıllarda alerji tanısında klinik bulguları destekleyen moleküler tekniklerin (radyoimmünanaliz, ELISA, protein mikroçip teknolojisi, rekombinant alerjenler ile moleküler tanı vb.) kullanımına dayalı birçok farklı strateji izlenmektedir (Harwanegg ve diğ., 2003; Sastre, 2010; Shreffler, 2011). Yeni geliştirilen tekniklerin temel hedefi hastalıkla ilişkili molekülleri daha hassas ve hızlı bir şekilde tanımlamak ve böylece teşhiste doğruluğu artırmak ve süreyi kısaltmaktır (Ferrer ve diğ., 2009).

Günümüze dek çok sayıda polenin alerjenitesi araştırılmış ve alerjenik proteinleri tanımlanmıştır. Huş ağacı (*Betula verrucosa*) polenindeki Bet v 1, 2 ve 4 (Menz ve diğ., 1996), zeytin ağacı (*Olea europea*) polenindeki Ole e 1, 2, 7 ve 9 (Cardaba ve diğ., 1998), Japon sediri (*Crytomaria japonica*) polenindeki Cry 1, 2 (Fujimura ve diğ., 2004) ve çınar ağacı (*Platanus acerifolia*) polenindeki Pla 1 ve Pla 2 (Asturias ve diğ., 2006) alerjenik proteinlerin en iyi bilinen örneklerindedir.

Her bir alerjen kaynağı farklı sayıda alerjen içerebilir ve bu alerjenlerin her bir hasta üzerindeki etkisi farklılık gösterebilir. Farklı bitkisel kaynaklardaki (polen, meyve vs.) alerjenik proteinlerin tanımlanmasında proteomik tekniklerin kullanımı giderek artmaktadır (Akagawa ve diğ., 2007). Örneğin, buğday bitkisinde serpin,  $\alpha$ -amilaz inhibitörü,  $\gamma$ -gliadin ve LMW-glutenin gibi alerjen proteinlerin tanımlanmasında 2D-immunoblotlama ve MALDI-TOF MS teknikleri (Sotkovsky ve diğ., 2008), Bermuda çimen polenindeki Cyd d 1 alerjeninin tanımlanmasında 2D-immunoblotlama ve MALDI-MS/MS ya da LC-MS/MS teknikleri (Raftery ve diğ., 2003), pirinç bitkisindeki globülin (52 kDa) ve globülin (63 kDa) alerjenlerinin tanımlanmasında 2D-immunoblotlama ve MALDI-TOF MS/MS teknikleri (Satoh ve diğ., 2011), fındık ağacındaki ait Cor a 9 (11S globülin) alerjeninin tanımlanmasında 2D-immunoblotlama ve amino asit dizileme yöntemleri (Beyer ve diğ., 2002) kullanılarak IgE'ye yüksek afinite gösteren proteinler/alerjenler tanımlanmıştır. Genelde öncelikle alerjen barındıran protein karışımının etkili bir şekilde ayrıştırılmasını sağlayan 1D-PAGE ve

2D-GE teknikleri uygulanır. Daha sonra uygulanan Western blotlama tekniği, alerjenlerin hasta serumundaki spesifik IgE'lerle immünokimyasal reaksiyonunun membran üzerinde saptanmasını sağlar. Son olarak olası alerjenlerin tanımlanması için MS (MALDI-TOF MS, MALDI-TOF MS/MS, LC-MS) teknikleri kullanılır (Nakamura ve Teshima, 2013).

Çalışılan bitkisel materyale bağlı olarak bu teknikler optimize/modifiye edilip olası alerjenler araştırılır. Yeni proteomik tekniklerden olan peptid ligand kütüphanesinin (peptide ligand library) kurulması, protein karışımı içindeki eser miktardaki proteinlerin saptanmasında (Shahali ve diğ., 2012a) ve üçlü-tek boyutlu jel elektroforezi ardından MS, alerjenlerin karboksil modifikasyonlarının saptanmasında (Shahali ve diğ., 2012 b) kullanılır. Düşük moleköl ağırlıklı proteinler asetik asit/üre poliakrilamid jel elektroforezi (AU-PAGE) ile ayrıştırılır (Kitta ve diğ., 2006). Ayrıca bitkilere ait alerjenler genel olarak disülfid bağı içerdiğinden, disülfid bağlarının saptanmasına yönelik yöntemler de geliştirilmektedir (Yano ve Kuroda, 2008; D'Amato ve diğ., 2010).

Bu çalışmada, polen alerjisi ve alerjen proteinlerle ilgili çalışmalar referans alınarak, ak dut (*Morus alba* L.) ve mavi atlas sediri (*Cedrus atlantica*) polenlerinin alerjenik IgE-bağlayan proteinleri araştırılmış ve alerjeniteden sorumlu protein(ler) tanımlanmaya çalışılmıştır.

İlk aşamada İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi kampüsünün (Bahçeköy) bahçesinden toplanan ve aynı Fakülte'nin Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki araştırmacılar tarafından tanımlanan polen örnekleri kullanılarak polen ekstreleri hazırlanmıştır. Polen ekstrelerindeki protein konsantrasyonu *Morus alba* L. için ortalama 4.780 mg/mL, *Cedrus atlantica* için 0.700 mg/mL olarak belirlenmiştir. Buna göre örneklerin protein yüzdesi *Morus alba* L. ve *Cedrus atlantica* için sırasıyla ortalama %95.6 ve ortalama %14 olarak hesaplanmıştır. *Morus alba* polen protein içeriği *Cedrus atlantica*'dan ~7 kat yüksektir. Literatürde bu ağaç polenlerinin protein içeriğine ilişkin bir çalışmaya rastlanmadığından karşılaştırılma yapılamamıştır. Ancak ekstraksiyon yöntemi değiştirildiğinde de benzer oranlar elde edildiğinden *Cedrus atlantica*'daki düşük protein veriminin, kullanılan yöntemden kaynaklanmadığı sonucuna varılmıştır.

Liyofilize haldeki polen proteinleri, konsantrasyonları 5 mg/mL olacak şekilde, serum fizyolojikte çözüldürülüp İstanbul Tıp Fakültesi, Alerji Polikliniği'ndeki uzman hekimler tarafından farklı dilüsyonlarda (1/1000, 1/100, 1/10, 1/1) seyreltilerek hasta ve kontrol grubundaki bireylere iki farklı yolla (deri üzerine ve burundan püskürterek) uygulanmıştır. Hastalar deri prik testinde (SPT) , deri üzerinde oluşan kızarıklık çapı, nazal provokasyon testinde (NPT) nazal direnç ve semptom skorları değerlendirilerek sınıflandırılmıştır. Ayrıca, bu bireylere ait serum örnekleri Western blotlama işleminde antikor (IgE) kaynağı olarak kullanılmış, 1D- ve 2D-elektroforez ile ayrılan polen proteinlerinden hangileriyle bağlandıkları tespit edilmiştir.

