

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Q HUMMASI HASTALIĞINA KARŞI TANI KİTİ OLUŞTURMA AMACIYLA  
LİPOPOLİSAKKARİT-BSA KONJUGATLARININ OLUŞTURULMASI VE  
YAPILARININ İNCELENMESİ**

**MUHAMMED YUSUF KANDUR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. ZEYNEP AKDESTE**

**İSTANBUL, 2016**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Q HUMMASI HASTALIĞINA KARŞI TANI KİTİ OLUŞTURULMASI AMACIYLA  
LİPOPOLİSAKKARİT-BSA KONJUGATLARININ OLUŞTURULMASI VE  
YAPILARININ İNCELENMESİ**

Muhammed Yusuf KANDUR tarafından hazırlanan tez çalışması 30.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

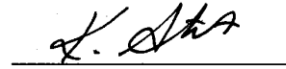
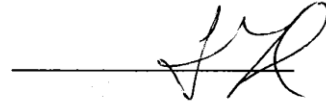
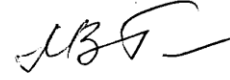
Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY  
İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi





Bu alışma, TÜBİTAK 2211 Yurt içi Lisansüstü Burs Programı ve TÜBİTAK 113Z938 numaralı “Development of Lipopolysaccharide-Biopolymer Complex and Conjugates Against Q Fever For Application Purpose of Vaccine Prototype and Diagnostic Kit” projesi tarafından desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Tezimin konusunu belirlemede yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE'ye, yazımı aşamasında fazlasıyla yardımcı olmuş olan Pelin PELİT, Tayfun ACAR, Elif YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Mesut KARAHAN'a; tezim için gerekli olan Lipopolisakkaritin izolasyonunu gerçekleştirmiş Slovakya Bilim Akademisi üyeleri Mgr. Dr. Marco Quevedo DÍAZ, MVDr. Frantisek CSÍCSAY'e, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e ve tüm Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Prof. Dr. Mamed Mustafaev AKDESTE Biyopolimer ve Aşılar Laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim.

Kasım, 2016

Muhammed Yusuf KANDUR

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiv
<b>BÖLÜM 1</b>	
<b>GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
<b>BÖLÜM 2</b>	
<b>LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1 Q Humması .....	3
2.2 Bağışıklık Sistemi.....	5
2.3 Sentetik Aşılar .....	7
2.4 Polielektrolitler .....	8
2.5 Tanı Kitleri.....	9
2.6 Proteinler .....	11
2.7 Bovin Serum Albümin .....	12
2.8 Human Serum Albumin .....	13
2.9 Dekstran.....	14
2.10 Çapraz Bağlayıcılar .....	15
2.11 Konjugasyon Reaksiyonları .....	19
<b>BÖLÜM 3</b>	
<b>KULLANILAN MALZEMELER.....</b>	<b>22</b>
3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	22
3.2 Deneysel Çalışmada Kullanılan Çözeltiler .....	23
3.2.1 Asetat Tamponu (pH=5.0) .....	23
3.2.2 PBS Tamponu ( pH=5.0/7.0) .....	23
3.3 Deneysel Çalışmada Kullanılan Ölçüm Yöntemleri.....	23
3.3.1 Fourier Transform Infrared (FTIR).....	23
3.3.2 Moleküler Eleme Kromatografisi (Gel Permeation Chromatography (GPC)) .....	24
3.3.3 Zeta Potansiyel Ve Boyut Ölçümleri.....	25

3.3.4	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- Enzime Bağlanan İmmünoemici Analiz) .....	26	
3.4	Konjugasyon .....	28	
<b>BÖLÜM 4</b>			
<b>DENEYSEL KISIM.....</b>			29
4.1	P(VP-co-AA) Sentezi .....	29	
4.2	Kompleks Oluşumları .....	30	
4.3	Konjugat Reaksiyonları .....	31	
<b>BÖLÜM 5</b>			
<b>ANALİZ SONUÇLARI .....</b>			33
5.1	P(VP-co-AA) Polimerinin Karakterizasyonu .....	33	
5.1.1	GPC Analizleri .....	34	
5.1.2	FTIR Analizleri .....	35	
5.1.3	Zetasizer Analizleri .....	37	
5.2	Dekstran Aldehit Türevinin Oluşturulması .....	38	
5.2.1	FTIR Analizleri .....	39	
5.3	HSA-P(VP-co-AA) KONJUGATLARININ ANALİZLERİ .....	40	
5.3.1	GPC Analizleri .....	41	
5.4	LPS-BSA Konjugatlarının Analizi .....	43	
5.4.1	FTIR Analizi .....	43	
5.4.2	Zeta Ölçümleri .....	44	
5.4.3	GPC Analizi .....	50	
5.4.4	ELISA Analiz Sonuçları .....	51	
5.5	HSA-P(VP-co-AA) Komplekslerinin Analizleri .....	55	
<b>BÖLÜM 6</b>			
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>			56
6.1	P(VP-co-AA) Sentez Ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma .....	58	
6.2	Dekstran Aldehitine Ait Tartışma .....	58	
6.3	P(VP-co-AA) Biyomolekül Konjugasyonuna Ait Tartışma .....	59	
6.4	LPS-BSA Konjugasyonuna Ait Tartışma .....	59	
6.5	HSA-P(VP-co-AA) Komplekslerine Ait Tartışma .....	60	
<b>KAYNAKLAR .....</b>			60

## SİMGE LİSTESİ

---

A°	Angström (10 <sup>-10</sup> metre)
c	Konsantrasyon (mg/ml)
C	Karbon
Da/kDa	Dalton/kilo Dalton
f(ka)	Henry fonksiyonu
H	Hidrojen
k	Boltzman sabiti
mM	Mili molar
M <sub>w</sub>	Moleküler ağırlık (Da)
N	Azot
n	Mol sayısı
O	Oksijen
S	Kükürt
T	Mutlak sıcaklık
U <sub>E</sub>	Elektroforetik hareketlilik
E	Ortamın dielektrik sabiti
H	Çözücü viskozitesi
η	Ortamın vizkositesi

## KISALTMA LİSTESİ

---

ABD	Amerika Birleşik Devleti
Arg	Arjinin
Asp	Aspartik Asit
BSA	Bovin Serum Albümin
<i>C.burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
EDC/EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzime Bağlanan İmmünoemici Analiz)
FTIR	Fourier Transform Infrared
Glu	Glutamik Asit
GPC	Gel Permeation Chromatography (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)/ SEC= Size Exclusion Chromatography= Boyut Ayırma Kromatografisi
<i>H.influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
His	Histamin
HSA	Human Serum Albümin
IFA	Immunofluoresence Assay
LPS	Lipopolisakkarit
Lys	Lizin
MT	Montana
NIH	National Institute of Health (Ulusal Sağlık Enstitüsü)
NPV	Negative Predictive Value (Negatif Öngörü Değeri)
P(VP-co-AA)	Poli-N-vinil-2-prolidon-ko-Akrilik-Asit
PAA	Poliakrilikasid
PBS	Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymer Chain Reaction)
PPV	Positive Predictive Value (Pozitif Öngörü Değeri)
PVP	Poli-N-vinil-2-prolidon
Q Humması	Query Humması



## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	<i>Coxiella burnetii</i> organizması(Rocky Mountain Laboratories, NIH, MT, ABD) ..... 5
Şekil 2.2	Bir amino asidin şematik gösterimi..... 11
Şekil 2.3	BSA proteinin aktif bölgelerine göre renklendirilmiş şekli [20] ..... 13
Şekil 2.4	HSA proteinin aktif bölgelerine göre renklendirilmiş şekli [21] ..... 14
Şekil 2.5	Dekstran polimerinin monomeri [23] ..... 15
Şekil 2.6	EDC çapraz bağlayıcısının şematik gösterimi ..... 19
Şekil 2.7	EDC çapraz bağlayıcısı ile gerçekleşen konjugasyon reaksiyonunun şematik gösterimi ..... 19
Şekil 2.8	Hidroksil grubu bulunan polimer ile proteinlerin aminoasitleri arasında kurulan konjugasyon reaksiyonun şematik gösterimi [16] ..... 21
Şekil 3.1	Negatif yüklü parçacığın Zeta potansiyeli [25] ..... 26
Şekil 3.2	Farklı ELISA metotlarının çalışma prensipleri [30] ..... 28
Şekil 4.1	Termal polimerizasyon yönteminin şematik gösterimi [25] ..... 30
Şekil 4.2	N-vinil pirolidon akrilik asit kopolimerinin [P(VP-co-AA )] sentez şematiği. 30
Şekil 4.3	Tez süresince gerçekleştirilen konjugasyon aşamaları ..... 32
Şekil 5.1	Poli (N-Vinil-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen Kırılma İndisi Kromatogramı ..... 34
Şekil 5.2	Poli (N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen Işık Saçılması Kromatogramı ..... 34
Şekil 5.3	Poli(N-Vinil-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen veriler doğrultusunda Molekül Ağırlığı Tayini ..... 35
Şekil 5.4	Akrilik Asidin FT-IR spektrumu ..... 36
Şekil 5.5	Vinil Pirolidonun FT-IR spektrumu ..... 36
Şekil 5.6	P(VP-co-AA) Polimerinin FT-IR spektrumu ..... 37
Şekil 5.7	P(VP-co-AA) kopolimerine ait boyut analizi (şiddet) ..... 38
Şekil 5.8	Dekstranın 2mM, 5 mM ve 10mM NaIO <sub>4</sub> ile oksidasyonunun dekstran ile kıyaslamalı FTIR analizi ..... 39
Şekil 5.9	Dekstranın 500 mM ve 1 M NaIO <sub>4</sub> ile oksidasyonunun dekstran ile kıyaslamalı FTIR analizi ..... 40
Şekil 5.10	Saf HSA ve P(VP-co-AA) 'nın GPC analizi (UV) ..... 41
Şekil 5.11	HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$ ve 2 oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (Kırılma İndisi) ..... 41

Şekil 5.12	HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$ ve 2 oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (Işık Saçılması) .....	42
Şekil 5.13	HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$ ve 2 oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (UV) .....	42
Şekil 5.14	Elde edilen konjugatın FT-IR spektrumu .....	43
Şekil 5.15	BSA proteininin boyutlarının grafik olarak gösterimi .....	44
Şekil 5.16	LPS biyomolekülünün boyutlarının grafik olarak gösterimi.....	46
Şekil 5.17	LPS-BSA konjugatlarının boyutlarının grafik olarak gösterimi .....	47
Şekil 5.18	LPS, BSA ve bu iki molekülün konjugatlarının GPC analizleri (UV).....	49
Şekil 5.19	LPS, BSA ve bu iki molekülün konjugatlarının GPC analizleri (RALS) .....	50
Şekil 5.20	Seçilen numunelerin absorban değerlerinin grafik gösterimi.....	52
Şekil 5.21	Seçilen numunelerin absorban değerlerinin grafik gösterimi.....	54
Şekil 5.22	0.5, 1, 3, 5, 7 oranlarında oluşturulan komplekslerin, HSA ve P(VP-co-AA) moleküllerinin Işık Saçılması Kromatogramı.....	55
Şekil 5.23	0.5, 1, 3, 5, 7 oranlarında oluşturulan komplekslerin, HSA ve P(VP-co-AA) moleküllerinin Kırılma İndisi Kromatogramı .....	55

## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 5. 1	BSA proteininin yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri ..... 45
Çizelge 5. 2	Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri..... 45
Çizelge 5. 3	LPS biyomolekülünün yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri ..... 46
Çizelge 5. 4	Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri..... 47
Çizelge 5. 5	LPS-BSA konjugatlarının yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri . 48
Çizelge 5. 6	Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri..... 48
Çizelge 5. 7	BSA proteinin Zeta Potansiyel Değerleri..... 48
Çizelge 5. 8	Konjugatın Zeta Potansiyel Değerleri ..... 49
Çizelge 5. 9	Seçilen farelerden alınan kan örneklerinin ELISA analiz sonuçları ..... 50
Çizelge 5. 10	Seçilen farklı farelerden alınan kan örneklerinin ELISA analiz sonuçları . 53

**Q HUMMASI HASTALIĞINA KARŞI TANI KİTİ OLUŞTURULMASI AMACIYLA  
LİPOPOLİSAKKARİT-BSA KONJUGATLARININ OLUŞTURULMASI VE  
YAPILARININ İNCELENMESİ**

Muhammed Yusuf KANDUR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Bu çalışmada *Coxiella burnetii* patojeninin sebep olduğu Q Humması hastalığı için basit, otomasyonu mümkün olan ve ucuz bir tanı kiti yapılma amacıyla yeni ELISA plate kaplamaları elde edilmeye çalışılmıştır. Günümüzde bu hastalığın tespiti hastalığından şüphelenilen canlılardan alınan numunelerle patojenin genomunun aranmasıyla yapılmaktadır. Bu tanı kitini oluşturmak için patojenden izole edilen Lipopolisakkarit (LPS) biyomolekülü Bovin Serum Albümin (BSA) proteini ile konjuge edilmiştir.

Konjugasyon reaksiyonları 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu çapraz bağlayıcı karboksil grupların amino gruplarına bağlanmasında kullanılır. Hidroksil grubu barındıran biyomoleküllerde karboksil grubu oluşturmak için biyomolekül sodyum periyodat ( $\text{NaIO}_4$ ) ile tepkimeye sokulmuştur. Biyomolekül ile protein için ideal konjugasyon oranlarının bulunması amacıyla ilk önce BSA proteini Dekstran biyopolimeri ile konjuge edilmiştir.

Konjugasyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirildikten sonra konjugatların ELISA platelerine bağlanmaları sağlanmıştır. LPS ile aşılardan farelerden alınan kan serumları bu ELISA platelerine doldurulup üretilen antikor miktarı tayinini yapılmıştır. LPS molekülü kendi başına bu platelere bağlanabiliyor olsa da BSA proteinde bulunan yan zincir grupları molekülün daha iyi bağlanıp yıkama işlemleri sırasında ortamdaki

uzaklaşmamasını sağlar. Oldukça spesifik olan antikor-antijen ilişkisinden ve kullanılan indirek ELISA yönteminden dolayı konjugat ile yapılan antikor tayininin sadece LPS kullanılarak yapılan tayine göre daha etkili olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Q Humması, *C.burnetii*, konjugasyon, tanı kiti, sentetik aşı, EDC, ELISA



---

**FORMATION AND STRUCTURAL INVESTIGATION OF  
LIPOPOLYSACCHARIDE-BSA CONJUGATES TO MAKE A DIAGNOSTIC KIT  
FOR Q FEVER DISEASE**

Muhammed Yusuf KANDUR

Department Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Zeynep AKDESTE

In this study new ELISA plate coatings in order to obtain a simple, automatable and cheap diagnostic kit for Q fever caused by *Coxiella burnetii* pathogen was aimed. The current method for diagnosing this disease is to look for the genome of the pathogen on samples obtained from suspected organisms. In order to make the diagnostic kit, isolated Lipopolysaccharide (LPS) from the pathogen was conjugated with Bovin Serum Albumin (BSA).

Conjugation reactions took place in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) cross binder. This cross binder is used to bind amino groups with carboxyl groups. Biopolymer containing hydroxide groups was reacted with sodium periodate ( $\text{NaIO}_4$ ) in order to form carboxyl groups. BSA protein was conjugated with Dextran biopolymer initially in order to determine the ideal conjugation ratio.

After conjugation and purification procedures were completed, the conjugates were bound to ELISA plates. Blood sera obtained from mice vaccinated with LPS were placed in ELISA plates for antibody diagnosis. LPS molecule can weakly bind to ELISA plates on its own but side chains located on BSA protein allows the molecule to bind to the plate strongly and keeps the molecule from washing out during washing procedures. It was seen that antibody diagnosis done with the conjugate was better compared to

diagnosis done with LPS due to highly specific antibody-antigen interaction and Indirect ELISA methodology used in this thesis.

**Keywords:** Q Fever, *C.burnetii*, conjugation, diagnostic kit, synthetic vaccine, EDC, ELISA



#### 1.1 Literatür Özeti

Q Humması olarak bilinen zoonotik hastalık Dünya üzerinde her yerde bulunabilen Gram negatif *Coxiella burnetii* patojeninden kaynaklanır. Özellikle çiftlik hayvanları arasında temas ve vektör aracılığıyla hızlıca yayılabilen bu hastalık zatüreden deri döküntülerine endokarditten kalp enfeksiyonlarına farklı semptomlar gösterebilir. Bu hastalığın yaygın olarak görülen ve çiftçi ekonomisine zarar veren semptomlar düşük yapma ve ölü doğuma sebep olmasıdır. Ülkemizde yaygın olmamakla birlikte gerekli tedbirler alınmazsa Q Humması kolay bir şekilde özel vakadan ülke çapında salgına dönüşebilir [1].

Günümüzde yaygın olarak kullanılan Pasteur aşılı, aşılı hazırlayan ve aşılı enjekte edildiği hastalar için bazı riskler taşımaktadır. Bu risklerin başında patojenlerin öldürülmesi veya zayıflatılması esnasında karşılaşılan biyolojik tehditler gelmektedir. Bunun yanı sıra virüslerin ve bakterilerin farklı sebeplerle geçirdiği evrim hazırlanan aşılı verimliliğini düşürebilir veya aşılı etkisiz hale getirebilir. Bunun gibi sebeplerden ötürü günümüzde bu geleneksel aşılı alternatif aşılı araştırılmaktadır. Bu aşılı patojenlerden ziyade patojenlerin hastalık yapıcı etkeninin izole edilip uygun taşıyıcıya bağlanmasıyla oluşur. Hastalık etkeni çeşitli protein, peptit veya karbohidratlar olabilir. Patojen yerine bu biyomoleküllerin kullanılması çalışanların sağlıklarına olan tehditleri azalttığı gibi patojenlerin evrim geçirmesi durumunda aşının etkinliğinde bir azalma görülmesinin önüne geçer [2], [3].



## 1.2 Tezin Amacı

Tezin amacı, günümüzde engelleyici bir aşısı ve basit, çabuk sonuç veren ve otomize edilebilen bir tanı kiti olmayan Q Humması hastalığı için bir tanı kiti oluşturmaktır. Bu amaç ile Lipopolisakkarit (LPS) biyomolekülü farklı taşıyıcı moleküllerle konjuge edilmiştir ve elde edilen konjugatların in vivo deneylerinde (Balb/c) kullanılması amacıyla gerçekleştirilecek olan ELISA metodunda, ELISA plaklarına kaplama olarak kullanılmak üzere LPS-BSA konjugatlarının üretilmiştir

Slovakya Bilim Akademisi'nde *C.burnetti*'den izole edilmiş hastalık etkeni LPS, Bovin Serum Albümin (BSA) taşıyıcı proteinine ve Poli-N-vinil-2-prolidon-ko-akrilik asit [P(VP-co-AA)] konjuge edilecektir.