Ak dut polen ekstresi uygulanmış hasta grubu için; 23 hasta içerisinde 20'si SPT ve/veya NPT'de pozitif yanıt vermiştir. 3 hastada (6, 11 ve 22) ise herhangi bir klinik yanıt oluşmamıştır. Hastalardan bazılarında (7, 8, 12, 13, 17, 21 ve 23) NPT sırasında hiperreaktivite gözlenmiştir. Kontrol bireylerinden 3'ü (K1, K2, K3) klinik testlere negatif reaksiyon verirken 2 birey (K4 ve K5) için NPT'de pozitif yanıt (K4 hiperreaktif) alınmıştır. Mavi atlas sediri polen ekstresi uygulanmış grup için ise; 5, 12 ve 16 no.lu hastalar hariç tüm hastalarda SPT ve/veya NPT'de pozitif yanıt alınmıştır. 6 hasta (7, 8, 9, 10, 11 ve 20) NPT'de hiperreaktif reaksiyon vermiştir. Kontrol grubunda da bir birey (K3) sadece NPT'de pozitif yanıt verirken diğerlerinde hiçbir alerjik yanıt kaydedilmemiştir. Her iki hasta grubu göz önünde alındığında, hastaların NPT'de pozitif reaksiyon verme oranının SPT'dekine oranla daha yüksek (*Morus alba* için; 18/23, *Cedrus atlantica* için; 17/21) olduğu gözlenmiştir. Böylelikle NPT'nin, hastaların polen örneklerindeki alerjenlere karşı duyarlılığının saptanmasında daha hassas bir yöntem kabul edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Bir sonraki adımda, polen ekstrelerindeki proteinler 1D-PAGE ve 2D-GE ile birbirinden ayrılarak farklı boyama yöntemleri ile görünür hale getirilmiştir. Böylelikle her iki polen örneğine ait protein profili hakkında bilgi edinilmiştir. Ak dut polen proteinlerine ait 1D-jelin Coomassie ve gümüş boyama sonuçlarına bakıldığında, bu polen örneğindeki proteinlerin geniş bir molekül ağırlığı aralığında (17-134 kDa) olduğu anlaşılmaktadır. Gümüş boyama tekniği ile daha hassas bir şekilde boyama sağlanmıştır. Ak dut polenindeki en yoğun olarak bulunan proteinler 95 ve 17 kDa ağırlığındadır. Literatürde ak dut polenin protein profiline ait bilgi bulunmamakla

birlikte, aynı aileye ait *Morus papyrifera* poleninde de 16 kDa'luk proteinler en yoğun fraksiyonu oluşturduğu bulunmuştur (Micheal ve diğ., 2013). Aynı aileden bu iki ağacın da polen protein içeriğinin düşük molekül ağırlığındaki proteinler açısından ortak bir profil sergilediği görülmektedir. Mavi atlas sediri polen proteinleri için de geniş bir protein aralığı (20-207 kDa) söz konusudur. 104 kDa'un üzerindeki proteinler ancak hassasiyeti daha yüksek (133, 145, 177, 207 kDa) olan gümüş boyama yöntemi ile belirlenebilmiştir. Bu türe ait polen protein içeriği hakkında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, bu çalışmada sunulan veriler ilk kayıt olarak kabul edilebilir.

Proteinler ayrıştırılıp moleküler ağırlıkları belirlendikten sonra, 1D-jel üzerinden membrana aktarılarak hasta serumu ile muamele edildiğinde, ak dut ekstresi ile yürütülen deri prik ve nazal provakasyon testlerinden en az birine pozitif yanıt vermiş 20 hastadan sadece 11'inin serumlarında polen proteinlerine karşı spesifik IgE'nin varlığı saptanmıştır. Geriye kalan 9 hasta SPT veya NPT'lerinden birine karşı pozitif yanıt vermiş olmasına rağmen, bu hastaların serumlarında spesifik IgE bulunduğuna ilişkin bir veri elde edilememiştir. Deney grubundaki 3 birey (6, 11, 22 no.lu hastalar) ve kontrol grubundaki 3 birey (K1, K2, K3) için SPT ve NPT'de negatif yanıt alınırken 2 birey (K4, K5) NPT'de pozitif yanıt vermiştir. Bununla birlikte hiçbir kontrol bireylerinde ak dut proteinlerini bağlayan spesifik IgE bulunmamaktadır. Hasta serumlarındaki spesifik IgE'lerin 50-100 kDa arasındaki polen proteinlerine bağlandığı ve özellikle 75-80 kDa arasındaki proteinlere karşı daha yoğun bir afinite gösterdiği anlaşılmaktadır.

Literatürde, farklı kaynaklara ait alerjen çalışmalarında IgE-bağlayan polen proteinlerinin geniş bir molekül ağırlığı aralığında bulunduğu gözlenmektedir (Puc, 2003). Alerji çalışmalarında genelde IgE-bağlayan proteinlerden hastaların çoğunda ortak sonuç veren ve IgE'ye yüksek afinite gösterenler dikkate alınarak alerjen tanımlanmasına gidilmektedir. Bu yaklaşımdan yola çıkarak ak dut polenindeki proteinler arasında potansiyel alerjen adaylarının 75-80 kDa molekül ağırlığında olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca Micheal ve diğ. 2013 tarafından *Morus Papyrifera*'da rapor edilen 16 kDa'luk potansiyel alerjene benzer şekilde, bazı

hastalarda gözlenen 30 kDa'luk bant içinde de alerjenik yapılar olabileceği düşünülmektedir.

Ak dut polen ekstresi ile devam edilen daha ileri proteomik analizlerde polen proteinleri ilk kez bu çalışmada 2D-GE ile incelenmiştir. İzoelektrik noktası 5-7 arasında olan en az 150 protein spotu görüntülenebilmiştir. Bu spotlardan, 7'sine 12 no.lu hasta serumundaki spesifik IgE'lerin bağlandığı belirlenmiştir. Bunlardan bazılarının, 1D-Western blotlamada da gözlenen proteinlerle benzer molekül ağırlığına (78 kDa) sahip olduğu görülmektedir. IgE-bağlayan spot sayısının azlığı 2D-jeldeki total protein konsantrasyonunun çok düşük olmasından ve/veya Western blotlamadaki sınırlamalardan kaynaklanıyor olabilir.

1D-jel üzerindeki 5 bantın (82, 79, 68, 56 ve 15 kDa) ve 2D-Jel üzerindeki 4 spotun (5-7 pI ve 36, 51 ve 78 kDa) MALDI-TOF MS/MS analiz sonuçlarına göre (bkz. Tablo 4.2) Protein Pilot 3.0 yazılımı kullanılarak Mascot ve Swissprot veritabanındaki diğer taksonomilere ait protein peptid dizileri içerisindeki taramalarda sadece 1D-jeldeki bant 1'e (82 kDa) ait olan teorik  $M_w$  verisi (85054Da), pratikle uyumlu çıkmıştır. Mascot skoru 297 olan bu proteinin "5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase" (5-metiltetrahydropterioltriglutamat-homosistein metiltransferaz) olma olasılığı yüksektir. Vitamin B-12 bağımsız metionin sentaz ailesine ait olup metil grubunu 5-metiltetrahidrofolattan homosisteine aktararak metionin oluşumundan sorumlu olan bu protein daha önce hiçbir çalışmada alerjen olarak önerilmemiştir. Diğer bantlara ve spotlara ait tarama sonuçlarında skorlar oldukça düşüktür ve ak dut polenine ait protein veri tabanı mevcut olmadığından teorik  $M_w$  (moleküler ağırlık) verileriyle pratik bulgular uyumlu değildir. DNA ve mRNA dizileri ve farklı algoritmalar kullanarak yeni bir veri tabanı yaratılabilir. Oluşturulan bu yeni veri tabanı yazılım programına yüklenerek tekrar taranma yapılabilir. İzlenebilecek bir diğer yaklaşım ise de novo dizileme yöntemidir. Bu yöntemde örneğe ait peptid dizilerinin amino asit dizisini tek tek analiz edilerek olası protein dizisine ulaşmak mümkündür. Ancak bu, çok geniş kapsamlı ve uzun zaman alacak ayrı bir proje olarak değerlendirilebilir.

Mavi atlas sediri poleni için yapılan 1D+Western blotlama işlemlerinde 21 hastanın dahil olduğu hasta ve kontrol grubundaki 5 sağlıklı bireyin serumunda bu polen proteinlerine bağlanan IgE'lerin bulunduğu. Hasta grubuna ait 1D-Western blotlama

sonuçları ve kontrol grubuna ait sonuçlar karşılaştırıldığında 13 hastanın kontrol grubu ile benzer profil gösterdiği saptandı. 14 hasta ise SPT veya NPT'lerinden birine pozitif yanıt gösterip kontrol grubundan farklı olarak düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerle de  $\leq 30$  kDa reaksiyon verdi.

Mavi atlas sedirine ait 1D-Western blotlama profilinde ak dut örneğinden farklı olarak, sağlıklı bireylerin kan serumlarında da spesifik IgE'lerin saptanması ilginç bir bulgu olarak değerlendirildi. Literatürdeki bilgilere bakıldığında, IgE'nin alerjenik olmayan bazı proteinlere de bağlanarak pozitif reaksiyon verebileceği bilgisine rastlanmıştır (Mari, 2008; Sastre, 2010). Ayrıca hastaların kanında alerjenlerin büyük bir kısmına karşı IgE'ler bulunmasına rağmen klinik semptom oluşmadığı durumlar da rapor edilmiştir (Bousquet ve diğ., 2006). Mavi atlas polen proteinleri için de benzer bir durum söz konusu olabilir.

Bu sonucun değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken bir diğer faktör ise çapraz bağlanma ("cross-reactivity") reaksiyonudur. Bu reaksiyon, bir proteine karşı üretilen antikorların aynı ya da benzer yapıda olan farklı türlerin proteinlerine de bağlanması ile gerçekleşir (Aalberse ve diğ., 2001; Sastre, 2010). Farklı polenlere karşı alerjisi olan bazı alerjik rinit hastalarında mevcut olan IgE'ler, mavi atlas sediri polenindeki proteinlerle çapraz reaksiyon vermiş, bu nedenle de 1D+Western blotlamada pozitif sonuç elde edilmiş olabilir. Literatürde, huş ağacı ile alıç ağacı polen antijenleri arasında; farklı cinslere ait çim polenleri arasında; bazı ağaç polenleri ile bitki ve meyve alerjenleri arasında çapraz reaksiyon gözlemlendiği belirtilmiştir (Puc, 2003). Mavi atlas sediri polen antijenlerinin çapraz reaksiyonları hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bununla birlikte aynı aileye ait *Cedrus deodora* polenine ait alerjenik proteinleri tanımlama çalışmalarında, bu polen örneğinde de geniş bir IgE-bağlayan protein profili saptanmış olup aynı aileye ait diğer ağaç türleri veya farklı ailelere ait ağaç türlerinin polen alerjenleri ile çapraz reaksiyon verdiği düşünülmektedir (Rawat ve diğ., 2000).

Bu polen örneğine ait bulgular değerlendirilirken dikkate alınması gereken bir diğer faktör ise non-spesifik bağlanmalardır. Hasta ve kontrol gruplarındaki IgE'lerle reaksiyon veren protein bantları karşılaştırılıp ortak olanlar non-spesifik bağlanmalar olarak değerlendirilebilir. Sonuçta bu polen örneğindeki proteinler içerisinde  $\leq 30-40$  kDa moleküler ağırlığına sahip proteinler olası potansiyel alerjenler olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak;