## 1.3 Hipotez

Hastalık etkeni olan Lipopolisakkarit taşıyıcı protein olan BSA ile konjuge edildikten sonra etken protein sayesinde molekül vücut içinde parçalanmadan daha uzun süre kalabilir ve hedeflenen bölgeye gidebilir. Kan içerisindeki hastalık etkeni bağışıklık sistemini uyarıp B lenfositlerinin salgılanmasını sağlar. Bu şekilde bağışıklık sistemi hastalık etkenini tanıyıp patojenle karşılaştığında antikor üretmeye başlayabilir. En basit tanı kitleri standart antikor-antijen ilişkisine dayanır ve bu tanı kitlerinin başarısı ELISA analizleri ile gerçekleşir. Fakat ELISA platelerini oluşturan polistiren malzemesi her moleküle sıkı bir şekilde bağlanamaz. *C.burnetii*'den izole edilen LPS polistirene zayıf bir şekilde bağlanabilen zayıf bir biyomoleküldür ve eğer bu antijen polistirene iyi bir şekilde bağlanabilen bir protein ile konjuge edilirse LPS ELISA platelerine daha iyi bağlanabilir. Q Humması'na karşı aşı yapılan canlıda hastalığa karşı antikor üretimi varsa ELISA platelerine konulan kan serumu ile birlikte yerleştirilen antijene bağlanması gerçekleşecektir. Ne kadar kuvvetli bağlanma olursa canlının kanındaki antikorlar o kadar iyi bağlanabilir ve bu şekilde otomize edilebilen kolay ve ucuz bir tanı kiti elde edilebilir.

### LİTERATÜR ÖZETİ

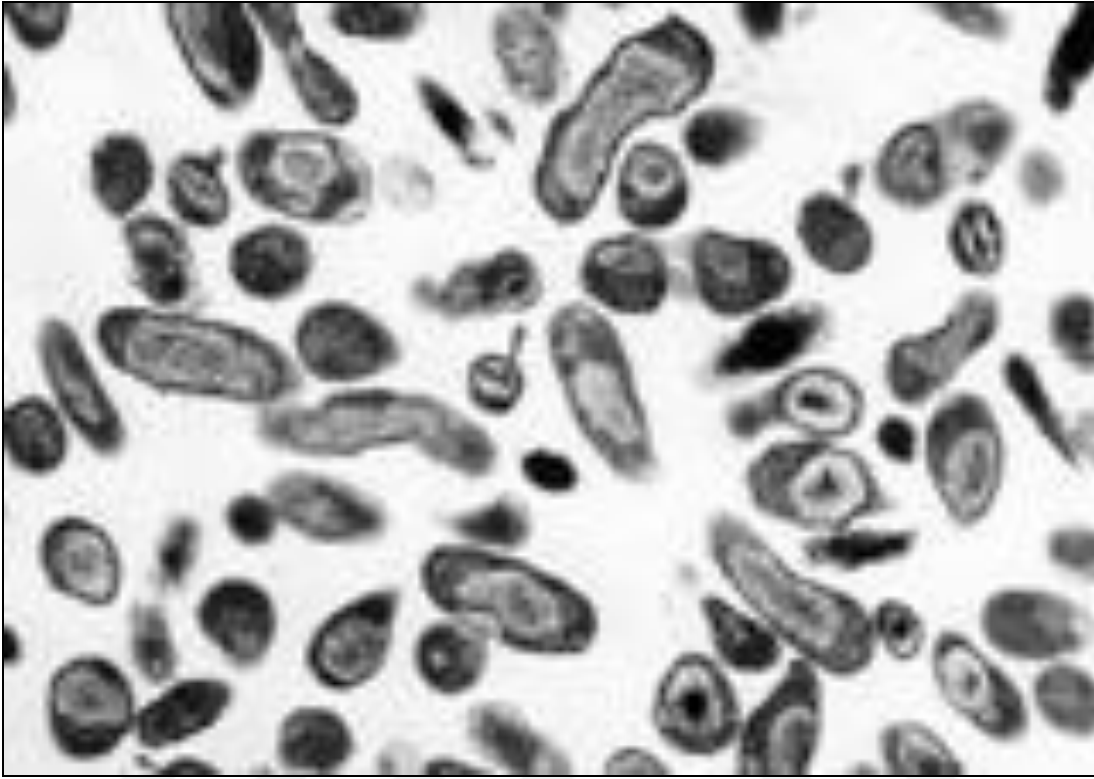
#### 2.1 Q HUMMASI

1930'lu yıllarda Avustralya'nın Brisbane kentinde keşfedilen Q Humması, Dünya'nın her yerinde bulunabilen *Coxiella burnetii* patojeni ile yayılan, olası bir B tipi biyo-silah olarak değerlendirilen zoonoz bir hastalıktır. Bu patojen; zorunlu bir hücre içi Gram negatif bakteri olup, pleomorfik çubuk şeklindedir. Ökaryot konak hücreler içerisinde katlanma süresi 20-45 saat arasındadır. Bu hastalık büyük çoğunlukta asemptomatik olmasına rağmen çiftlik hayvanlarında düşük yapımına, ölü doğuma ve deri dökümüne yol açabilir. *C.burnetii* bu deri döküntülerinden, dışkılarından, süt ve süt ürünlerinden, plasenta atıklarından ve kene gibi kan emici vektörler aracılığıyla hastalıklı hayvanlardan insan dahil olmak üzere başka konaklara; hava, peruktan (deri içi) ve temas yolu ile bulaşabilir. İsviçre'de gerçekleşmiş olan bir salgında 15 yaşının altındaki bireylerin daha yaşlı olanlara göre hastalığa yakalanma riskinin daha az olduğu saptanmıştır. 1989 yılından beri Q-Vax denilen koruyucu olmayan fakat semptomları hafifleten bir aşı yalnız Avusturalya'da yüksek risk gösteren bireylerde kullanılmaktadır. *C.burnetii*'nin karakteristik özelliklerinden biri faz değişimi olarak adlandırılan antijenik özelliğinin değişmesidir. Faz I ve Faz II olarak adlandırılan iki fazı olan bu organizma ilk fazında (PI) düz bir lipopolisakkarit (LPS) yüzeyine sahiptir ve avirülenttir. PI-LPS üç parçadan oluşur; hidrofobik lipit A, çekirdek oligosakkarit (iç ve dış çekirdek olarak ayrılır) ve polisakkarit O- antijeni. İkinci fazda (PII) ise *C.burnetii*'nin LPS yüzeyi pürüzlü hale gelir ve patojen virulent hale gelir. PII-LPS PI-LPS de bulunan dış çekirdek ve O-antijenini barındırmaz. Yapılan çalışmalar PI-LPS bazlı geliştirilen aşuların PII-LPS'ye göre daha koruyucu özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat *C.burnetii* patojenin

kültivasyonun zor olması, bu bakterinin oldukça kolay bir şekilde yayılabilmesi, 3.seviye biyogüvenlik laboratuvarına ihtiyaç duyması bu bakteriden izole edilebilecek ve aşı gelişiminde kullanılabilecek LPS'lerin eldesini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu yüzden bu yapıların kimyasal sentezi, aşı üretimini seri üretim için uygulanabilir hale getirmekle beraber personel sağlığı için de yararlıdır [1], [2], [3], [4], [5].

Q Humması klinik olarak polimorfizm karakteristik gösterir yani teşhis sadece sistematik testler ile gerçekleştirilebilir. Bu testler, *C.burnetii* hücre içi bir patojen olduğu için hücrenin kendisini bulmaktan ziyade, alınan numunedeki hücrelerin parçalanıp zahmetli ve pahalı işlemler sonucunda DNA taraması aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu numuneler kan, plasenta, süt veya canlıların bulunduğu ortamdaki topraktan alınabilir. En doğru sonucu veren numuneler döllenmiş yumurta beyazı, kobay fareleri ve laboratuvar fareleri olarak belirlenmiştir. Toplanan numuneler daha sonra DNA izolasyon kitleri ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi aracılığıyla *C.burnetii* genomu varlığı için taranır. İmmünofloresans Tekniği (Immunofluorescence Assay (IFA)) ve ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemleri de bu patojenin teşhisinde anahtar rol oynamıştır. ELISA yöntemi özellikle Faz I ve Faz II *C.burnetti* antikörlerini ayırt edebildiği için analizlerde büyük önem taşımaktadır. Patojenin varlığını kanıtlamanın başka bir yolu ise; sağlığından şüphelenen canlıdan alınan dokunun içindeki *C.burnetii* patojenini gösterecek Akridin Oranj (Acridine Orange (AO)) gibi bazik bir boya ile boyamaktır. *Coxilla* ailesi asidik membran vakuolu içerir bu da AO gibi bazik boyaların onlara bağlanmasını kolaylaştırır. Q Humması akut ve kronik olarak kendisini gösterebilir. Patojene ait Rocky Mountain Laboratuvarları'ndan (NIH, MT, ABD) elde edilmiş bir resim Şekil 1.1'de verilmiştir. Akut Q Humması'nın yaygın olarak gösterdiği semptomlar; baş ağrısıyla gelen uzatılmış ateş, akciğer iltihaplanması, hepatit, kurdeşen, kalp zarı iltihabı, meningoensefalit, ansefalit, lenfosittik menenjit olarak sıralanabilir. İlk bulaşmadan aylar sonra hastalık kronik Q Humması'na dönüşebilir. Bu form oldukça yaygındır, kalp ve damar yolu iltihaplarına ve hamilelerde düşüğe yol açmaktadır. Ülkemizde bu hastalığa ait bulgular koyun ve dana sürülerinin süt, kan dışkı, mukus salgıları ve deri döküntülerinden analiz edildiğinde; hastalık taşıyanların az olmasına rağmen kene kontrolü, hastaların tespiti

ve karantinası gibi faktörlerin düzgün yapılmaması sonucu Q Humması hastalığının ülkemiz için bir tehdit olabileceği kanısına varılmıştır [1], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11].



Şekil 2. 1 *Coxiella burnetii* organizması(Rocky Mountain Laboratories, NIH, MT, ABD)

## 2.2 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Bağışıklık sistemi vücudumuzu hastalıklardan, özellikle bulaşıcı hastalıklardan ve yabancı bileşiklerden korumak için vücudumuzdaki hücre ve moleküllerin beraber çalışması sonucu oluşan öğrenme, hafıza ve örüntü tanıma gibi özellikler gösteren koordine cevap olarak nitelendirilebilir. Yaşadığımız gezegende, etrafımızın hastalık yapan veya yapmayan mikroorganizmalar ile sarılı olduğu düşünülürse bağışıklık sisteminin canlıların hayatta kalması için ne kadar önemli olduğu anlaşılabilir. Bağışıklık sistemini harekete geçirmek için vücuda giren yabancı maddenin veya hücrenin patojenik olması şart değildir. Bazı durumlarda bireyin bağışıklık sistemi vücudunda bulunan kendi moleküllerinden dolayı harekete geçebilir; bu tür hastalıklara genel olarak oto-immün hastalıklar denir. Mikroplara karşı oluşturulan immün cevap;

doğuştan gelen bağışıklığın ilk tepkisiyle ve sonradan gelen bağışıklığın gecikmeli tepkisiyle olur. Doğuştan gelen bağışıklık birçok hastalık için vücudumuzun birincil savunma hattıdır. Bu bağışıklık çeşidi vücutta, patojen veya yabancı molekül vücuda girmeden önce bulunan hücresel ve moleküler tepkilerin toplamıdır. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi filogenetik olarak oldukça eski bir savunma yöntemidir, bu savunma sistemi böcekler ve bitkilerde de bulunur ve yaklaşık 500 milyon yıl önce yaşamış olan çenesiz balıklarda ortaya çıktığı düşünölmektedir. Bu bağışıklık sisteminin ana bileşenleri; epitel doku ve bu dokuda oluşturulan anti-mikrobiyal bileşikler gibi fiziksel ve kimyasal savunma hatları, fagozitik aktivite gösteren makrofaj hücrelerine benzer hücreler ve kanda bulunan proteinlerdir. Fakat vücudumuz büyüdüğü süreçte maruz kaldığı ve tanımadığı yabancı hücreler ve moleküllere karşı sonradan bağışıklık da kazanabilir. Kazanılan bağışıklık olarak bilinen bu tepki sistemi, doğuştan gelen bağışıklığın aksine mikropları ve molekülleri detaylı bir şekilde tanıyabilir, birbirlerinden ayırt edebilir ve uygun tepkiyi gerektiği gibi verebilir. Aynı patojene birkaç kez maruz kaldıktan sonra vücutta bir "hafıza" gelişir ve bu yetenek sonradan gelen bağışıklığın daha esnek olmasını sağlar. Bu sistemin ana bileşenleri; lenfosit hücreleri ve bu hücrelerin ürettiği antikorlardır. Bu iki bağışıklık sistemi beraber çalışarak organizmanın sağlığının korunmasını sağlar. Doğuştan gelen bağışıklık savunmanın birinci hattıdır ama bu savunma çok yüzeyseldir ve günümüzde birçok patojen bu savunma çeşidine karşı bağışıklık kazanmıştır, bu noktada sonradan gelen bağışıklık devreye girmektedir ve patojene özgü bir savunma geliştirmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık, sonradan kazanılan bağışıklık sisteminin uyarılıp gelişmesini etkilerken, sonradan kazanılan bağışıklık doğuştan gelen bağışıklık sisteminin daha kapsamlı olmasını sağlayarak çalışır. Sonradan kazanılan bağışıklığın iki çeşidi vardır; hücre aracılı (hücresel) ve humoral (vücut sıvısı aracılı) bağışıklık. Hücresel bağışıklık T lenfositleri tarafından sağlanır ve virüs ve bazı bakteriler gibi intrasellöler patojenlerin yok edilmesinde rol oynarlar. Humoral bağışıklık kan ve mukus sıvılarında bulunan ve B lenfositleri tarafından sentezlenen antikorlarla sağlanır. Antikorlar patojenlerin antijenlerini tanıyarak onları etkisiz hale getirir ve yok edilmeleri için işaretler [12].

## 2.3 SENTETİK AŞILAR

Günümüzde 30'a yakın patojene karşı bağışıklık sağlayan 70'den fazla patentlenmiş aşı bulunmaktadır ve buna rağmen bu alanda hala aşılması gereken engeller mevcuttur. Günümüzde kullanılan aşilar aktivite ve fiziksel parametrelere dayanıklılık bakımından yetersizdirler. Bunun yanı sıra günümüzde uygulanan aşilama yöntemi için de farklı alternatifler aranmaktadır (mukoza tabakasından, gıda ile aşilama vb.). Biyoteknolojik gelişmeler günümüzde kullanılan Pasteur Aşiları'na güvenli alternatif olarak peptit, protein ve nükleik asitlerin direk olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Fakat bu biyomoleküllerin düşük immunojenitesi kullanımlarını zorlaştırmaktadır. Bu moleküllerin konaktaki bağışıklık yanıtını arttırmak için birkaç farklı yol ileri sürülmüştür. Nano boyuttaki taşıyıcıların içine hapsetmek, adjuvan yardımı kullanmak ve doğal ve/veya sentetik polimerlere bağlayarak konağa enjekte edilmesi bağışıklık yanıtını arttırmak için sunulan çözümlerden bazılarıdır. Günümüzde seri üretimde kullanabilen adjuvanların azlığı da yeni bağışıklık yanıtını arttırıcı yardımcı moleküllerin arayışını etkilemiştir. Sentetik polielektrolitlerin peptit, protein veya karbonhidrat gibi antijenik özellik gösteren biyomoleküllerle konjuge edilmesi ve oluşan yeni molekülün klasik adjuvanlar yerine aşı yapımında kullanılması son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bu tür aşilar patojen ile direk temas gerektirmediği için HIV, sıtma, hepatit hatta kanser gibi biyogüvenlik riski yüksek olan birçok hastalık için aşı üretimini mümkün kılabilmektedir. Zayıf immunojenik yanıt oluşturan bir biyomolekülün güçlü bağışıklık yanıtı alabilen polimerik bir taşıyıcıya bağlanması ile oluşan bu aşilar humoral bağışıklık yanıtının oluşmasına yardımcı olmaktadır. Buna verilebilecek örneklerden bir tanesi Hib olarak bilinen hastalık için geliştirilmiş olan aşıdır. Bir influenza (grip) türü olan bu hastalık bebeklerde ve çocuklarda menenjit gibi ciddi etkilere yol açabilir. Fakat bu hastalık için geliştirilmiş olan konjugat aşı günümüzde bu hastalığın neredeyse ortadan kalkmasını sağlamıştır. Bu aşilar *H.influenzae* patojeninin B tipinin polisakkaritinin difteri toksoidi gibi taşıyıcılara bağlanması ile elde edilmiştir. Konjuge aşilaların çalışma prensibinin; oluşan konjugatın bağışıklık yanıtının oluşumunda sorumlu hücrelerin yüzey proteinleri ile aralarındaki ilişkiye bağlı olduğu düşünülmektedir. Konjugatın üzerindeki serbest polielektrolitler hücrelerin yüzey proteinleri ile kümelenir, bu kümelenme esnasında konjugata bağlı olan antijen bağışıklık yanıtı

oluşturacak hücrenin reseptörleri tarafından tanınır ve bu bağışıklık yanıtın oluşmasını sağlar [13], [14], [15].