1. Ak dut polenin alerjenitesi İstanbul'da yaşayan alerjik hastalar üzerinde klinik testlerle ve alerjenik protein içeriği proteomik analizlerle ortaya konulmuştur.
2. Ak dut polenin, İstanbul'da yaşayan kişiler için de alerjik reaksiyon oluşturma potansiyelinin yüksek olduğu bulunmuştur.
3. Ak dut polenindeki alerjenlerin 75-80 kDa ve  $\leq 30$  kDa (muhtemelen 15-16 kDa) olabileceği sonucuna varılmıştır.
4. İstanbul'da yetişen mavi atlas sediri'nin alerjenitesine dair ilk veriler elde edilmiş ve bu polen örneğinin de literatürde potansiyel alerjen kaynağı olarak öngörülmesi için gerekli bulgular elde edilip farklı bölgelerdeki hastalar üzerinde de etkisinin araştırılması için güçlü deliller ortaya konulmuştur.
5. Mavi atlas sediri polenindeki potansiyel alerjenlerin  $\leq 30$  kDa molekül ağırlığında olduğu bulunmuştur.
6. Bu tezde bundan sonra yürütülecek çalışmalara (denek sayılarının artırılması, ilgili ağaçlar için *de novo* yaklaşım ve farklı MS teknikleriyle protein veribankalarının oluşturulması, glikoprotein analizleri, düşük molekül ağırlıklı alerjenik proteinler için yeni ve etkin saflaştırma/tanımlama stratejilerinin geliştirilmesi, potansiyel alerjenlerin saflaştırılması ve hastalar üzerinde tek tek denenmesi, diğer polenlerle çapraz reaksiyon özelliklerinin araştırılması, alerjen proteinlerin kimyasal yapılarının ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, karbohidrat epitoplarının araştırılması, biyoinformatik araçları kullanarak *in silico* veriler elde edilmesi, ak dut ve mavi atlas sediri polen ekstraktlarının alerji panellerinde yer alacak şekilde optimize edilmesi ve klinik kullanıma sunulması, rekombinant alerjenlerin üretilmesi, mikroçip geliştirilmesi) ışık tutacak önemli verilere ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aalberse, R.C., 2000, Structural biology of allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 228-38.
- Aalberse, R.C., Akkerdaas, J., Van Ree, R., 2001, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens, *Allergy*, 56(6), 478-490.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2007, Temel İmmünoloji, *İstanbul Medikal Yayıncılık*, 1. Baskı, İstanbul, 975-6395-61-3.
- Adkinson, N.F., Bochner, B.S., Burks, A.W., Busse, W.W., Holgate, S.T., Lemanske, R.F., O’Hehir, R.E., 2014, Allergy Principles and Practice, Elsevier Saunders, 1600John F. Kennedy Blvd., Ste. 1800, Philadelphia, USA, ISBN: 978-0-323-08593-9.
- Akagawa, M., Handoyo, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Morita, N., Suyama, K., 2007, Proteomic analysis of wheat flour allergens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6863–6870.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008, The Cell, Garland Science, 270 Madison Avenue, NewYork NY f 0016, USA.
- Arilla, M.C., Ibarrola, I., Garcia, R., Hoz, B., Martinez, A., Asturias, J.A., 2004, Quantification of the major allergen from cypress (*Cupressus arizonica*) pollen, Cup a 1, by monoclonal antibody-based ELISA, *International Archives of Allergy and Immunology*, 134, 10–6.
- Asero, R., 2002, Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to “new” airborne allergens, *Allergy*, 57(11), 1063–1066.
- Asturias, J.A., Gomez-Bayon, N., Eseverri, J.L., Martinez, A., 2003, Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes, *Clinical & Experimental Allergy*, 33, 518–524.
- Asturias, J.A., Ibarrola, I., Amat, P., Tella, R., Malet, A., Cisteró-Bahíma, A., Enrique, E., Malek, T., Martínez, A., 2006, Purified allergens vs. complete extract in the diagnosis of plane tree pollen allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, 36, 1505–1512.
- Baxi, S.N., Phipatanakul, W., 2010, The role of allergen exposure and avoidance in asthma, *Adolescent medicine: state of the art reviews*, 21(1), 57-71.
- Behrent, H., Becker, WM., 2001, Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Current Opinion in Immunology*, 13(6), 709-715.



- Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Grishin, A., Sampson, H.A., 2002, Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, 517–23.
- Bousquet, J., Anto, J.M., Bachert, C., Bousquet, P.J., Colombo, P., Cramer, R., Daëron, M., Fokkens, W., Leynaert, B., Lahoz, C., Maurer, M., Passalacqua, G., Valenta, R., van Hage, M., Van Ree, R., 2006, Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens, *Allergy*, 61, 671–680.
- Broide, D.H., 2001, Molecular and cellular mechanisms of allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(2 Suppl), 65-71.
- Burge, H.A., Rogers, C.A., 2000, Outdoor Allergens, *Environmental Health Perspectives*, 108(suppl 4), 653-659.
- Calabozo, B., Barber, D., Polo, F., 2001, Purification and characterization of the main allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla 1 1, *Clinical & Experimental Allergy*, 31, 322–330.
- Cárdaba, B., Del Pozo, V., Jurado, A., Gallardo, S., Cortegano, I., Arrieta, I., Del Amo, A., Tramón, P., Florido, F., Sastre, J., Palomino, P., Lahoz, C., 1998, Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule, *Clinical & Experimental Allergy*, 28, 413–422.
- Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Marina, A., Alonso, C., Lahoz, C., Colás, C., Lezaun, A., 2003, Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k 1, *Allergy*, 58, 1152–1156.
- Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F., 2007, Nomenclature and structural biology of allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), 414-420.
- Collins, D. S., Unanue, E. R., Harding, C.V., 1991, Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing, *The Journal of Immunology*, 147, 4054-4059.
- Cuvillo, A., Sastre, J., Montoro, J., Jáuregui, I., Dávila, I., Ferrer, M., Bartra, J., Mullol, J., Valero, A., 2009, Allergic conjunctivitis and H1 antihistamines, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, Suppl 1, 11-8.
- D'Amato, A., Bachi, A., Fasoli, E., Boschetti, E., Peltre, G., Sénéchal, H., Sutra, JP., Citterio, A., Righetti, PG., 2010, In-depth exploration of *Hevea brasiliensis* latex proteome and "hidden allergens" via combinatorial peptide ligand libraries, *Journal of Proteomics*, 7;73(7), 1368-1380.
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., van Cauwenberge, P., 2007, Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, 62(9), 976-990.

- Davesgarden, 2010, <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/296650/#b>, [Ziyaret tarihi: 28 kasım 2013].
- Dordal, M.T., Lluch-Bernal, M., Sánchez, M.C., Rondón, C., Navarro, A., Montoro, J., Matheu, V., Ibáñez, M.D., Fernández-Parra, B., Dávila, I., Conde, J., Antón, E., Colás, C., Valero, A., 2011, Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21(1), 1-12.
- Elshal, M.F., McCoy, J.P., 2006, Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA, *Methods*, 38(4), 317-323.
- Erler, A., Hawranek, T., Krückemeier, L., Asam, C., Egger, M., Ferreira, F., Briza, P., 2011, Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins, *Proteomics*, 11(8), 1486-1498.
- Esch, R.E., 2008, Grass pollen allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 21, 107–126.
- Esteve, C., Montealegre, C., Marina, M.L., García, M.C., 2012, Analysis of olive allergens, *Talanta*, 92, 1-14.
- Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., Mari, A., 2004, Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic, *Allergy*, 59(3), 243-267.
- Ferrer, M., Sanz, M.L., Sastre, J., Bartra, J., del Cuvillo, A., Montoro, J., Jáuregui, I., Dávila, I., Mullol, J., Valero, A., 2009, Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19 (Suppl. 1), 19–24.
- Fey, S.F., Larsen, P.M., 2001, 2D or not 2D, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 26-33.
- Fujimura, T., Shigeta, S., Kawamoto, S., Aki, T., Masubuchi, M., Hayashi, T., Yoshizato, K., Ono, K., 2004, Two-dimensional IgE binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens, *International Archives of Allergy and Immunology*, 133, 125–135.
- Gamblin, D. P., Scanlan, E. M., Davis, B. G., 2009, Glycoprotein Synthesis: An Update, *Chemical Reviews*, 109, 1.
- Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., 1968, Clinical Aspects of Immunology, *Blackwell Scientific Publications*, London .
- Gençer, A., Şirin, G., Gül, H., Özgül, U., Determination of the Product Conditions of Pulp and Paper from White Mulberry (*Morus alba* L.) by Kraft Method, 2013, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 15, 1-2.
- Goldman, D., Merrill, C. R., Ebert, M. H., 1980, Two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins, *Clinical Chemistry*, 1317–1322.

- González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F., Dávila, I., 2007, Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases, *Clin Chim Acta*, 385(1-2), 21-7.
- Hamilton, R.G., Adkinson, F.N., 2004, In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2), 213-225.
- Harwanegg, C., Laffer, S., Hiller, R., Mueller, M.W., Kraft, D., Spitzauer, S., Valenta, R., 2003, Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, 33(1), 7-13.
- Herbert, C.A., King, C.M., Ring, P.C., Holgate, S.T., Stewart, G.A., Thompson, P.J., Robinson, C., 1995, Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p 1, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12, 369-378.
- Huby, R.D., Dearman, R.C., Kimber, I., 2000, Why Are Some Proteins Allergens?, *Toxicological Sciences*, 55, 235-246.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., 1967, Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity, *Journal of Immunology*, 99, 1187-98.
- James, T., 2002, Allergy testing, *American Family Physician*, 66, 4.
- Jenerowicz, D., Silny, W., Dańczak-Pazdrowska, A., Polańska, A., Osmola-Mańkowska, A., Olek-Hrab, K., 2012, Environmental factors and allergic diseases, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3), 475-481.
- Kisselgof, A.B., Oettgen, H.C., 1998, The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE, *International Immunology*, 10, 1377-1384.
- Kitta, K., Ohnishi-Kameyama, M., Moriyama, T., Ogawa, T., Kawamoto, S., 2006, Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel, *Analytical Biochemistry*, 351, 290-297.
- Knox, R.B., Suphioglu, C., 1996, Environmental and molecular biology of pollen allergens, *Trends in Plant Science*, 1(5), 156-164.
- Lacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Felice, G.D., Pini, C., Mari, A., 1998, *Juniperus oxycedrus*: A new allergenic pollen from the Cupressaceae family, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(6 Pt 1), 755-761.
- Lawson, V., Lewis-Jones, M.S., Finlay, A.Y., Reid, P., Owens, R.G., 1998, The family impact of childhood atopic dermatitis: the Dermatitis Family Impact Questionnaire, *British Journal of Dermatology*, 138, 107-113.
- Lim, M.Y., Leong, J.L., 2010, Allergic rhinitis: evidence-based practice, *Singapore Medical Journal*, 51(7), 542-550.

- Lucas, J.M., 2010, Microarrays: molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (I), *Allergologia et Immunopathologia (Madr)*, 38(3), 153-161.
- Mari, A., 2008, When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools, *Clinical & Experimental Allergy*, 38(7), 1089-1094.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley R., 2004, The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report, *Allergy*, 59(5), 469-478.
- Menz, G., Dolecek, C., Schönheit-Kenn, U., Ferreira, F., Moser, M., Schneider, T., Suter, M., Boltz-Nitulescu, G., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., 1996, Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen, *Clinical & Experimental Allergy*, 26, 50–60.
- Micheal, S., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Foetisch, K., Minhas, K., Scheurer, S., Ahmed, A., 2013, Immunoglobulin E reactivity and allergenic potency of *Morus papyrifera* (paper mulberry) pollen, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 23(3), 168-75.
- Mohapatra, S.S., Lockey, R.F., Polo, F., 2008, Weed pollen allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 21, 127–139.
- Mohapatra, S.S., Lockey, R.F., Shirley, S., 2005, Immunobiology of grass pollen allergens, *Current Allergy and Asthma Reports*, 5, 381–387.
- Mouritsen, S., Meldal, M., Christiansen-Brams, I., Elsner, H., Werdelin, O., 1994, Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity, *European Journal of Immunology*, 24, 1066-1072.
- Munoz, F.J., Delgado, J., Palma, J.L., Gimenez, M.J., Monteseirin, F.J., Conde, J., 1995, Airborne contact urticaria due to mulberry (*Morus alba*) pollen, *Contact Dermatitis*, 32(1), 61.
- Nakamura, R., Teshima, R., 2013, Proteomics-based allergen analysis in plants, *Journal of Proteomics*, 93, 40-49.
- Navarro, A.M., Orta, J.C., Sánchez, M.C., Delgado, J., Barber, D., Lombardero, M., 1997, Primary sensitization to *Morus alba*, *Allergy*, 52(11), 1144-1145.
- Nečas, M., 2013, Atopy patch testing with airborne allergens, *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 22(2), 39-42.
- O'Connell, E.J., 2004, The burden of atopy and asthma in children, *Allergy*, 78, 7-11.
- Oettgen, H.C., Geha, R.S., 1999, IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections, *Journal of Clinical Investigation*, 104, 829-835.