## 2.4 POLİELEKTROLİTLER

Polielektrolit terimi her ne kadar uzun süredir var olsa da bu moleküllerin immünoloji alanında çalışılması göreceli olarak yeni araştırılan bir konudur. Polielektrolitler anyonik veya katyonik gruplara sahip ve bu gruplara bağlı "counter" iyonları olan polimer sistemleri kapsar. Doğada bulunan ya da sentetik olarak üretilen biyoyumlu ve biyobozunur polielektrolit özellik gösteren polimerlerin antijen özellikleri gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (protein, polisakkarit, nükleik asit, polipeptit vb.). Bu sonuçtan yola çıkılarak bağışıklık sistemimizin bu molekülleri tanıdığı ve bunlara karşı antikor üreterek yanıt oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Polielektrolitler katılma ya da kondenzasyon reaksiyonları sonucunda oluşur ve herhangi bir kimyasal yapıdan uygun sayıda iyonik grubun kovalent olarak bağlanması ve uygun pH'da çözünmesi sağlanarak polielektrolit oluşturmak mümkündür. Polielektrolitlerin farklı sınıflandırma çeşitleri vardır. Tüm monomerleri aynı işaretli yüklere sahip polielektrolit **homopolielektrolit** olarak adlandırılırken hem anyonik hem de katyonik grup barındıran polielektrolitler **poliamfolit** olarak adlandırılır. Polielektrolitlerin buldukları ortamda davranışlarını etkileyen dört ana faktör vardır:

**1.** Polimere bağlı yüklü gruplar **anyonik** ya da **katyonik** olarak sınıflandırılır; bu gruplar da kendi içlerinde güçlü ve zayıf asit-baz gruplarına ayrılırlar. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilirken zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebepten dolayı zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildir ve ortamın pH'ına göre farklı yük değerine sahip olabilirler.

**2.** Polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve/veya katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolitin davranışını etkileyen başka bir ana faktördür. Yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak tanımlanabilir ve bu özellik polimerin çözünürlük gibi karakteristik özelliklerini etkiler. Eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin birden fazla iyonik kısmı varsa tipik bir polielektrolit davranışı beklenir.

3. Makro iyonun molekül geometrisinde yüklü grupların dağılımı polimerin diğer polimerler ve ortamıyla olan ilişkisini etkiler. İyonik gruplar bir polimerin üzerinde bulunabilmekle birlikte spacer dediğimiz ana zincire bağlı bir yan zincir üzerinde de bulunabilir.

4. Düşük moleküler ağırlığı olan “counter” iyonları çözeltide bulunan tüm sistemin özelliklerini etkiler. Örneğin poli(dialildimetilamonyum) polimeri içerisinde Cl<sup>-</sup> iyonlarının bulunduğu ortamda kolay bir şekilde çözünebilirken içerisinde I<sup>-</sup> iyonlarının bulunduğu ortamda zor çözünür [4], [16].

Sentetik polielektrolitlerin bağışıklığı uyandırıcı etkileri, kendileri immunojenik özellik göstermediğinden cazip bir uygulamadır. Çözelti içerisinde yük taşımayan lineer bir polimer zinciri düzensiz bir konformasyon gösterirken; aynı ortamda bir polielektrolit üzerinde barındırdığı yük çeşidi ve yük dağılımına göre bir konformasyona girer. Polielektrolit moleküllerin çözelti içerisindeki çözünürlükleri ortamın iyonik şiddetine bağlıdır; ortamdaki iyonik şiddet arttıkça polielektrolit yüksüz bir molekül gibi davranmaya başlar. Bir polielektrolitin bağışıklık sistemini uyarabilmesi için hedeflenen antikoru üreten B lenfositlerinin yüzeyine tutunup bu yüzeyde emilim gösterebilir. Bu yüzden polielektrolit ve antijen konjugatları sentetik aşı üretimi için oldukça uygundur; polielektrolitlerin kendileri immün yanıt oluşturmamak ile birlikte yapıları hücre duvarına tutunma ve emilim gösterme sağlanacak şekilde düzenlenebilir; polielektrolite bağlı olan antijen ise oldukça spesifik olan antikor üreten B-lenfosit hücreleri tarafından tanınıp onlara doğru eğilim göstereceği için bu konjugatların hücre içerisinde diğer hücrelere etkileşime girme ihtimali azalır [4], [14], [16].

## 2.5 TANI KİTLERİ

Kullanışlı bir tanı kitinin karakteristik iki kriteri **hassasiyet** ve **özgüllük**tür. Hassasiyet kriteri, tanı kitinin gerçekten hastalıklı bireyden alınan numunenin pozitif sonuç verme olasılığı olarak tanımlanırken özgüllük özelliği tanı kitinin hasta olmayan bireyin negatif sonuç vermesini sağlar; bu değerler olasılık üzerinden değerlendirildiği için yüzdelik olarak tanımlanırlar. Hassasiyet ve özgüllük, “altın standart” olarak da bilinen hastalıklı örnekler ile sağlıklı örnekleri birbirinden tamamen ayırt edebilen bir referans standardı ile karşılaştırılırlar. Bu standardın sonuçlarıyla altın standardın sonuçları arasında olan



fark tanı kitinin hata oranını verir. Referans standardının farklı kullanıcılar tarafından aynı sonuçları vermesi o tanı kitinin tutarlılığını gösterir ve tutarlılık zaman zaman bir tanı kitinin performansı için önemli olan tek kriter olmaktadır. Bir tanı kiti için önemli olan diğer değerler Pozitif Öngörü Değer (Positive Predictive Value (PPV)) ve Negatif Öngörü Değeri (Negative Predictive Value (NPV))'dir. Bu değerler sırasıyla gerçek pozitif ve gerçek negatif değerlerin yüzdelerini verir ve hassasiyet ve özgüllük değerlerini vermekle birlikte bir popülasyonda ilgili hastalığın ne kadar yaygın olduğunu da gösterir. Tanı kitlerinin diğer önemli kriterlerinden olan tekrarlanabilirlik, bir tanı kitinin bir numuneyi her test ettiğinde aynı sonucu verme oranı ile ifade edilir ve tanı kitinin uzun vadeli kullanılabilmesi için yüksek olması gerekmektedir. Tanı kitinin kullanımının kolaylığı, cevabı verdiği süre ve istikrarı da kullanımını kolaylaştıran ve kullanan kişinin alması gereken eğitimi azaltan kriterlerdir, yani kullanım kolaylaştıkça kitin kullanımı yaygınlaşır. Bir tanı kiti oluşturulurken belirlenmesi gereken ilk şey kite ihtiyacı doğuran sorundur. Tehlikeli olan bir hastalığın semptom vermemesi, hızlı yayılan bir hastalığın acil tespiti veya invaziv olmayan yöntemlerle hastalığın belirlenmesinin istenmesi bu nedenler arasında sayılabilir. Daha sonra kitin oluşturulma amacı belirlenmelidir. Bu amaç var olan bir teşhisin kalitesini arttırma veya bu teşhisin ulaşılabilirliğini geliştirmek olabilir. Tanı kitinin oluşturulmasında son basamak söz konusu hastalık için var olan teşhis yöntemlerinin belirlenip, bu yöntemlerin sınırlarının tespit edilmesidir. Bu basamak tanı kitinin oluşturulmasını hızlandırmak ve kolaylaştırmakla kalmaz hastalığın hangi yönlerden incelendiğini de belirler. Tanı kitlerinin kullanımının genel amacı şüpheli bir canlıdan elde edilen doku üzerinden o organizmada bir patojenin varlığını doğrulamak veya yalanlamak ya da bir zamanlar olup olmadığını belirlemektir. Patojenin varlığını zararlı organizma veya bu organizmaya özgü işaretleyici molekül üzerinden belirlemek özellikle klinik alanda hastalık kontrolü için kritik önem taşımaktadır. Tanı kitlerinin tutarlı, ucuz ve basit olmaları ve kısa sürede sonuç vermeleri gerekmektedir. Birçok hastalık için erken teşhis ve müdahale o hastalığın geniş kitlelere yayılmasını engellemek için kritik öneme sahiptir [17].

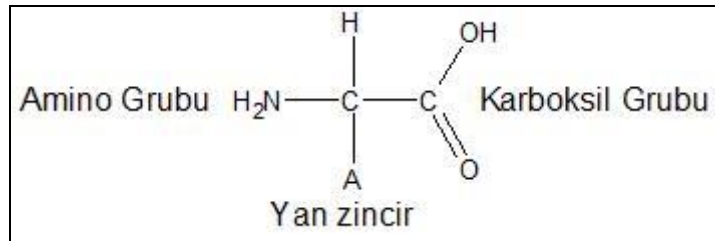
Q Humması Hastalığı her ne kadar insanları da tehdit etse de elde ettiği kurbanlar genel olarak çiftlik hayvanlarıdır. Türkiye gibi kırsal ekonomiye sahip ülkeler için bu tür

bir hastalık ülkenin geleceği için tehdit olarak sınıflandırılabilir. Bu hastalığın varlığının kanıtlanması için yapılması gereken harcamalar göz önünde bulundurulursa; Q Humması için basit, *in vitro* ve ucuz bir tanı kitinin ülke ekonomisi için neden kritik olduğu anlaşılabilir [5], [10], [17].

## 2.6 PROTEİNLER

Biyolojik bir kütlenin kuru ağırlığının çoğunluğunu proteinler oluşturur. Proteinler bir canlının temel yapı taşı olmakla birlikte birçok hayati fonksiyonda kritik rol oynar, yoklukları bu fonksiyonların zorlaşmasına veya oluşmamasına yol açar. Karbon (C), Hidrojen (H), Oksijen (O), Azot (N) ve bazı durumlarda Kükürt (S) içeren amino asitlerin birbirlerine bir karboksil ucu ile amino grubu arasında kurulan amid bağı sonucu bağlanması ile oluşan peptitler, canlı içinde bulunan şaperonlar sayesinde doğru şekilde katlandıktan sonra proteinleri oluşturur. Doğada 20 farklı aminoasit bulunmaktadır ve her birinin birbirinden ayrı biyokimyasal özelliği vardır. Bu farklılığı sağlayan yapı amino asitlerde bulunan radikal grup olarak adlandırılan değişken gruptur. Her protein bu farklı aminoasit gruplarının farklı kombinasyonları sonucu oluşur ve onu oluşturan aminoasitlerin yapılarına göre şekil ve fonksiyon kazanır. Hücrenin çevresindeki madde alışverişinden hücrenin büyümesi, bölünmesi ve ölmesini düzenlemeye, canlının bağışıklık sistemini oluşturmaktan, canlıya yapı ve destek sağlayabilen proteinler kimyasal olarak bilinen en karmaşık yapıya ve en gelişmiş fonksiyon aralığına sahiptirler. Her proteinin doğal olarak koruduğu üç boyutlu yapı konformasyon olarak adlandırılır. Yapı bakımından incelenirken proteinler 4 farklı düzleimde incelenir;

**Birincil yapı** → Aminoasitlerin birbirleriyle kurduğu amid bağları sonucu oluşan düz zincir.



Şekil 2. 2 Bir amino asidin şematik gösterimi

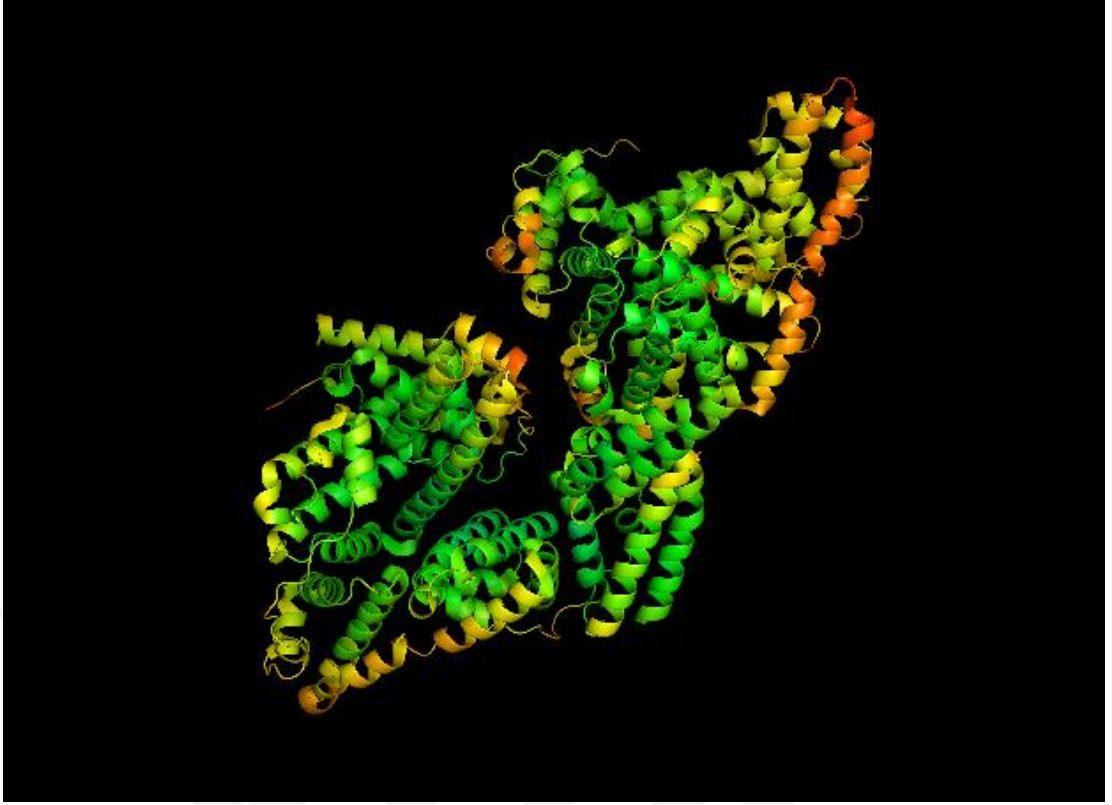
**İkincil yapı** → Peptit zinciri üzerinde aynı ya da farklı amid bağları arasında kurulan Hidrojen bağları ile oluşur. Bu bağlar karboksil (-C=O) grubundaki Oksijen ve amin (-NH<sub>2</sub>) grubundaki Hidrojen arasında kurulur. Eğer bu bağlar aynı polipeptit zinciri üzerinde gerçekleşirse, protein sarmal bir yapı oluşturur ve bu yapıya  $\alpha$ -heliks denir. Eğer ki bu bağlar farklı iki polipeptit arasında kurulursa akordeon şeklinde dizilen  $\beta$ -yaprak yapısı oluşur.

**Üçüncül yapı** → Proteinleri oluşturan amino asitlerin yan gruplarının birbirleriyle ve etraflarıyla etkileşimleri sonucu oluşan toplam üç boyutlu yapı. Üçüncül yapı bir proteinin fonksiyonu ve bu fonksiyonu gerçekleştirme yeteneği ile bağlantılıdır. Proteinin şeklinin oluşmasında rol alan kuvvetler aminoasitler arasında oluşan van der Waals etkileşimleri, Hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve disülfid köprüleridir. Bu kuvvetler eşliğinde konformasyon oluşturan protein, en düşük serbest enerjiye sahip olacak şekilde katlanır.

**Dördüncül yapı** → Birçok protein 50-2000 aminoasit barındırır, böyle büyük moleküllerin kendi başlarına katlanan alt üniteleri vardır. Bu alt ünitelerin birleşerek oluşturduğu etkileşimler sonucu oluşan yapı dördüncül yapı olarak adlandırılır. Alt üniteler iplik şeklinde (fibröz) ya da küresel (globular) olarak sınıflandırılır [18], [19].

## 2.7 BOVİN SERUM ALBÜMİN

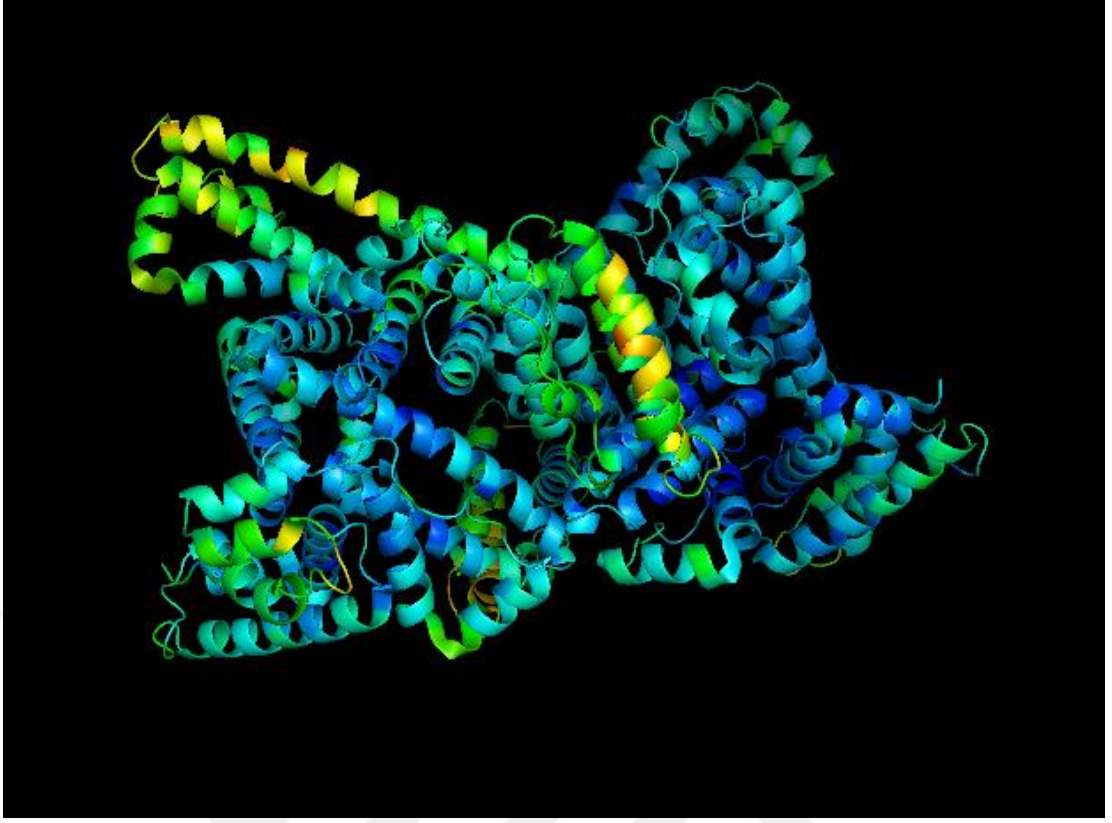
Bovine Serum Albümin (BSA) sığır kan plazmasındaki toplam proteinin yarısından fazlasını oluşturan albümin proteinlerindedir. Kolay erişimi ve iyi çözünürlüğü gibi avantajlarından dolayı en yaygın kullanılan taşıyıcı immunojenik proteinlerdendir. Taşıdığı çeşitli fonksiyonel gruplardan dolayı sıkça taşıyıcı protein olarak kullanılır. Molekül ağırlığı  $66 \times 10^3$  Da olan bu molekülün I., II. ve III. olarak bilinen üç ünitesi vardır ve her bir ünite A ve B olarak bilinen iki alt ünite içerir. Birincil yapısında düzenli bir yük dağılımı yoktur. Yapısında hem asidik (Asp ve Glu) hem de bazik (Arg, His, Lys) amino asitler barındırdığı için BSA amfoterik özellik gösterir. BSA proteininin pI değeri pH 5 civarındadır [18], [20]. Şekil 2.2; referans edildiği kaynaktan elde edilen veriler doğrultusunda PyMOL modelleme yazılımı aracılığıyla elde edilmiştir.