- Olsson, S., Van Hage-Hamsten, M., Whitley, P., 1998, Contribution of disulphide bonds to antigenicity of Lep d 2. The major allergen of dust mite *Lepidoglyphus destructor*, *Molecular Immunology*, 35, 1017-1023.
- Petersan, A., Schramm, G., Schlaak, M., Becker, W.M., 1998, Post-translation modification influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen, *Clinical & Experimental Allergy*, 28, 315-321.
- Pijut, P.M., 2000, *Cedrus*- The True Cedars, *Journal of Arboriculture*, 26(4).
- Platts-Mills, T.A., Woodfolk, J.A., 2011, Allergens and their role in the allergic immune response, *Immunological Reviews*, 242(1), 51-68.
- Poole, J.A., Matangkasombut, P., Rosenwasser, L.J., 2005, Targeting the IgE molecule in allergic and asthmatic diseases: review of the IgE molecule and clinical efficacy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 376-385.
- Posch, A., Chen, Z., Raulf-Heimsoth, M., Baur, X., 1998, Latex allergens, *Clinical & Experimental Allergy*, 28, 134-140.
- Puc, M., 2003, Characterisation of pollen allergens, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(2), 143-149.
- Rabilloud, T., Lelong, C., 2011, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial, *Journal of Proteomics*, 74(10), 1829-1841.
- Raftery, M.J., Saldanha, R.G., Geczy, C.L., Kumar, R.K., 2003, Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates, *Respiratory Research*, 4, 10.
- Raulf-Heimsoth, M., Rihs, H.P., Rozynek, P., Cremer, R., Gaspar, A., Pires, G., Yeang, H.Y., Arif, S.A., Hamilton, R.G., Sander, I., Lundberg, M., Brüning, T., 2007, Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*), *Clinical & Experimental Allergy*, 37, 1657-1667.
- Rawat, A., Singh, A., Singh, A.B., Gaur, S.N., Kumar, L., Roy, I., Ravindrana, P., 2000, Clinical and immunologic evaluation of *Cedrus deodara* pollen: a new allergen from India, *Allergy*, 55(7), 620-626.
- Reid, E.C., Gamble, J.L., 2009, Aeroallergens, Allergic Disease, and Climate Change: Impacts and Adaptation, *Ecohealth*, 6(3), 458-470.
- Renz, H., Conrad, M., Brand, S., Teich, R., Garn, H., Pfefferle, P.I., 2011, Allergic diseases, gene-environment interactions, *Allergy*, 66 Suppl 95, 10-12.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Salamanca, G., 2007, Emerging pollen allergens, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(1), 1-7.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C., Pounds, J.A., 2003, Fingerprints of global warming on wild animals and plants, *Nature*, 421(6918), 57-60

- Sabban, S., *Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity Fc receptor*, 2011, Thesis (PhD), The University of Sheffield.
- Sastre, J., 2010, Molecular diagnosis in allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, 40(10), 1442-1460.
- Satoh, R., Nakamura, R., Komatsu, A., Oshima, M., Teshima, R., 2011, Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 437-44.
- Shahali, Y., Sutra, J.P., Fasoli, E., D'Amato, A., Righetti, P.G., Futamura, N., Boschetti, E., Sénéchal, H., Poncet, P., 2012 a, Allergomic study of cypress pollen via combinatorial peptide ligand libraries, *Journal of Proteomics*, 77, 101-110.
- Shahali, Y., Sutra, J.P., Haddad, I., Vinh, J., Guilloux, L., Peltre, G., Sénéchal, H., Poncet, P., 2012 b, Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis*, 33(3), 462-469.
- Shakib, F., Schulz, O., Sewell, H., 1998, A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity, *Immunology Today*, 19, 313-316.
- Shaw, P., 2011, *Cedrus atlantica* 'Glauca' - Blue Atlas Cedar, <http://treesofsantacruzcounty.blogspot.com.tr/2011/05/cedrus-atlantica-glauca-blue-atlas.html>, [Ziyaret tarihi: 28 kasım 2013].
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Analytical Chemistry*, 68 (5), 850-858.
- Shreffler, W.G., 2011, Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing, 2011, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), 843-9.
- Singh, B.P., Singh, A.B., Nair, P.K., Gangal, S.V., 1987, Survey of airborne pollen and fungal spores at Dehra Dun, India, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 59(3), 229-234
- Smith, A., Chapman, M.D., 1996, Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2, *Molecular Immunology*, 33, 399-405.
- Sneller, M.R., Hayes, H.D., Pinnas, J.L., 1993, Pollen changes during five decades of urbanization in Tucson, Arizona, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 71(6), 519-524.
- Sotkovský, P., Hubálek, M., Hernychová, L., Novák, P., Havranová, M., Setinová, I., Kitanovicová, A., Fuchs, M., Stulík, J., Tucková, L., 2008, Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients, *Proteomics*, (8), 1677-1691.

- Swoboda, I., Twaroch, T., Valenta, R., Grote, M., 2008, Tree pollen allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 21, 87–105.
- Taketomi, E.A., Sopelete, M.C., de Sousa Moreira, P.F., de Assis Machado Vieira, F., 2006, Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72(4), 562-567.
- Takizawa, H., 2011, Impact of air pollution on allergic disease, *The Korean Journal of Internal Medicine*, 26, 262-273.
- Turner, H., Kinet, J.P., 1999, Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI, *Nature*, 25, B24-30.
- Waldschmidt, T.J., Tygrett, L.T., 1992, The low-affinity IgE receptor (CD23) participates in B cell activation, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 323, 149-156.
- Walker, J.M., 2002, The Protein Protocols Handbook, Second edition, *Humana Pres.*
- Wessel, D., Flügge, U.I., 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, 138(1), 141-3.
- Williams, C.M., Galli, S.J., 2000, The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, 847-859.
- Williams, P., Sewell, W.A., Bunn, C., Pumphrey, R., Read, G., Jolles, S., 2008, Clinical immunology review series: an approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy, *Clinical & Experimental Immunology*, 153(1), 10-18.
- Yamaguchi, M., Lantz, C.S., Oettgen, H.C., Katona, I.M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J.P., Galli, S.J., 1997, IgE enhances mouse mast cell FcεRI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions, *The Journal of Experimental Medicine*, 185, 663-672.
- Yano, H., Kuroda, S., 2008, Introduction of the disulfide proteome: application of a technique for the analysis of plant storage proteins as well as allergens, *Journal of Proteome*, 7, 3071–3079.

**EKLER****EK 1. Etik kurul onay belgesi.**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 918

Tarih : 01.06.2012

Konu : Doç. Dr. Aslı GELİNCİK hk,

Sayın Doç. Dr. Aslı GELİNCİK  
Dahili Tıp Bilimleri İç Hastalıkları Anabilim Dalı  
Alerji Bilim Dalı

İlgi : İç Hastalıkları Anabilim Dalının 25.05.2012 gün ve 2339 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Demirhan ÇETEREİSİ'nin yürüteceği 2012/905-1089 dosya numaralı "İstanbul'daki ak dut (Morus alba L.) ve mavi atlas sediri [Cedrus atlantica (Endl.) Carr.cv. "Gluca" ] polenlerinin alerjenik proteinleri" başlıklı tez çalışması kurumumuzun 31.05.2012 tarihli 10 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.  
Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