Şekil 2. 3 BSA proteinin aktif bölgelerine göre renklendirilmiş şekli [20]

## 2.8 HUMAN SERUM ALBUMİN

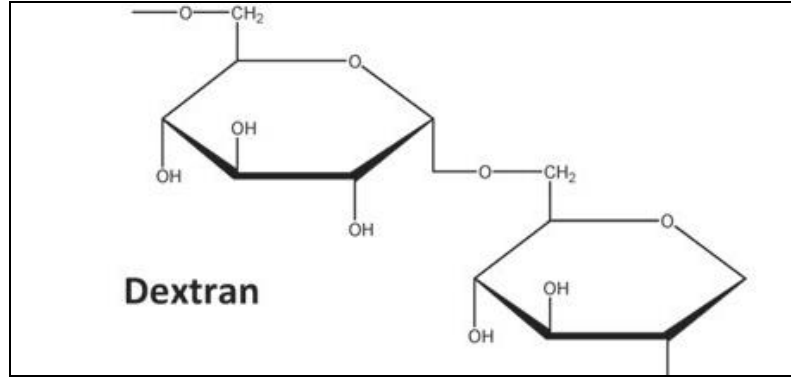
Human Serum Albümin proteini insan kanında en çok bulunan proteindir ve vücut bölümleri arasında sıvı akışını düzenleyen ana elementlerdendir. Yağ asitlerinin ana taşıyıcısı olan bu molekül aynı zamanda birçok ilacın farmakokinetiğini etkiler, çeşitli ligandlara metabolik modifikasyon sağlar, olası toksinleri zararsız kılar ve enzim benzeri özellikler gösterir. Şekil 2.3; referans edildiği kaynaktan elde edilen veriler doğrultusunda PyMOL modelleme yazılımı aracılığıyla elde edilmiştir.



Şekil 2. 4 HSA proteinin aktif bölgelerine göre renklendirilmiş şekli [21]

## 2.9 DEKSTRAN

Dekstran doğada kolaylıkla bulunabilen biyo-uyumlu ve vücutta parçalanabilen şeker içeren bir biyopolimerdir. İlk kullanım alanı plazma genişletici olan bu biyopolimer çok geçmeden ilaç taşımadan yara örtüsüne birçok farklı sağlık alanının en gözde moleküllerinden olmuştur. Özellikle çeşitli hidro-jel oluşturma yöntemlerine izin vermesi, kolay bir şekilde okside olabilmesi ve ucuz olması onu ilaç sektöründe popüler yapmıştır. Birçok anti-kanserojen ilaç ile oluşturabildiği konjugatlar ile hedefli ilaç sistemlerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Karboksimetil dekstran, okside dekstran ve amino-dekstran bu alanda en sık kullanılan dekstran türevleridir. Her ne kadar dekstran türevlerinin çoğu klinik öncesi aşamayı geçememiş olsa da okside dekstran ile oluşturulmuş konjugatlardan bazıları Faz 1'i geçebilmiştir. Fakat bu modifikasyon türü biyo-uyumluluğu azaltıp toksik sonuçlara yol açabilmektedir. Bunu engellemek için dekstranın karboksil ucunu aldehite çeviren  $\text{NaIO}_4$  miktarına dikkat edilmelidir [22], [23].



Şekil 2. 5 Dekstran polimerinin monomeri [23]

## 2.10 ÇAPRAZ BAĞLAYICILAR

Çapraz bağlayıcı olarak bilinen kimyasal reaktifler biyokonjugasyon reaksiyonlarında moleküllerin birbirlerine kovalent bağ kurmasını sağlar. Bu reaktiflerin uygulama alanına göre farklı çeşitleri vardır ve biyomoleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmalarında ve küçük moleküllerin daha büyük molekülleri hedefleyip bu moleküllere bağlanmasında kullanılabilir intermoleküler ve intramoleküler bağların oluşmasında rol oynayabilirler. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki radikal grupların türlerine göre homobifonksiyonel ve heterobifonksiyonel olabilirler. Bağlanan iki molekül arasında 0-20 Å (1 Å = 1 x 10<sup>-10</sup>m) uzunluğunda "spacer" (arabulucu) molekül bulunur. Bu molekül, bir protein molekülünün reaktif grubuyla ikinci bir molekülün reaktif grubu arasında bir ip görevi görecektir şekilde bağlanır. Bu bağlanma sonucunda antijenik molekülün taşıyıcı yüzeyinden daha fazla çıkabilmesine olanak sağlayıp ulaşılabilirliğini kolaylaştırır. Bunun sonucunda antijenin oluşturduğu immün yanıtın etkisi artar. Arabulucu molekül en fazla 6 metilen zinciri içerdiği ve başka fonksiyonel grup bulundurmadığı için beklenmeyen yan reaksiyonlar ve istenmedik immün cevaplar oluşturmaz. Çapraz bağlayıcılar ile oluşan konjugatlar, konjugasyonu oluşturan moleküllerin biyolojik aktivitelerini birlikte taşır [18].

### **Homobifonksiyonel apraz Bağlayıcılar**

Homobifonksiyonel apraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik, iki özdeş reaktif grubuna bağlanmasıyla oluşur. Yani bu bağlayıcılar; iki proteinini oluşturan aminoasitleri, amino gruplarından ya da karboksil gruplarından birbirlerine bağlayabilir fakat bu amino asitlerden birinin amino grubuna diğerinin karboksil grubuna bağlanamaz. Bu özellikleri homobifonksiyonel grupları farklı assay ve hedefleme çalışmalarında kullanılabilmelerini sağlar. Fakat homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ile oluşan konjugatlar yeteri kadar tanımlanamamakla birlikte, konjugasyon esnasında oluşan ara ürün kendi içerisinde diğer bir fonksiyonel gruba bağlanarak intramoleküler konjugat oluşturabilir. Ayrıca apraz bağlayıcının ilk protein ile oluşturduğu ara ürün, ortamda bulunan aynı cins proteinlere bağlanabilmektedir. Farklı bir çapraz bağlayıcının aktif ara ürün ile bağlanarak aynı molekülün polimerizasyonu için ikili (dimer), üçlü (trimer) şeklinde adım adım ilerlemesi ve tek monomerden oluşan oligomer zinciri oluşturması gereklidir. Homobifonksiyonel apraz bağlayıcıların kullanıldığı tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat oluşumu tam olarak tanımlanamamış önemli bir basamak ve problemdir. Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için tüm reaktifler karışıma aynı anda katılmalıdır. Bu olumsuzlukların önüne geçmek için iki basamaklı reaksiyon prosedürü oluşturulmuştur. Bu prosedürde birinci protein molekülü çapraz bağlayıcı ile aktive edilir. Bu işlem sonucunda oluşan yan ürünler ortamdaki uzaklaştırılır ve aktive edilmiş protein saflaştırılır. Protein saflaştırdıktan sonra konjuge edilecek ikinci molekül birinci molekül ile karıştırılır. Fakat bu işlem sırasında aktive edilmiş protein saflaştırılırken hidroliz olabilir ya da ilk molekül kendisiyle polimerize olabilir; bu istenmeyen durumlar reaksiyon verimini dūřürmektedir.

### **Heterobifonksiyonel apraz Bağlayıcılar**

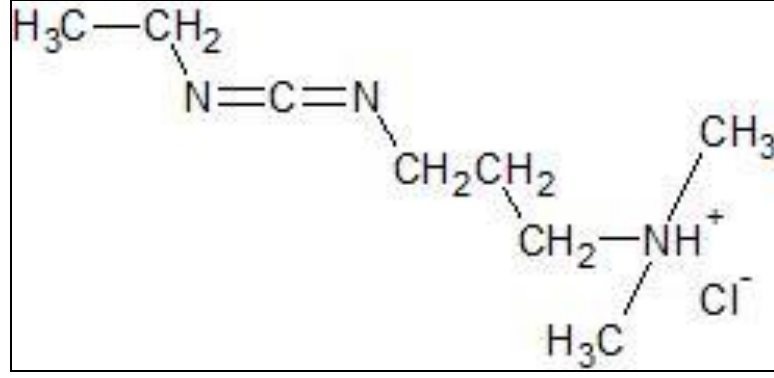
Heterobifonksiyonel apraz bağlayıcılar uzun karbon zincirinden oluşan ve iki molekülün farklı fonksiyonel gruplarına kovalent olarak bağlanan moleküllerdir. Yani bu çapraz bağlayıcılar; iki protein molekülünü birbirlerine bir proteini oluşturan amino asitlerden bir tanesinin karboksil grubundan diğer proteini oluşturan amino asitlerden bir tanesinin karboksil grubundan bağlanabilir ama iki amino asidi birbirlerine amino

veya karboksil gruplarından bağlayamaz. Bu özellik heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların konjugasyon işleminde daha iyi kontrol göstermesine sebep olur. Bu bağlayıcılar ile gerçekleşen konjugasyon birkaç basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta ilk biyomolekül heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının aktif ucuna bağlanarak modifiye edilir. Bu molekül daha sonra farklı yöntemlerle ortamda bulunan serbest reaktiflerden ve/veya aktive edilmemiş moleküllerden uzaklaştırılır. İkinci molekül eklenmeden önce ara ürünün kararlılığının bozulmaması için, bağlayıcı molekülünün en az bir tane suda çözünebilir fonksiyonel gruba ihtiyacı vardır. Bu çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarının veriminin (konjugatın boyutu, bileşenlerin oranları vb.) kontrol edilmesini kolaylaştırır. Konjugatın yapısı, ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak eklenen ikinci proteinin miktarıyla değiştirilebilir. Yani heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar aracılığıyla kullanım amacına göre özel konjugat düzenlemek homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların kullanıldığı reaksiyonlara kıyasla oldukça kolay olur. Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, bağlayacağı moleküllere göre iki farklı fonksiyonel grup veya bir arabulucu içerebilir. Fonksiyonel gruplar veya barındırdıkları ara bulucular çapraz bağlayıcıların seçilmesinde kullanılan ana parametrelerdir.

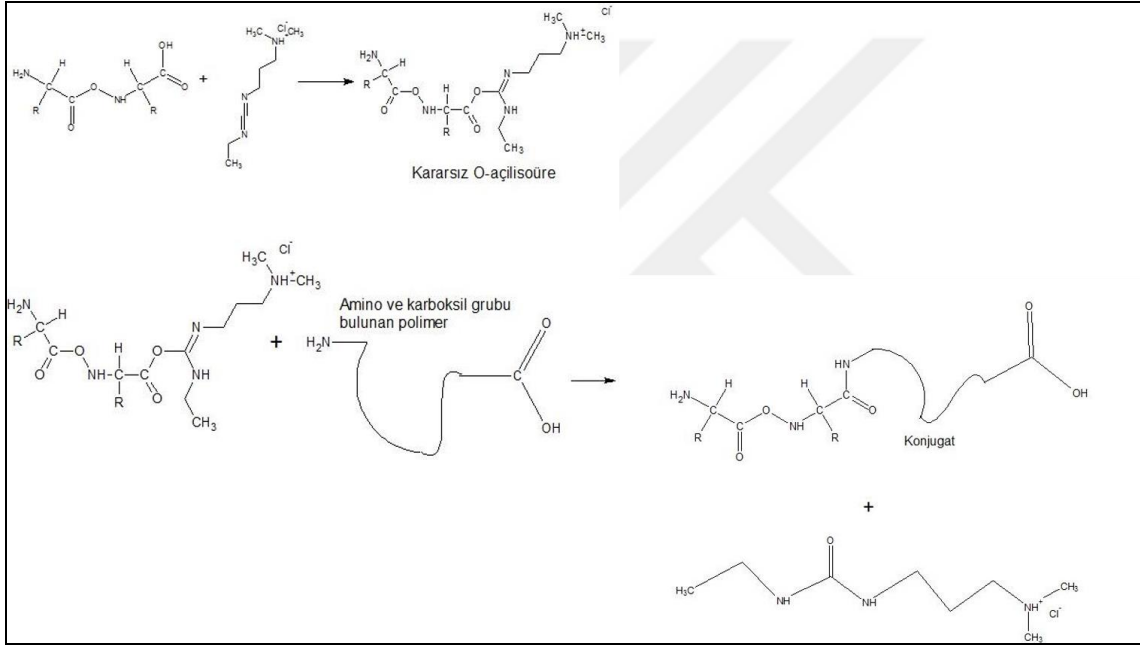
Peptit-protein ve protein-protein konjugasyonlarında en sık kullanılan çapraz bağlayıcılar **karbodiimidler** olarak bilinir. Suda çözünen ve çözünmeyen sınıfları bulunan bu çapraz bağlayıcı grup, primer aminlerin karboksilat gruplarıyla amid bağı kurmasına ve fosfat gruplarının amino gruplarıyla fosfoamid bağı kurmalarına yardımcı olur. Karbodiimidlerin en büyük avantajı **zero-length çapraz bağlayıcı** yani direkt çapraz bağlayıcı sınıfında olmalarıdır. Bu bağlayıcılar iki molekülü aralarında herhangi bir grup ya da atomun olmasını engelleyecek şekilde birbirine bağlar. Birçok konjugasyon reaksiyonunda moleküllerin birbirine bağlanması için yapıya yabancı bir madde katılır ve bu katılan madde her zaman hedeflenen amaca uygun olmayabilir. Biyokimyasal konjugatların yapımında, biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı sulu ortamda çözünebildiği için karbodiimidlerin suda çözünen formları tercih edilir. Amin gruplarıyla oluşabilen üre kökenli yan ürünlerin de suda çözünebilmeleri saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmaktadır. Organik çözücüde çözünebilir karbodiimidler ise peptit sentezinde ve organik çözücülerde çözünebilir konjugat oluşumunda kullanılır. **EDC**



veya **EDAC** olarak bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid çapraz bağlayıcısı biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid bağlayıcıdır. Bu bağlayıcı ile oluşan reaksiyon sonucu meydana gelen yan ürünler de suda çözünebildiği için, bu yan ürünler diyaliz gibi basit ayırma işlemler ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Fakat EDC sulu ortamda kararsız bir yapıya sahip olduğundan dolayı  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmalıdır. Primer amin ve karboksil içeren birçok molekül EDC yardımıyla konjuge edilebilir. Bu reaksiyon esnasında karbodiimid üzerindeki karbon atomuna komşu göreceli olarak daha elektronegatif iki azot atomundan dolayı karbon atomu kısmi olarak pozitif (+) yük kazanır. Bu durum karboksilat anyonlarının bağlanabileceği uygun bir ortam oluşturur. N-substitute karbodiimidler karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça kararsız ve reaktif O-açılısoüre ara ürününü oluşturur. Daha sonra bu ara ürün primer amin gibi nükleofil özellik gösteren gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu sağlar. Fakat bu yöntem peptidlerde ve proteinlerde bulunan amino asitlerin kendi içlerinde bağ kurmasına sebep olabilir [18], [24], [25].



Şekil 2. 6 EDC çapraz bağlayıcısının şematik gösterimi



Şekil 2. 7 EDC çapraz bağlayıcısı ile gerçekleşen konjugasyon reaksiyonunun şematik gösterimi

## 2.11 KONJUGASYON REAKSİYONLARI

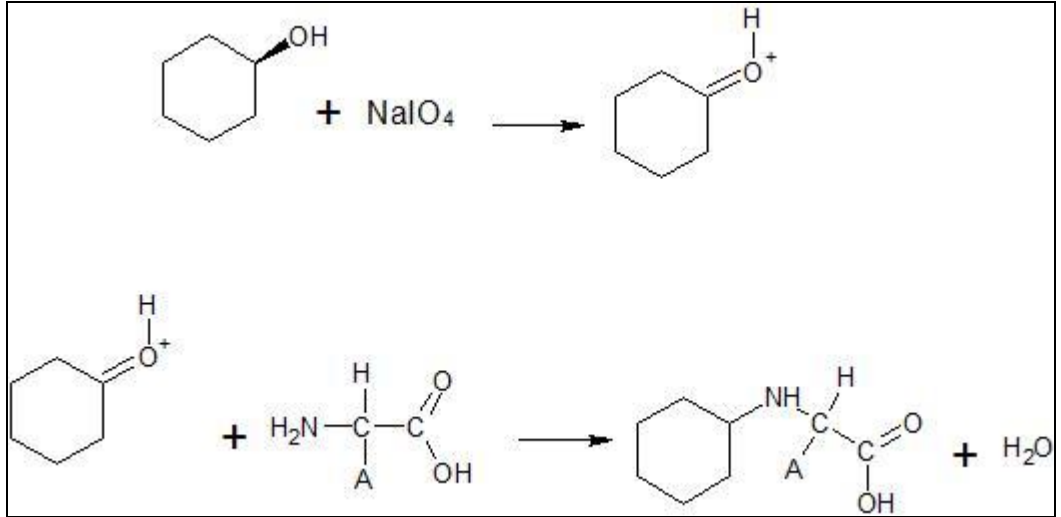
Konjugasyon reaksiyonuna başlamadan önce biyolojik molekülün şeker ucunu daha reaktif olan aldehit ucuna çevirmek gereklidir. Bu değişim, proteinlerin sadece istenen alana bağlanmasını sağlar. Aminler ile bağ kurmak istemeyen hidroksil gruplarını bağ kurmaya yatkın aldehitlere çevirmenin en kolay yolu periyodat oksidasyonu olarak bilinen yöntemdir. Reaksiyon sonunda biyomolekülün IUPAC numaralandırmasına göre

2 numaralı karbon atomunda aldehit grubu oluşur ve karbon atomlarından biri formaldehite dönüşüp biyomolekül zincirinde bir uç cis-glikol oluşumuna yol açar. Bu yöntem biyomolekül üzerinde seçici ve spesifik bir şekilde reaktif aldehitlerin kolayca ulaşılabilir bölgelerde oluşmasına yol açar ve bu sonraki reaksiyonların daha kolay bir şekilde oluşmasını sağlar. Proteinden dönüşen bir karbonhidrat polimeri kendiliğinden bir arabulucu kol barındırır bu da sonraki konjugatların oluşmasını kolaylaştırır [26].