### EK 2. Bant 1'in protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	METE_MES CR	85054	297	5,9	35	23

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1	<b>MASHIVGYPR</b>	MGPKRELK <b>FA</b>	<b>LESFWDGKST</b>	AEDLKKVSAD	LR <b>SSIWKQMA</b>
51	<b>DAGIKY</b> IPSN	TFSYYDQVLD	TTAMLGAVPP	RYGWTGGEIE	FDVYFSMARG
101	NASVPAMEMT	KWFDNYHFI	VPELGPEVNF	SYASHK <b>AVLE</b>	<b>YKEAK</b> ALGVD
151	TVPVLVGPVS	YLLLSKQAKG	VDSFDLLSL	LPKILPIYKE	VVAELKEAGA
201	SWIQFDEPLL	VMDLESHKIQ	AFSAAYADLE	STLSGLNVVV	ETYFADVTAE
251	AYKTLISL <b>KG</b>	<b>VTGYGFDLVR</b>	<b>GTK</b> TLDLVKA	EFPSG <b>KYLF</b> A	<b>GVVDGR</b> NIWA
301	NDLAASLATL	EALEGVVGKD	KLVVSTSCSF	LHTAVDLIN	TKLDDEIK <b>SW</b>
351	<b>LAFAAQK</b> VLE	VNALAKALSG	QKDEAFFSAN	AAALASRKSS	PRVTNEAVQK
401	AATALKGS DH	RRATTVSSRL	DAQQKLNLP	ILPTTTIGSF	PQTVELRRVR
451	REYKAKKISE	EEYVKAIKEE	ISKVVK <b>LQEE</b>	<b>LDIDVLVHGE</b>	<b>PERNDM</b> VEYF
501	GEQLSGFAFS	ANGWVQSYGS	RCVKPPIIYG	DVSR <b>PNPMTV</b>	<b>FWSSMAQ</b> SMT
551	<b>AR</b> PMKMLTG	PVTILNWSFV	RNDQPRHETC	YQIALAIKNE	VEDLEK <b>AGIN</b>
601	<b>VIQIDEAALR</b>	EGLPLRK <b>SEH</b>	<b>DFYLKWAVHS</b>	<b>FRITNV</b> GVQD	TTQIH <b>THMCY</b>
651	SNFNDI <b>IHSI</b>	IDMDADVITI	ENSR <b>SDEKLL</b>	<b>SVFRE</b> GVKYG	<b>AGIGP</b> GVYDI
701	<b>HSPR</b> I <b>PTEE</b>	LADRIRKMLA	VLES <b>NVLWVN</b>	PDCGLK <b>TRKY</b>	<b>GEVNP</b> ALS <b>NM</b>
751	<b>VAAAKQLR</b> QE	LASAK			

### EK 3. Bant 2'nin protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2	PGMC2_ARA TH	63670	50	5,56	25	18

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MVSFKVSLVS	TSPIDGQKPG	TSGLRKKVKV	FKQPNYLENF	VQATFNALTT
51	EKVKGATLVV	SGDGRYYSEQ	AIQIIVK <b>MAA</b>	<b>ANGVR</b> RVWVG	QNSLLSTPAV
101	SAIIRERVGA	DGSKATGAFI	LTASHNPGGP	TEDFGIK <b>YNM</b>	<b>ENGGP</b> APESI
151	<b>TDKIYENTKT</b>	<b>IKEYPIAEDL</b>	PRVDISTIGI	TSFEGPEGKF	DVEVFDSADD
201	YVKLMK <b>SIFD</b>	<b>FESIKLLSY</b>	<b>PK</b> FTFCYDAL	HGVAGAYAHR	IFVEELGAPE
251	SLLNCVPKE	DFGGGHPDPN	LTYAK <b>ELVAR</b>	<b>MGLSK</b> TDDAG	GEPPEFGAAA
301	DGDADRNMIL	GKRFFVTPSD	SVAIIAANAV	GAIPYFSSGL	KGVARSMPST
351	AALDVVAKNL	GLKFFVPTG	WKFFGNLMDA	GMCSVCGEES	FTGSDHIRE
401	KDGIWAVLAW	LSILAHK <b>NKE</b>	<b>TLDGNAK</b> LVT	<b>VEDIVRQ</b> HWA	<b>TYGR</b> HYYTRY
451	DYENVDATAA	KELMGLLVKL	QSSLPEVNKI	IKGIHPEVAN	VASADEFEYK
501	DPVDGGSVSKH	<b>QGIRYLFEDG</b>	<b>SR</b> LVFRLSGT	GSEGATIRLY	IEQYEK <b>DASK</b>

551 IGRDSQDALG PLVDVALKLS **KMQEFTGRSS** PTVIT

#### EK 4. Bant 3'ün protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Trypsin	TRYP_PIG	25078	39	7	7	15

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1	FPTDDDDKIV	GGYTCAANSI	PYQVSLNSGS	HFCGGSLINS	QWVVSAAHCY
51	KSRIQVRL <b>LGE</b>	<b>HNIDVLEGNE</b>	<b>QFINAAK</b> IIT	HPNFNGNTLD	NDIMLIKLS
101	PATLNSRV <b>VAT</b>	<b>VSLPR</b> SAAA	GTECLISGWG	NTKSSGSSYP	SLLQCLKAPV
151	LSDSSCKSSY	PGQITGNMIC	VGFLEGGKDS	CQGDSSGGPVV	CNGQLQGIVS
201	WGYGCAQ <b>KNK</b>	<b>PGVYTK</b> VCNY	VNWIQQTIAA	N	

#### EK 5. Bant 4'ün protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	TMLH_RAT	50106	32	8,66	15	17

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1	<b>MWYHKLLHQQ</b>	<b>SRLQ</b> NLMKRG	DIAHGLRLSG	FKSLFPFSLH	WCHTASKSVN
51	CTWHQHEDHL	ELQYASTVMR	FDYVWLR <b>DHC</b>	<b>RSASCYNSK</b> T	HQRSLDTASV
101	DLCIKPK <b>TIR</b>	<b>LDESTLF</b> FTW	<b>PDGHV</b> TRYDL	DWLVKNSYEG	QKQEVIQPRV
151	LWNAKLYQDA	QLPSVDFQGF	LETKEGLKKE	LQNFLLYGIA	FVENVPPTQE
201	HTEKLARRVS	LIRETIYGR <b>M</b>	<b>WYFTSD</b> FSRG	DTAYTKLALD	RHTDTTYFQE
251	PCGIQVFHCL	KHEGTGGRTL	LVDGFYAAQQ	VLQRAPEEFD	LLSQVPLKHE
301	YIENVGQCHN	HMIGVGPILN	IYPWN <b>KELYL</b>	<b>IRYNNY</b> DRAV	INTVPYDVVR
351	<b>RWYAAHR</b> TLT	TELRRPENEL	WVKLKPG <b>KVL</b>	<b>FIDNWR</b> VLHG	RESFTGYRQL
401	CGCYLTRDDV	LNTARILGLH	A		

#### EK 6. Bant 5'in protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase	GAUT1_ARATH	77780	55	9,5	55	46

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MALKRGLSGV	NRIRSGGGGS	RSVLVLLIFF	CVFAPLCFFV	GRGVYIDSSN
51	DYSIVSVK <b>QN</b>	<b>LDWRERLAMQ</b>	<b>SVRSLFSKEI</b>	LDVIATSTAD	LGPLSLDSFK
101	<b>KNNLSASWRG</b>	TGVDPSFRHS	<b>ENPATPDVKS</b>	NNLNEKR <b>DSI</b>	<b>SKDSIHQKVE</b>
151	TPTKIHRRL	REKR <b>REMRAN</b>	<b>ELVQHNDTTI</b>	LKLENAAIER	SKSVDSAVLG
201	KYSIWRR <b>ENE</b>	<b>NDNSDSNIRL</b>	<b>MRDQVIMARV</b>	<b>YSGIAKLNK</b>	<b>NDLLQELQAR</b>
251	LKDSQRVLGE	ATSDADLPRS	AHEKLRAMGQ	VLAK <b>AKMQLY</b>	<b>DCKLVTGKLR</b>
301	<b>AMLQTADQV</b>	<b>RSLKKQSTFL</b>	<b>AQLAAKTIPN</b>	<b>PIHCLSMRLT</b>	<b>IDYLLSPEK</b>
351	<b>RKFPRSENLE</b>	NPNLYHYALF	SDNVLAASVV	VNSTIMNAKD	PSKHVFHLVT
401	DKLNFGAMNM	WFLLNPPG <b>KA</b>	<b>TIHVENVDEF</b>	<b>KWLNSYCPV</b>	<b>LRQLESAAMR</b>
451	<b>EYYFKADHPT</b>	<b>SGSSNLKYRN</b>	<b>PKYLSMLNHL</b>	<b>RFYLPEVYPK</b>	<b>LNKILFLDDD</b>
501	<b>IIVQKDLTPL</b>	<b>WEVNLNGKVN</b>	<b>GAVETCGESF</b>	<b>HRFDKYLNFS</b>	<b>NPHIARNFNP</b>
551	<b>NACGWAYGMN</b>	<b>MFDLKEWKKR</b>	<b>DITGIYHKWQ</b>	<b>NMNENRTLWK</b>	LGTLPPGLIT
601	FYGLTHPLNK	AWHVLGLGYN	PSIDKKDIEN	AAVVHYNGNM	KPWLELAMSK

### EK 7. Spot 1'in protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Conotoxin pr6d	CO6D_CONPI	3860	11	4,9	1	15

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1 YGNFPTCSET GEDCSAMHCC **RSMTCR**NNIC AD

### EK 8. Spot 2'nin protein tanımlama sonucu.

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Probable Fe(2+)-trafficking protein	FETP_PSEA6	10625	34	5,39	2	54

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MSRT**TVFCQHL**      **NKEADGLDFQ**      **LYPGELGK**KI      FDNISKEAWT      EWQKKQTMLI  
 51 NEKK**LNMMEP**      **TARNFLETQM**      **QAYLFEGKEP**      DIEGYVPPKS

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
WD repeat-containing protein 74	WDR74_BOVIN	43042	7	8,48	2	1

### EK 9. Spot 5'in protein tanımla sonucu.

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MAAAAARWNH      VWVGTDTGIL      KGVNLQRKQA      ANFTASGQPR      REEAVSALCW  
 51 GAGGETQILV      GCADGTVKHF      STEEGRFQGG      RQCPGGEGTF      RGLAQVDGTL  
 101 ITCVDSGILR      VWTDKDKEAS      SDPVLELRVG      PGVCRMQRDP      ARPHIVATGG  
 151 KENALKVWDL      QGSEEPFRA      KNVRNDWLDL      RVPVWDQDIQ      FLPESQKLVT  
 201 CTGYHQVRVY      DPASPQRRPV      LEATYGEYPL      TAVTLTPEGN      SVIVGNTHGQ  
 251 LAEIDLRFQGR      LLGCLKGLAG      SVRGLQCHPS      KPLLASCGLD      RVLRIHRIRN  
 301 PRGLEHKVYL      KSQLNCLLLS      GRDNWEDEPQ      EPQEPNKVPS      EDTETDELWA  
 351 SLEAAAKRKL      PDWEQTQGAL      QARRRKKKR**P**      **GSTSS**

Protein name	Accession number	Mass	Score	pI	Matches	Protein sequence coverage (%)
Cell division protein SepF	SEPF_MYCA9	23796	29	5,24	6	18

### EK 10. Spot 6'nın protein tanımlama sonucu.

Protein sequence coverage:

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MSTLHKVKAY      FGMAPMDDYD      DEYYDDVDAP      APR**RAPVEDR**      **RYPRRGERFA**  
 51 DDAEYGYDEP      GYRAGGPAGY      ADEDRFVSRH      APSREFDRPA      PRLGSLRGSA  
 101 PTRGALAMDP      RR**AAIFDEGS**      **PLSK**ITTLRP      KDYSEARTIG      ER**FRDGTPIV**I  
 151 **MDLVSMDNAD**      **AKRVVDFAAG**      LAFALRGSFD      KVATKVFLLS      PADIDVSAEE  
 201 RRRIAESGFY      SYQ

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Demirkan ÇETEREİSİ
Uyruğu	KKTC
Doğum tarihi, Yeri	1987, Kıbrıs
E-mail	demircete@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Kurum / Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2014
Yüksek Lisans	Université Joseph Fourier/ Universitat de Barcelona, Molecular Biotechnology Track, Erasmus Mundus Master Course Biohealth Computing	2013
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2009
Lise	20 Temmuz Fen Lisesi	2004

### Makaleler / Bildiriler

Demirkan Çetereisi, Suna Büyüköztürk, Aslı Gelincik, , Evren Önay Uçar, Murat Pekmez, Nurgül Karlıoğlu, Mustafa Demirtürk, Derya Erdoğan, Belkıs Ertek, Ünal Akkemik, Bahattin Colakoglu, Michel Seve, Sandrine Bourgoïn, Sylvie Michelland, Nazlı Arda, 2014, Allergenicity of White Mulberry ( <i>Morus alba</i> L.) Pollen and Proteomic Study on Allergenic Proteins, International Workshop on MS-Based Proteomics Bioinformatics and Health Informatics.
--

Suna Büyüköztürk, Aslı Gelincik, Nurgül Karlıoğlu, Evren Önay Uçar, Gaye Erten, Mustafa Demirtürk, Demirhan Çetereisi, Derya Erdoğan, Belkıs Ertek, Nilgün Akdeniz, Ünal Akkemik, Gunnur Deniz, Bahattin Colakoglu, Nazlı Arda, 2012, *Morus alba* is possibly an important allergen in tree pollen allergic rhinitis patients, XIX. International Allergy and Clinic Immunology Congress.