Antijenlerin zayıf olan immunojenik yanıtlarını arttırmak, vücut içindeki ömürlerini uzatmak ve antikor oluşturabilmek için gerekli boyuta ulaşmasını sağlamak için lineer polimerlerle konjugasyonlarının gerçekleşmesi yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Konjugasyon işlemi için en sık kullanılan lineer polimerlere örnek olarak Poliakrilik asid (PAA), Poli-N-vinil-2-prolidon (PVP) ve Polisetilpiridin verilebilir. Konjugasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan ana etken elektrolit moleküllerin yüklü bölümleri arasındaki etkileşimlerdir. Polimer-peptit konjugasyonları için bu gruplar polimerlerin karboksil (-COOH) ve proteinlerin amino (-NH<sub>2</sub>) grupları arasındaki etkileşimlerdir. Proteinlerin fonksiyonel gruplarında bulunan yükler de konjugasyon reaksiyonunun verimini etkileyebilir. Biyomolekül-protein konjugasyonlarının sağladığı avantajlar;

- Biyomolekül modifikasyonu sağlamak ve hidrofobik olanların sudaki çözünürlüğünü arttırmak,
- Biyomoleküllerin bölgesel etkilerini arttırmak,
- Biyomoleküllerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini arttırmak,
- Biyomoleküllerin buldukları organizma içerisinde daha uzun süre etkili olmasını sağlamak; şeklinde sıralanabilir.

Sentetik biyomoleküller ile polielektrolitler arasında kurulan biyokonjugatların güçlü koruma özellikleri onları yeni nesil aşı gelişiminde ideal adaylar arasına koymuştur. Aynı şekilde bu aşular ile oluşturulan koruyucu antikorların ve patojenlerin barındırdığı antijenlerin oluşturduğu çökeltme reaksiyonları az hataya yer veren kolay ve ucuz tanı kitlerinin oluşturulması için idealdir.



Şekil 2. 8 Hidroksil grubu bulunan polimer ile proteinlerin aminoasitleri arasında kurulan konjugasyon reaksiyonun şematik gösterimi [16]

### KULLANILAN MALZEMELER

#### 3.1 DENEYSEL ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

- Finepipette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- WTW pH level 1 pH metre
- Sartorius CP 225D Hassas Terazi
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Viscotek 4 detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Shimadzu Diol 300 kolonu
- Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Parçacık Boyut Ölçüm Cihazı
- Shimadzu IR-Prestige Furier Transform Infrared Spektroflorometre

## 3.2 DENEYSEL ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

### 3.2.1 Asetat Tamponu (pH=5.0)

5,72 ml asetik asit, ultra saf su içerisinde toplam hacim 2 litre olacak şekilde seyreltilmiştir. Manyetik karıştırıcıda asetik asit çözeltisinin homojen olması sağlandıktan sonra 17,53 gr. NaCl eklenmiştir ve çözeltinin son pH değeri 5' e ayarlanmıştır.

### 3.2.2 PBS Tamponu (pH=5.0/7.0)

2,6807 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w=268,07$  g/mol) 500 ml ultra saf suda çözüldükten sonra 1,56 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $M_w= 156,01$  g/mol) 400 ml ultra saf suda çözülmüştür. Bu iki çözelti karıştırıldıktan sonra çözeltiye 8,766 gr NaCl eklenmiş ve karışımın pH'ı 7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışımın son hacmi ultra saf su ile 1 L olacak şekilde ayarlanmıştır.

## 3.3 DENEYSEL ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

### 3.3.1 Fourier Transform Infrared (FTIR)

1950 yılında Elliot ve Ambrose kızıl ötesi (infrared; IR) spektroskopinin proteinlerin ikincil yapıları hakkında bilgi elde etmek için kullanılabileceğini keşfetmiştir. Fakat bu '80'li yıllarda icat edilen **Fourier Transform Infrared** cihazının gelişmesine kadar yaygın bir şekilde mümkün olmamıştır. Infrared spektroskopisi eski ve geniş bir uygulama alanı olan bir analiz yöntemidir. Infrared spektrumundaki dalga frekansı moleküler titreşim hareketinin oluşturduğu frekans ile aynıdır ( $1-100\mu\text{m}$ ;  $10-10.000\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu), bu ortak frekans moleküllerin bu yöntemle incelenbilmesine olanak sağlar. Birçok analizde infrared spektrumunun orta bölgesi ( $4.000-400\text{ cm}^{-1}$ ) kullanılır. Bu bölgede metil veya metilen grubunda bulunabilen C-H bağlarının esnemesi ve amid bağlarında bulunabilen C=O bağlarının esneme hareketleri görülebilir. Sadece 3 atomdan oluşan bir molekülün oluşturduğu titreşim hareketi bile incelenmesi zor bir titreşim hareketi yapabilir, fazla sayıda atom içeren moleküller için binlerce titreşim hareketi olabilir.

Absorpsiyon bazlı diğer analiz yöntemlerinin aksine FTIR'da optik bir dalga boyunun ayrılması yoktur. Tüm ışığa interferometre denilen cihaza yönlendirilir, ışık buradan numuneye oradan da detektöre gider. Dalga boyları daha sonra matematiksel olarak detektörden alınan verilere göre hesaplanır; bu işlem bilgisayarlarla bile zor bir işlemdir [27].

Bu çalışmada FT-IR analizleri -OH gruplarının belirlenmesi amacıyla 3200-3650  $\text{cm}^{-1}$  tayflarında oluşan pikler ve karboksil gruplarının belirlenmesi için 1680-1850  $\text{cm}^{-1}$  tayflarında oluşan pikler incelenmiştir.

### 3.3.2 Moleküler Eleme Kromatografisi (Gel Permeation Chromatography (GPC))

Molekülleri birbirlerinden ayırmakta en sıkça kullanılan parametre moleküllerin moleküler ağırlığıdır. Moleküler ağırlığın yanı sıra molekülün şekli de ayırma işlemlerinde kritik rol oynamaktadır. Kromatografi çeşitli moleküllerin incelenmesi ve karakterizasyonu için en sık kullanılan ve en güvenilir yöntemdir. Bu yöntemde incelenecek moleküller bir **hareketli faz** içerisinde çözünür. Bu fazı oluşturan çözelti ilk önce incelenecek molekül olmadan kromatografi cihazından geçirecek base-line alınır. Daha sonra incelenecek molekülü barındıran hareketli faz **kolon** olarak bilinen **sabit faz**dan geçirilir. Moleküllerin bu sabit faz ile olan değişik ilişkileri kromatografi yönteminin molekülleri birbirinden ayırmakta iyi olmasının ana sebebidir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ya da diğer adıyla moleküler eleme kromatografisinde (SEC) moleküller büyüklüklerine göre jelin içinde bulunan deliklerin değişen delik genişlikleri vasıtasıyla ayrılır. GPC kolonun sonunda molekülleri analiz etmek için ultraviyole (UV), ışık saçılması (RALS) ve kırılma indisi detektörleri bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan protein ve polimerlerin moleküler ağırlıkları ve boyutları farklıdır. Proteinler polimerlere kıyasla daha küçük bir yapıya sahiptir bu da onların kolonda daha uzun süre kalmasına yol açacaktır fakat büyük bir yapıya sahip olan polimer kolon içindeki gözenekler ile daha az etkileşim içerisinde olacağı için kolondan daha kısa sürede ayrılacaktır [18], [28].

### 3.3.3 Zeta Potansiyel Ve Boyut Ölçümleri

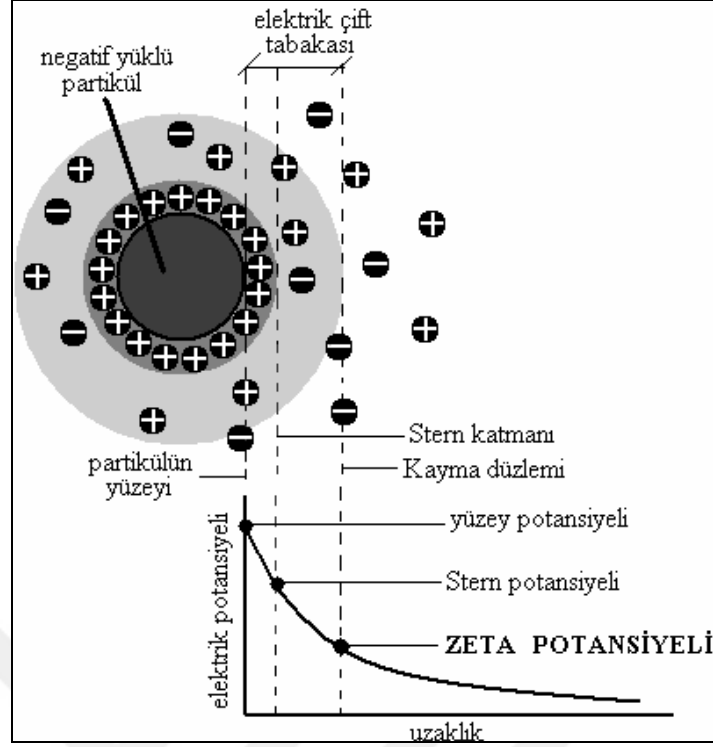
Çözelti içerisinde çözülmüş peptit, protein, polimer ya da bunların karışımlarının ortalama boylarını ölçmek için zeta potansiyelinden sıkça yararlanır. Ölçümler 633 nm dalga boyunda 4,0 Mv He-Ne lazer ile 25 °C'de Foton Kolerasyon Spektroskopisi Yöntemi ile yapılmıştır. Ortamın viskozitesi 0,8872 cP ve kırılma indisi 1.33 olarak alınmıştır. Bütün numuneler ölçüm öncesinde 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir. Dinamik Işık Saçılması yöntemiyle partikül boyutunun hesaplanması Stokes-Einstein (Denklemler 3.1) denkleminde dayanır [29]. Bu denklemde k; Boltzman sabiti, T; mutlak sıcaklık, η; çözücü viskozitesini temsil etmektedir.

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad (3.1)$$

Sulu çözeltiler içerisinde yüklü iyonlar arasındaki etkileşimler sonucu zıt yüklü moleküllerin hayali bir yüzeye yapıştığı ve aynı yüklü moleküllerin bu yüzeyden itildiği bilinmektedir, bu yüzeyin adı **Stern katmanı** olarak bilinir. Bu katmanın ilerisinde moleküller serbestçe difüze olabilmektedir ve bu alanın bir kısmı **kayma düzlemi** olarak bilinir; bu hayali düzlemde zıt yükle moleküller partiküle yaklaşmaya zorlanırken aynı yüklü moleküller partikülden uzaklaşacak şekilde hareket eder; bu düzlemin ötesinde ise moleküller elektrostatik etkileşimden bağımsız olarak hareket eder. Molekülün Stern bölgesindeki elektrik potansiyeline **Stern potansiyeli**, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise **Zeta potansiyeli** denir ve bu potansiyel Henry denkleminde (Denklemler 3.2) göre hesaplanmaktadır. Bu bağıntıda  $U_E$ ; elektroforetik hareketlilik, ε; ortamın dielektrik sabiti, η; ortamın viskozitesi, f(ka) ise Henry fonksiyonunu temsil etmektedir

$$U_E = \frac{2.\varepsilon.z.f.(ka)}{3.\eta} \quad (3.2)$$





Şekil 3. 1 Negatif yüklü parçacığın Zeta potansiyeli [25]

### 3.3.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- Enzime Bağlanan İmmünoemici Analiz)

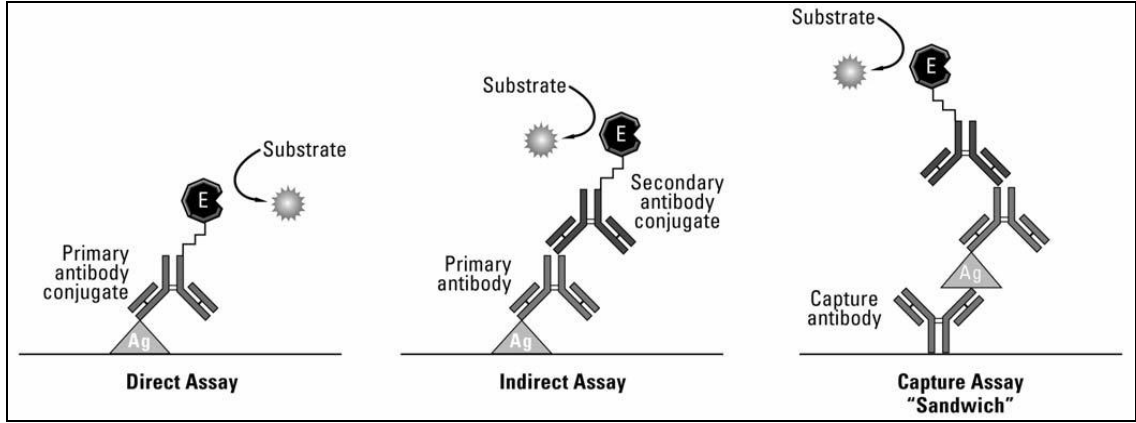
1971 yılında Engvall ve Perlmann tarafından geliştirilen bu yöntem çözeltiler içerisinde hedeflenen bir proteinin analiz edilmesinde ve miktarının bulunmasında kullanılır. İmmünolojide birçok yenilik getiren bu yöntemin medikal araştırmalarda sıkça kullanılmak ile birlikte gıdalarda alerjen moleküllerinin ve hastalıkların tespiti gibi ticari kullanımları da bulunmaktadır [30].

1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından geliştirilen antijen-spesifik monoklonal antikorların üretilmesi; karmaşık protein karışımları içerisindeki bireysel moleküllerin tespitini daha da verimli kılmıştır. İlk çalışmalarda molekülleri etiketlemek amacıyla radyoaktif izotoplar ile etiketlenmiş antikorlar kullanılsa da zamanla sağlık açısından daha uygun olan floresant boyalı antikorlar kullanılmaya başlanmıştır. Standart bir ELISA işlemi 4 temel basamaktan oluşur.

- 1. Kaplama:** Antijenlerin direk veya dolaylı olarak polistiren mikroplate çukur duvarlarına tutturulması.
- 2. Plate Blokesi:** Farklı moleküllerin duvarlarda bulunan serbest bağlanma bölgelerini doldurmak için eklenmesi.
- 3. Belirleme:** Antijenlerin spesifik antikorlarına bağlanması için inkübasyonu.
- 4. Sinyal Ölçümü:** Antikora bağlanmış etiketten elde edilen sinyalin ölçümü [30], [31].

Tipik bir analizde bir protein karışımı içerisinde bulunan antijen direk veya dolaylı adsorpsiyon ile antikor aracılığıyla mikroplate duvarına tutturulur. Plate daha sonra bloke edilir ve antijen belirlenir. Bu belirleme floresant boya aracılığıyla veya sinyal üreten bir enzim aracılığıyla olabilir. Enzimin kullanıldığı durumlarda uygun substrat eklenmelidir. Üretilen sinyal antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Basamaklar arası yıkama yapma sadece yüksek bağlılık gösteren moleküllerden sinyal alınma olasılığını artırır [30], [32].

Antijenlerin mikroplate duvarlarına immobilize edilmesinin birkaç yolu vardır. Birçok protein bazik ortamda polistiren duvarlara sıkıca bağlanabilmektedir. Fakat istenen antijenin miktarı az ise veya duvara bağlanma yeteneği yoksa **dolaylı** veya **sandevic** bağlama yöntemi kullanılabilir. Dolaylı bağlama yönteminde istenen antijene özel antikor duvara bağlanır. Bu şekilde istenen antijen antikor antijen sayesinde sabitlenmiş olur. Sandevic bağlama yönteminde ise iki farklı antikor kullanılır; bu antikorlardan biri duvara diğeri de karmaşık protein çözeltisinde az miktarda da olsa bulunan antijene bağlanır. Bu yöntemde monoklonal veya poliklonal antikorla kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı karmaşık bir çözeltiden bir antijenin izole edilebilmesini sağlarken poliklonal antikorlar birçok antijenin karışımdan izole edilebilmesini sağlar [30], [32], [33].



Şekil 3. 2 Farklı ELISA metotlarının çalışma prensipleri [30]

### 3.4 KONJUGASYON

Önceki yapılan çalışmalarda BSA proteini ve P(VP-co-AA) ko-polimeri arasında yapılan konjugasyonlar farklı oranlarda oluşturulup incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin bu tezde yapılan çalışmaların birbirleriyle paralel olması beklenmektedir. Bu çalışmada da en iyi konjugasyon oranını bulmak için konjugasyonu oluşturan moleküller farklı oranlarda birbirleriyle karıştırılmıştır [29]. Oluşturulan BSA-LPS ve P(VP-co-AA)-HSA konjugatları fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Solution-PBS; pH=7.0) içerisinde, P(VP-co-AA)-HSA kompleksleri ise 0,15 M NaCl içeren sodyum asetat tamponu (pH=5.0) içerisinde çözülmüştür. Konjugasyonu oluşturan etkenlerin oranları aşağıda verilen denklem eşliğinde hesaplanmıştır. Protein-polimer konjugasyonları değişen mol oranlarında ideal sonucu bulmak amacıyla yapılmıştır. Denklem 3.1 ve 3.2’de gösterilen eşitlikler ilk önce polimeri sabit tutup protein mol miktarının arttığı solüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır, sonrasında ise aynı eşitlikler sabit protein mol sayısı ve değişen polimer miktarını hesaplamak için kullanılmıştır; bu şekilde en uygun konjugasyon miktarlarının bulunması hedeflenmiştir. Denklem 3.1 ve 3.2’de  $n$ ; mol sayısı,  $c$ ; derişim (mg/ml) ve  $M_w$  moleküler Ağırlığı’nı (Da) sembolize etmektedir [29].

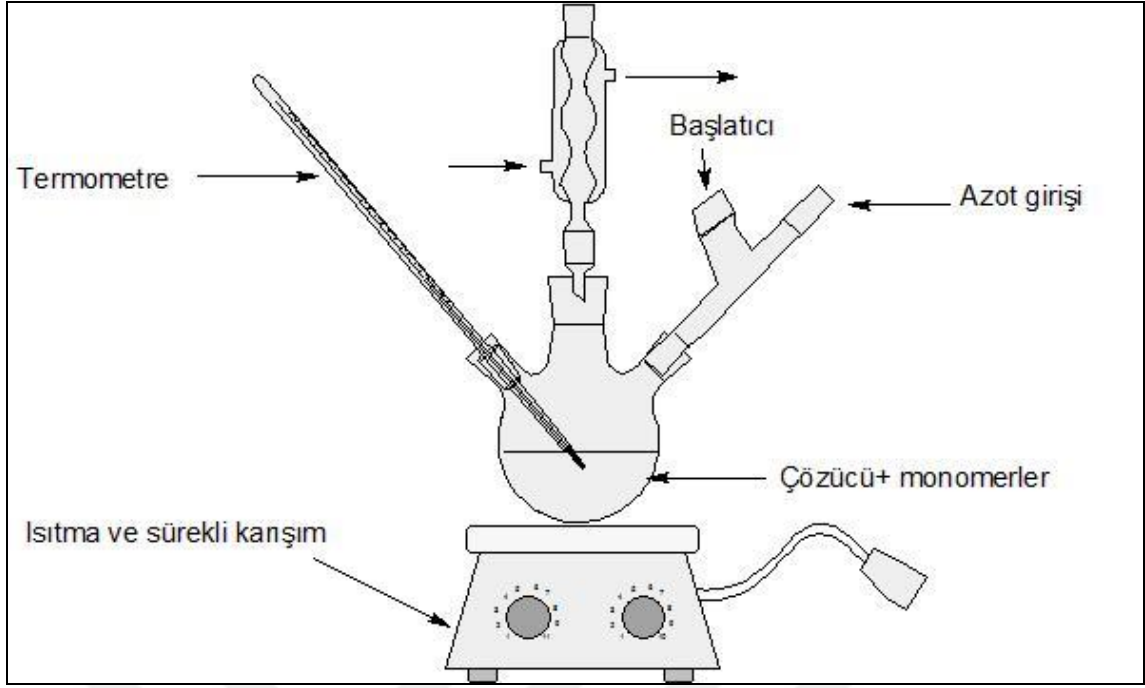
$$n_{BSA}/n_{LPS} = (c_{BSA} \cdot M_{wLPS}) / (c_{LPS} \cdot M_{wBSA}) \quad (3.3)$$

$$n_{HSA} / (n_{P(VP-co-AA)}) = (c_{HSA} \cdot M_{wP(VP-co-AA)}) / (c_{P(VP-co-AA)} \cdot M_{wHSA}) \quad (3.4)$$

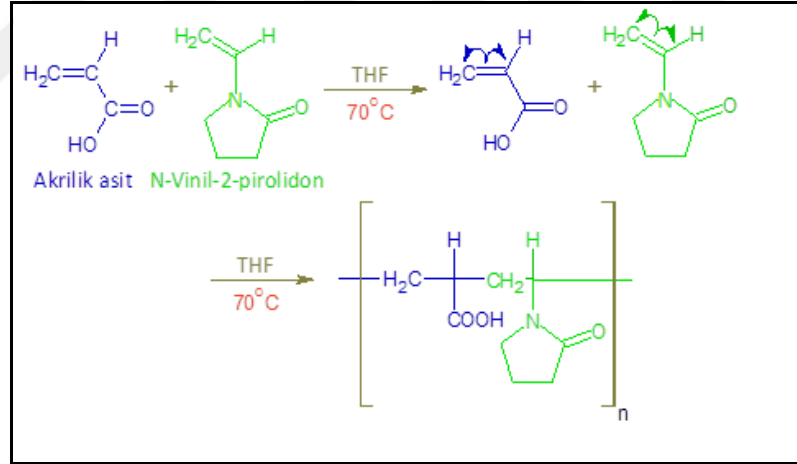
### DENEYSEL KISIM

#### 4.1 P(VP-co-AA ) SENTEZİ

Çalışma esnasında denenen polimerden biri olan Poli-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik Asit polimeri (P(VP-co-AA)) laboratuvarımızda sentezlenmiştir. Şekil 4.2 toplanan veriler doğrultusunda ChemSketch yazılımı ile elde edilmiştir. Akrilik asit ve vinilpirrolidon-2 tetrahyrdofuran (THF) içerisinde karıştırıldıktan sonra benzoil peroksit ve kobalt naftanat ortama eklenmiştir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 °C' de tutulmuştur. Polimerizasyon N<sub>2</sub> gazı varlığında 3 saat sürmüştür. VP-AA kopolimeri kirli beyaz kristalin katı şeklinde oluşmuştur. Reaksiyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edilmiştir. Çökelti filtre edilip ve 40 °C' de vakum etüvde kurutulmuştur. Reaksiyon sonucunda verim % 98,5 dir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilerek, molekül ağırlığı (Mw) hesaplaması yine 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır. Bileşenlerin molar oranları VP:AA= 2:1 olacak şekilde polimer sentezlenmiştir ve moleküler ağırlığı 60 kDa olarak bulunmuştur. Poliakrilik asit (PAA) birincil ve ikincil immün yanıtlarının oluşmasını sağlayan güçlü bir adjuvandır ve birçok çalışmada immün yanıtlarının incelenmesi için iyi bir model olmuştur. PAA'nın toksik özelliğini azaltmak için N-vinil-2-pirolidon ile kopolimerizasyonu Petrov ve arkadaşları tarafından incelendiğinde olumlu sonuç elde edilmiştir [25].



Şekil 4. 1 Termal polimerizasyon yönteminin şematik gösterimi [25]



Şekil 4. 2 N-vinil pirolidon akrilik asit kopolimerinin [P(VP-co-AA )] sentez şematiği

## 4.2 KOMPLEKS OLUŞUMLARI

HSA proteini ve P(VP-co-AA) kopolimeri arasında gerçekleşen kompleks reaksiyonları; Denklem 3.2’de verilen bağlantıya göre belirlenen oranlarda gerçekleştirilmiştir. Protein ve kopolimer stok çözeltileri hazırlandıktan ve homojen bir karışım elde

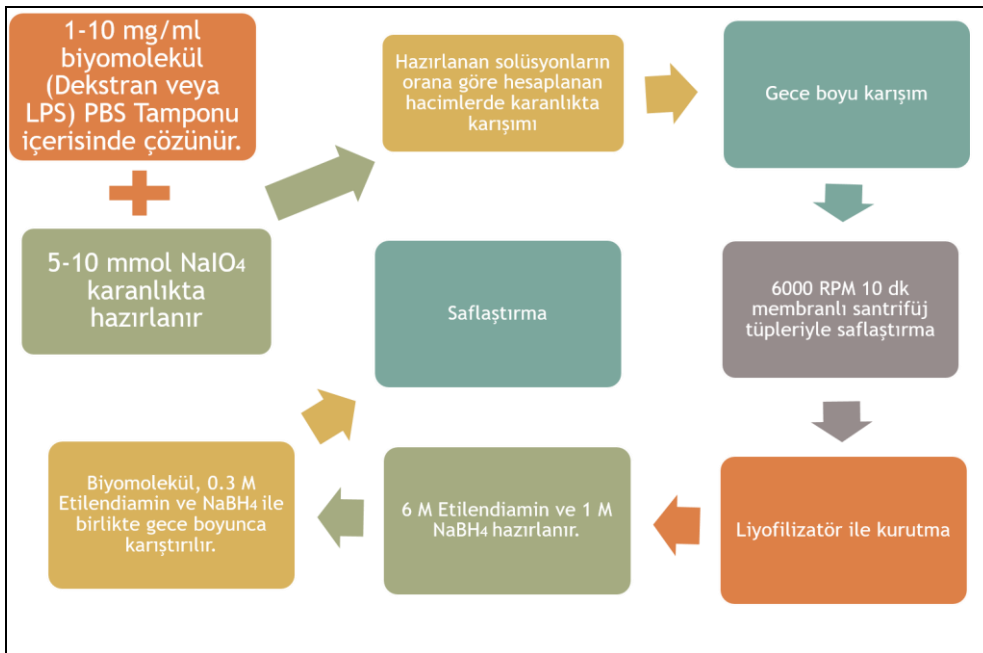
edildikten sonra gerekli hacimlerde çözeltiler yeni bir ortamda bir araya getirilmiş ve hacimleri asetat tamponu ile tamamlanmıştır. Kompleksler gece boyu +4'de karıştırıldıktan sonra kompleks oluşumunun başarısı GPC analizi ile ölçülmüştür.

#### 4.3 KONJUGASYON REAKSİYONLARI

Tezin amacı için yapılacak konjugasyon reaksiyonları kabaca üç farklı aşamada incelenebilir. Birinci aşama; biyolojik moleküllerin hidroksil gruplarını aldehite çevirmektir. Bunu başarmak için 1-10 mg/ml derişim değerleri arasında değişen biyomoleküllere 5-10 mmol değerleri arasında değişen sodyum periyodat eklenmiştir. Biyomolekül çözeltileri fosfat tamponları (PBS) içerisinde hazırlanmıştır. Biyomoleküller 2 saat boyunca karıştırıldıktan sonra karanlıkta hazırlanan sodyum periyodat çözeltileri yine karanlıkta biyomolekül çözeltilerine eklenmiştir. Bu karışım gece boyunca karıştırılıp aldehitlenmiş biyomolekülleri aldehitlenmemiş biyomoleküllerden ayırmak için 6000 RPM'de 10 dakika boyunca 3 kere membranlı santrifüj yapılmıştır. Aldehitlenmiş biyomoleküller gece boyunca dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. İkinci aşama biyomoleküllerin amid gruplarının modifikasyonudur. Bunu yapmak için ilk önce 6 M etilendiamin (EDA) stok çözeltisi hazırlanmıştır, bu çözeltinin pH'ını 7'ye çekmek için HCl çözeltisi kullanılmıştır. 1 M sodyum borohidrit ( $\text{NaBH}_4$ ) çözeltisi hazırlanmıştır, bu molekül biyomoleküllerde çift bağ kurulmasını sağlar. Daha sonra aldehitlenmiş biyomolekül 0.3 M olacak şekilde PBS'de eklenmiştir. Gece boyunca karıştırıldıktan sonra saflaştırma yapılmıştır. Üçüncü aşamada taşıyıcı molekül olan BSA proteini biyomolekül ile 1:1 oranda olacak şekilde eklenmiştir. BSA proteinin denatüre olmasını engellemek için karışıma yavaşça eklenmiştir. Bu karışım pH'ı 4.8-5.2 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Konjuge edilecek moleküller 2 saat yavaşça karıştıktan sonra ortama EDC eklenmiştir. EDC toksik ve hızlıca nemlenen bir kimyasal olduğu için hızlı ve dikkatli bir şekilde eklenmelidir. Bu karışım +4°C'de gece boyunca karıştırıldıktan sonra pH 7.2'ye çekilmiştir (Şekil 4.3). Bu aşamadan sonra oluşmuş olan konjugatlar analiz edilmiştir.

Tezde yapılacak olan konjugasyon, çok aşamalı konjugasyon yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemde ilk aşama Dekstran veya LPS'nin hidroksil uçlarını aldehit gruplarına çevirmektir, P(VP-co-AA) kopolimerinin kendisinde karboksil grupları bulunduğu için bu

aşama P(VP-co-AA)'ya uygulanmamıştır. Hidroksil gruplarını, aldehit gruplarına çevirmekteki amaç bu grupların hidroksil gruplarına göre daha yüksek bağlanma isteği olmasıdır. Bu değişimi gerçekleştirmek için moleküller sodyum periyodat ( $\text{NaIO}_4$ ) bileşiği ile oksidize edilerek bahsi geçen protokol eşliğinde aldehite çevrilmiştir. Daha sonra oksitlenmiş Dekstran ve/veya LPS'nin karbonil grupları etilendiamin ve sodyumborohidrit ( $\text{NaBH}_4$ ) etkisiyle indirgenerek aminlenmiştir. Daha sonra oluşan biyomolekül BSA proteini ile konjuge edilmek için beraber karbodiimid çapraz bağlayıcısı varlığında karıştırılmıştır [13]. Polimer ve protein uç modifikasyonlarının gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleştiği ise ne derecede gerçekleştiğini anlamak için FTIR cihazı kullanılmıştır. FTIR cihazı bu değişimleri moleküllerin titreşim hareketlerini ve bu hareketlerdeki değişimleri analiz ederek ölçer. Dekstran molekülü okside oldukça  $1731. \text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda artan bir absorpsiyon gösterir. Bu artış polimerin hidroksil grubunun aldehite çevrilmesinden kaynaklı olduğu için benzer etkinin LPS polimerinde olması beklenmektedir. Elde edilen LPS miktarı kısıtlı olduğu için, hidroksili aldehite çeviren ideal polimer-sodyum periyodat oranı Dekstran ile bulunup bu oran LPS polimerine uygulanacaktır (üst ve alt sapma değerleri göz önünde bulundurularak) [34].



Şekil 4. 3 LPS-BSA konjugatlarının gerçekleştirilen konjugasyon aşamaları

### ANALİZ SONUÇLARI

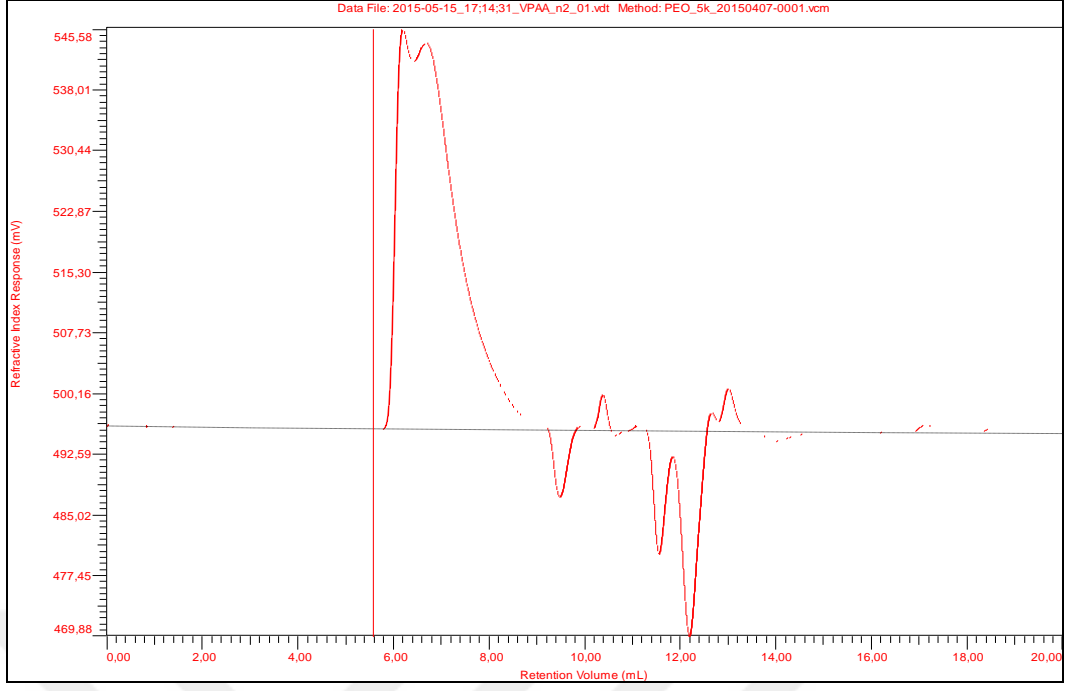
#### 5.1 P(VP-co-AA) POLİMERİNİN KARAKTERİZASYONU

Sentezlenen P(VP-co-AA) polimerinin karakterizasyonu, GPC, Zetasizer ve FT-IR ile gerçekleştirilmiştir.

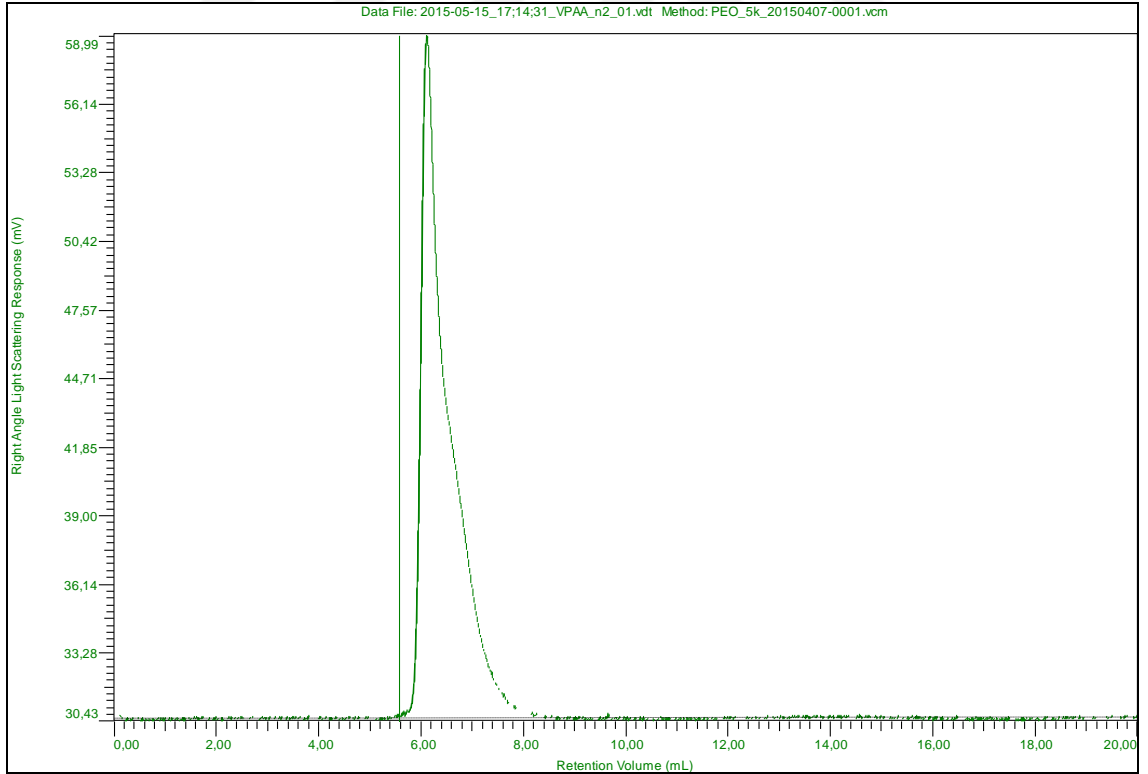
##### 5.1.1 GPC ANALİZLERİ

P(VP-co-AA) polimerine ait GPC kırılma indisi kromatogramı Şekil 5.1'de ve GPC RALS kromatogramı Şekil 5.2'de verilmiştir. Kırılma indisi kromatogramından faydalanılarak hesaplanan molekül ağırlığına ait tayin grafiği Şekil 5.3'te verilmiştir.

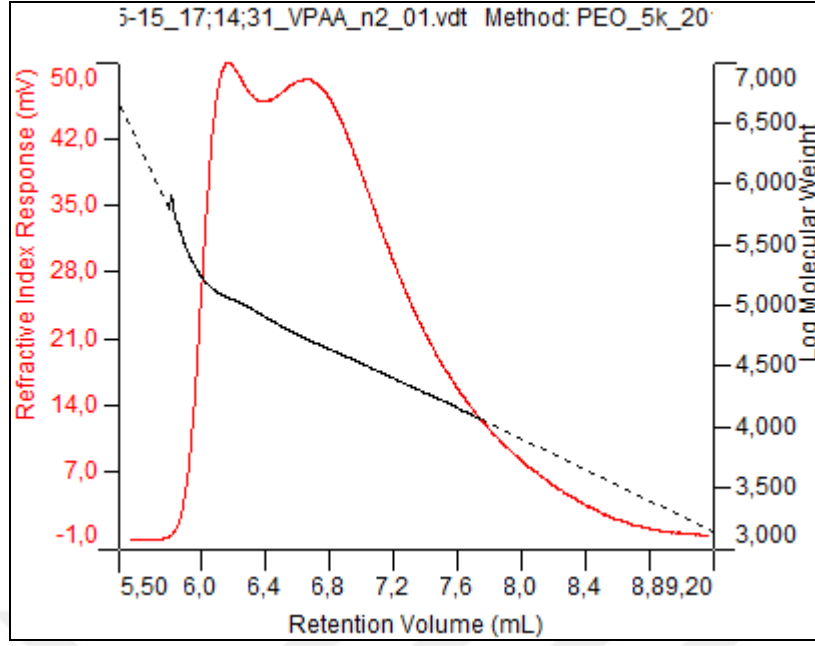




Şekil 5. 1 Poli (N-Vinil-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen Kırılma İndisi Kromatogramı



Şekil 5. 2 Poli (N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen Işık Saçılması Kromatogramı

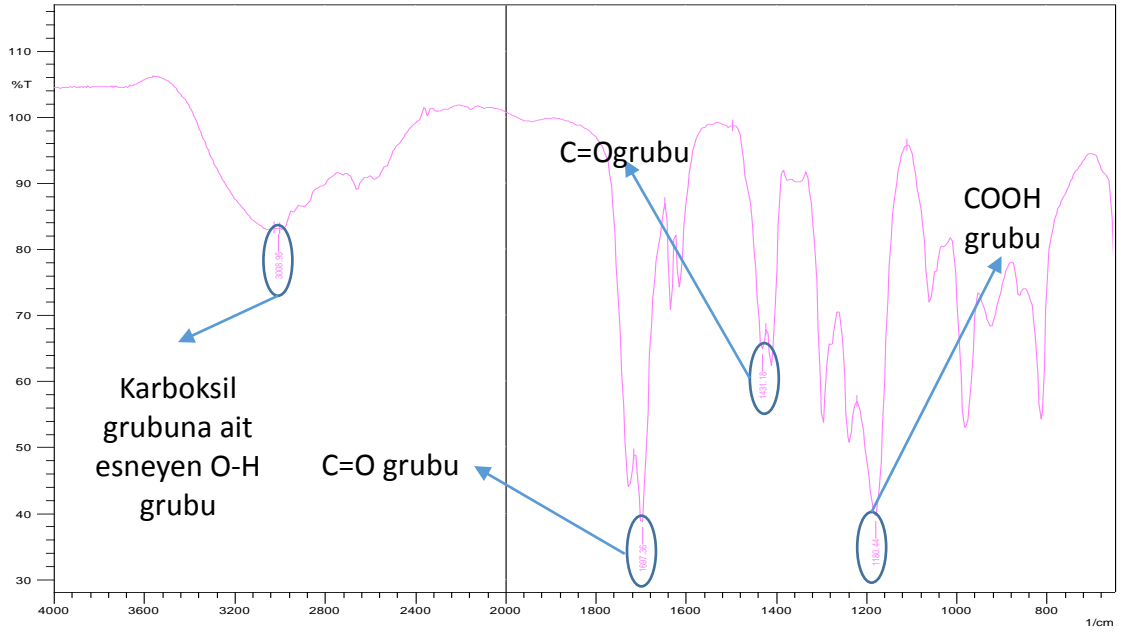


Şekil 5.3 Poli (N-Vinil-pirolidon-ko-Akrilik-Asit) Polimerinin GPC'den elde edilen veriler doğrultusunda Molekül Ağırlığı Tayini

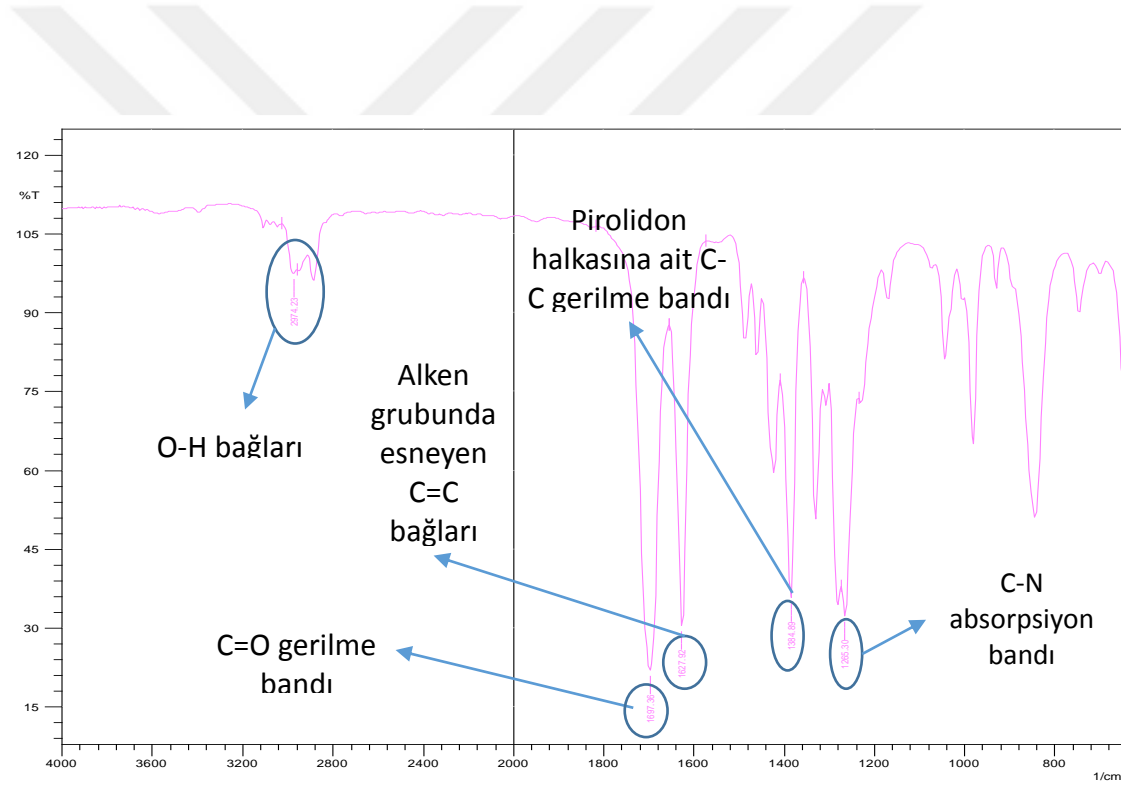
Şekil 5.3'teki molekül ağırlığı tayininden  $M_w = 60,754$  Dalton,  $M_n = 27.238$ , PDI değeri  $(M_w/M_n) = 2.230$  olarak hesaplanmıştır.

### 5.1.2 FT-IR ANALİZLERİ

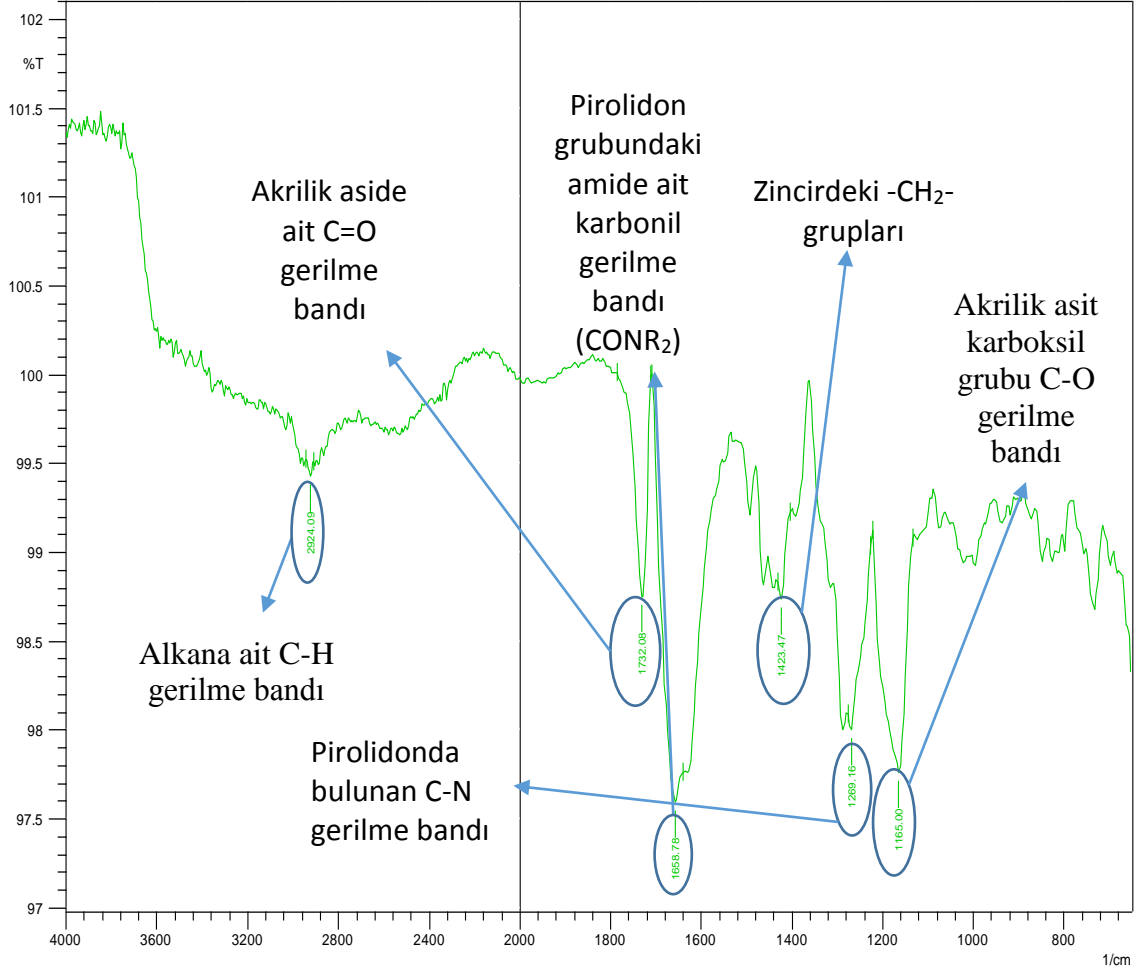
Akrilik Asit, Vinil Pirolidin monomerlerinin ve P(VP-co-AA) kopolimerinin FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 5.4-5.6'da verilmiştir.



Şekil 5. 4 Akrilik Asidin FT-IR spektrumu



Şekil 5. 5 Vinil Piriolidonun FT-IR spektrumu

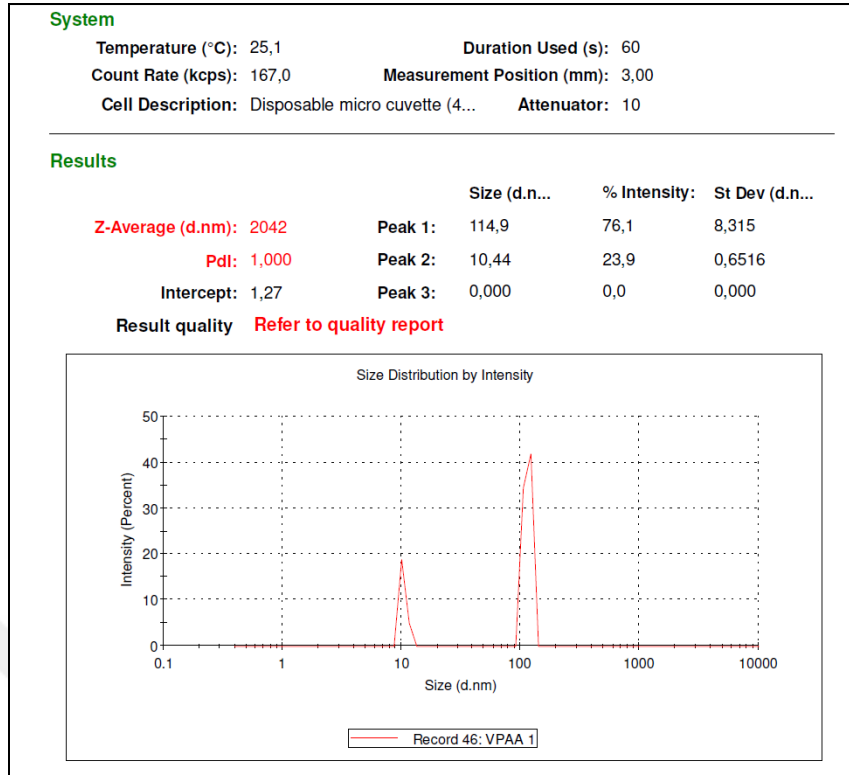


Şekil 5. 6 P(VP-co-AA) Polimerinin FT-IR spektrumu

P(VP-co-AA) polimerizasyonunun gerçekleştiğini doğrulamak için yapılan FT-IR analizi  $1600-1750\text{ cm}^{-1}$ ,  $1170-1350\text{ cm}^{-1}$  ve  $1400\text{ cm}^{-1}$  tayflarında pik vermiştir.

### 5.1.3 ZETASİZER ANALİZLERİ

P(VP-co-AA) kopolimerine ait ZetaSizer cihazından elde edilen boyut analizi Şekil 5.7’de verilmiştir.



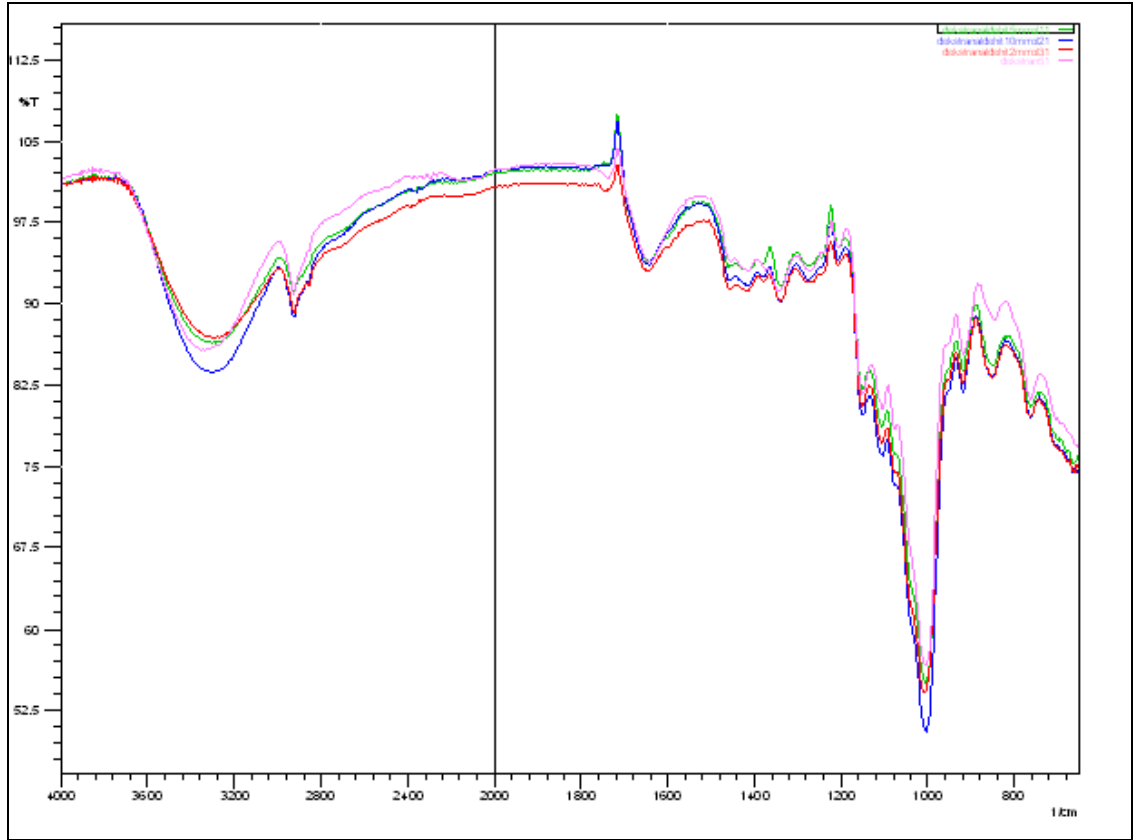
Şekil 5. 7 P(VP-co-AA) kopolimerine ait boyut analizi (şiddet)

Şekil 5.7'de gösterilen tablo incelendiğinde P(VP-co-AA) kopolimerinin Z-Ave değeri 2042 (d.nm) olarak hesaplanmıştır.

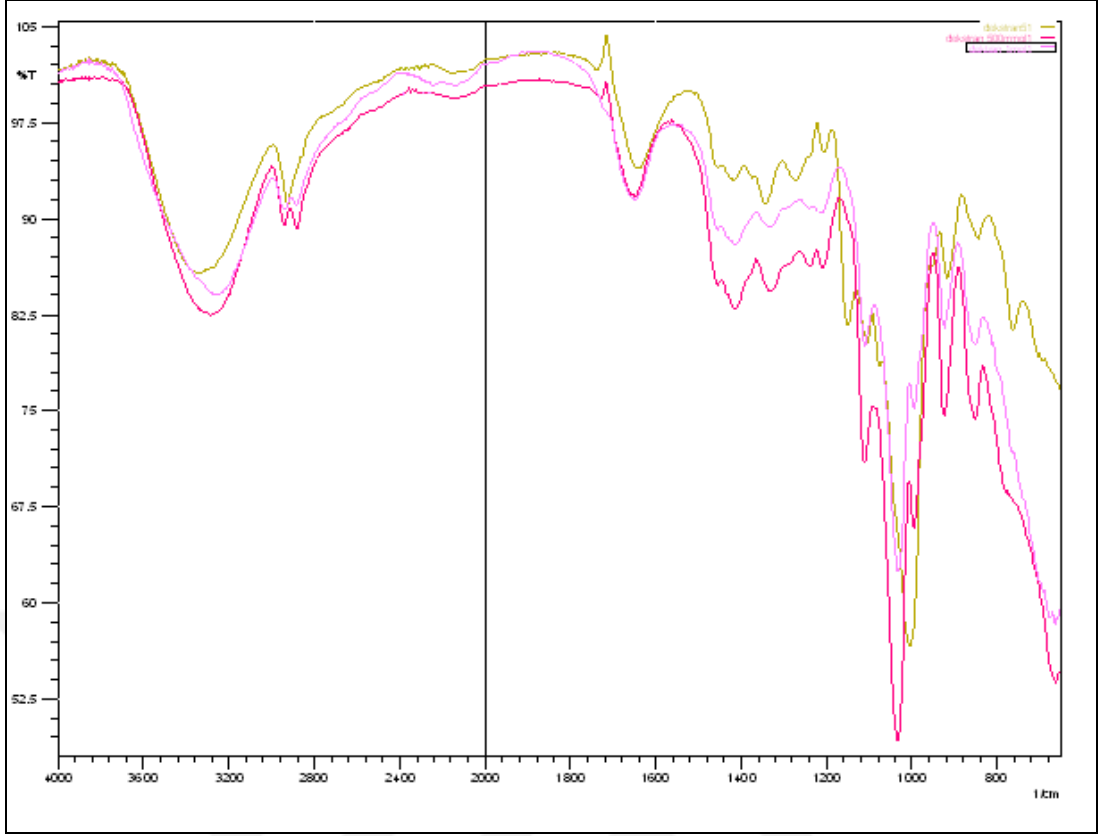
## 5.2 DEKSTRAN ALDEHİT TÜREVİNİN OLUŞTURULMASI

Dekstran polimerine ait değişen mol miktarlarında  $\text{NaIO}_4$  (2 mM, 5mM ve 10 mM) ile gerçekleştirilmiş FT-IR analizi Şekil 5.8'de saf Dekstran ile kıyaslamalı olarak verilmiştir.

## 5.2.1 FTIR ANALİZLERİ



Şekil 5. 8 Dekstranın 2mM, 5 mM ve 10mM NaIO<sub>4</sub> ile oksidasyonunun dekstran ile kıyaslamalı FTIR analizi

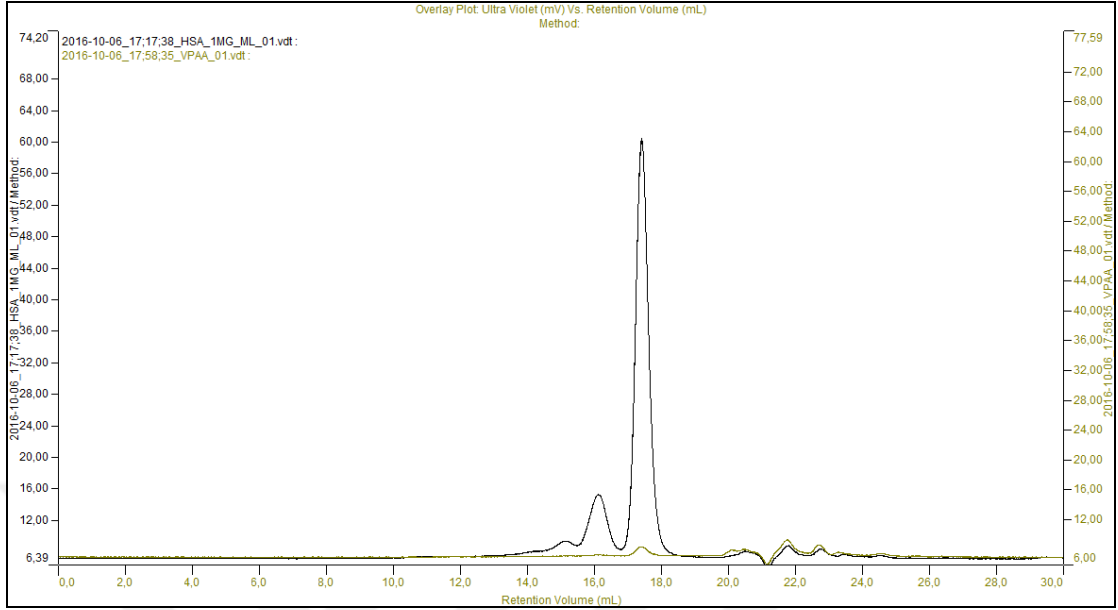


Şekil 5. 9 Dekstranın 500 mM ve 1 M NaIO<sub>4</sub> ile oksidasyonunun dekstran ile kıyaslamalı FTIR analizi

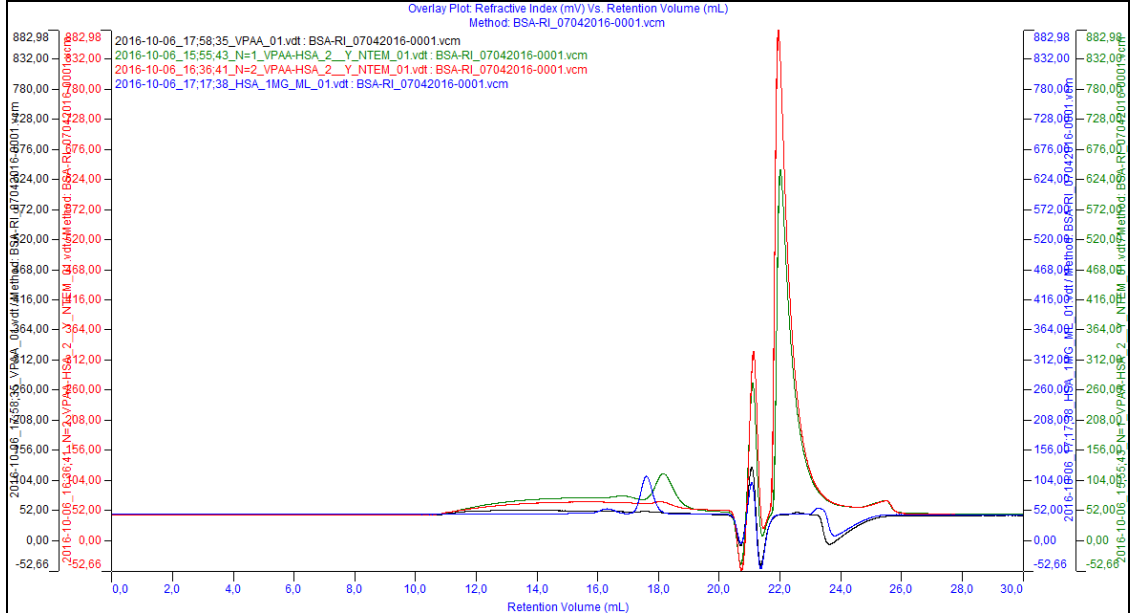
### 5.3 HSA-P(VP-co-AA) KONJUGATLARININ ANALİZİ

HSA ve P(VP-co-AA) ayrı ayrı çözüldükten sonra birbirleriyle EDC yöntemiyle  $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA}$  oranları 1 ve 2 olacak şekilde konjuge edilmiştir.

### 5.3.1 GPC ANALİZLERİ

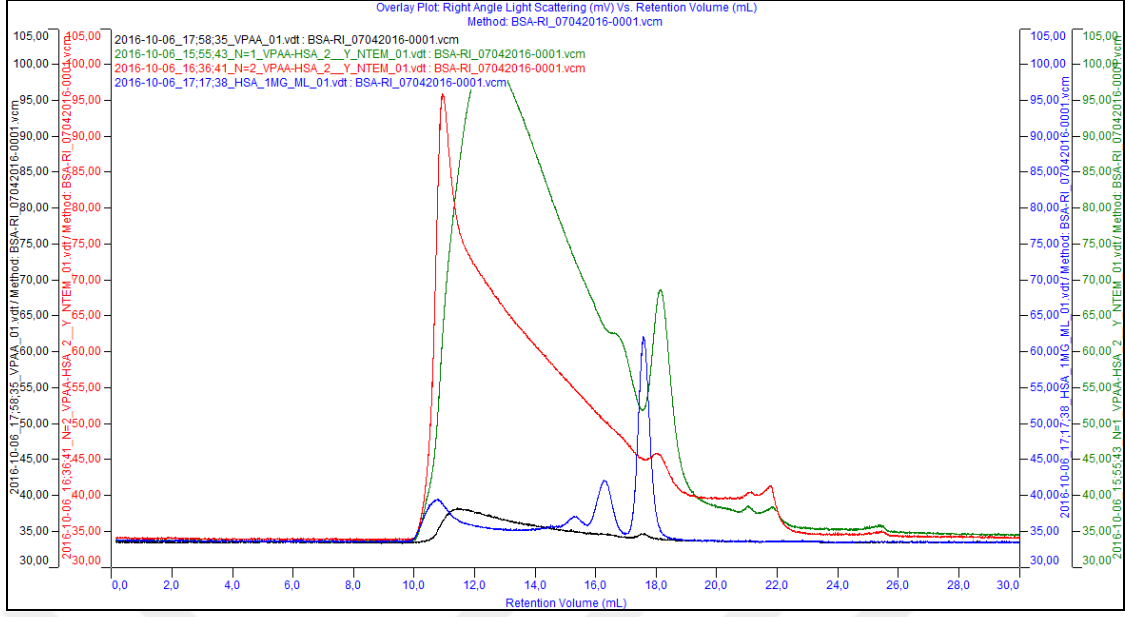


Şekil 5. 10 Saf HSA ve P(VP-co-AA) 'nın GPC analizi (UV)

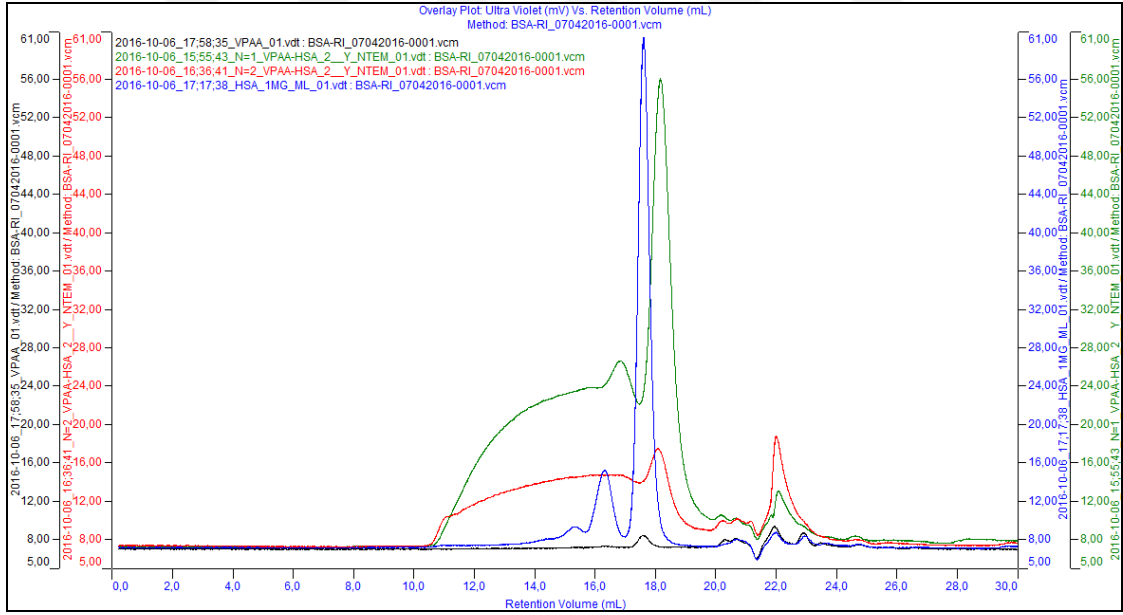


Şekil 5. 11 HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin  $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$  ve  $2$  oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (Kırılma indisi)





Şekil 5. 12 HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin  $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$  ve  $2$  oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (Işık Saçılması)

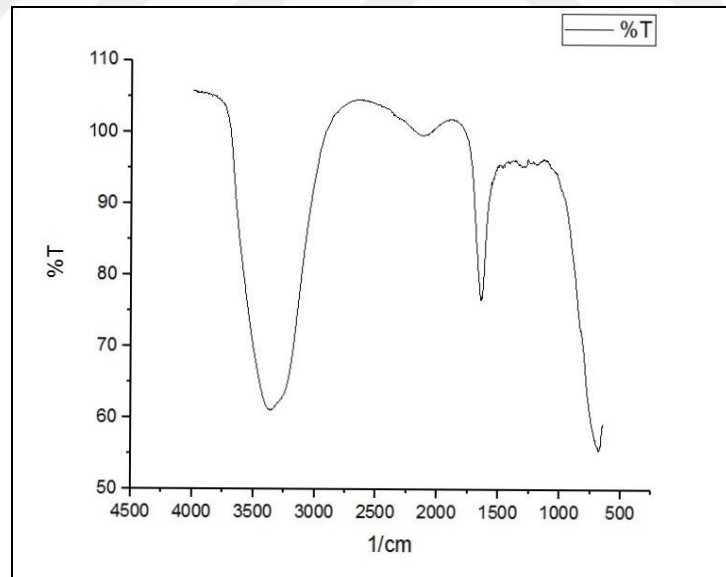


Şekil 5. 13 HSA, P(VP-co-AA) ve bu moleküllerin  $n_{P(VP-co-AA)}/n_{HSA} = 1$  ve  $2$  oranlarıyla oluşturdukları konjugatların GPC analizi (UV)

## 5.4 LPS-BSA KONJUGATLARININ ANALİZİ

Slovakya'dan izole edilerek temin edilmiş olan *C.burnetii* 'ye ait LPS biyomolekülü BSA proteini ile EDC çapraz bağlayıcı yöntemi ile 1:1 oranında konjuge edilmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen konjuge molekül; FT-IR, GPC ve ZetaSizer cihazlarıyla analiz edilmiştir. Bu analizlerin sonuçları sırasıyla aşağıda verilmiştir. Tanı kiti ve olası sentetik aşı oluşturma amacıyla gerçekleştirilen konjugasyonların ELISA çalışmaları TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM)'nde Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu tesiste bulunan Balb/c farelerine aşılama yapıldıktan ve bağışıklık sisteminin yanıt oluşturmaları için beklendikten sonra kan örnekleri alınmıştır. Bu kan örnekleri daha sonra konjugatlar ile oluşturulan İndirekt ELISA yöntemiyle analiz edilip alınan numunelerdeki antikor seviyeleri absorbans değerleri ile ilişkili olacak şekilde ölçülmüştür.

### 5.4.1 FTIR ANALİZİ

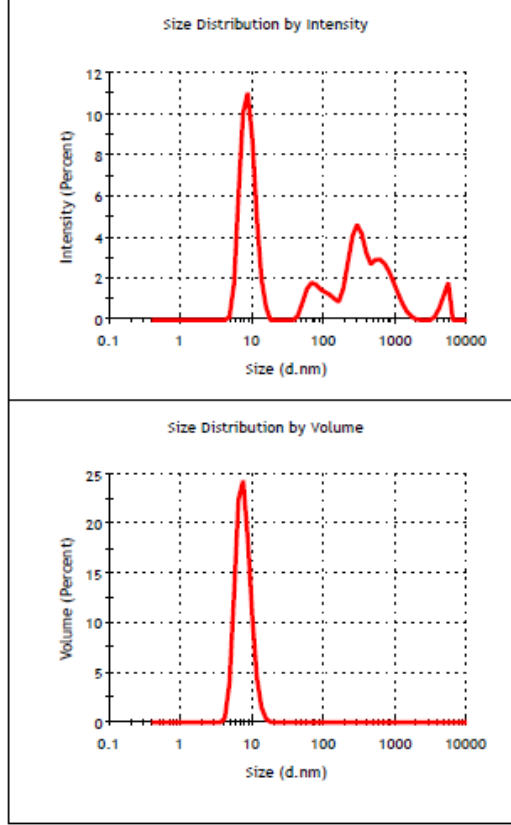


Şekil 5. 14 Elde edilen konjugatın FT-IR spektrumu

Şekil 5.14' te görüldüğü gibi 1680-1850  $\text{cm}^{-1}$  tayflarında ve 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  tayflarında pikler elde edilmiştir.

#### 5.4.2 ZETA ÖLÇÜMLERİ

BSA proteininin boyutları grafik olarak gösterimi Şekil 5.15'de ve BSA proteininin yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri çizelge cinsinden Çizelge 5.1' de verilmiştir.



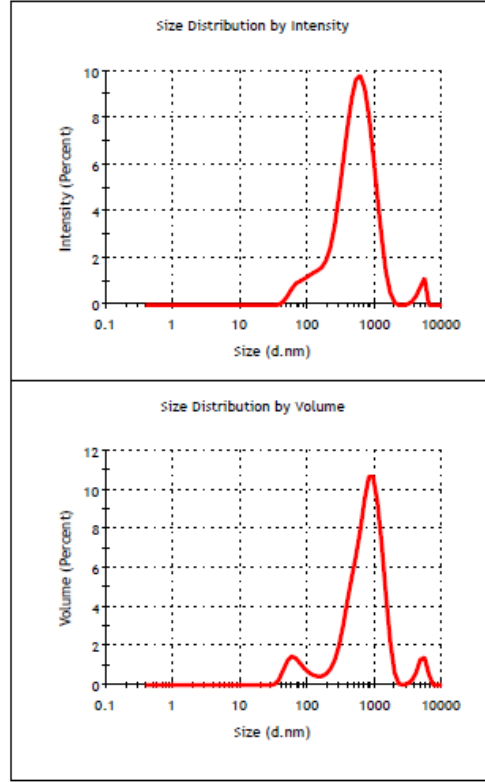
Şekil 5. 15 BSA proteininin boyutlarının grafik olarak gösterimi

Çizelge 5. 1 BSA proteininin yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri

Intensity					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
249	8,932	43,9	2,108	308,1	271,2
Volume					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
249	7,737	99,8	1,905	72,69	397,3

Çizelge 5. 2 Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri

No	Z-Ave d.nm	Pdl	Pdl Width d.nm	MCR kcps	CumFitEr
249	115,5	0,551	85,77	120,9	0,0323



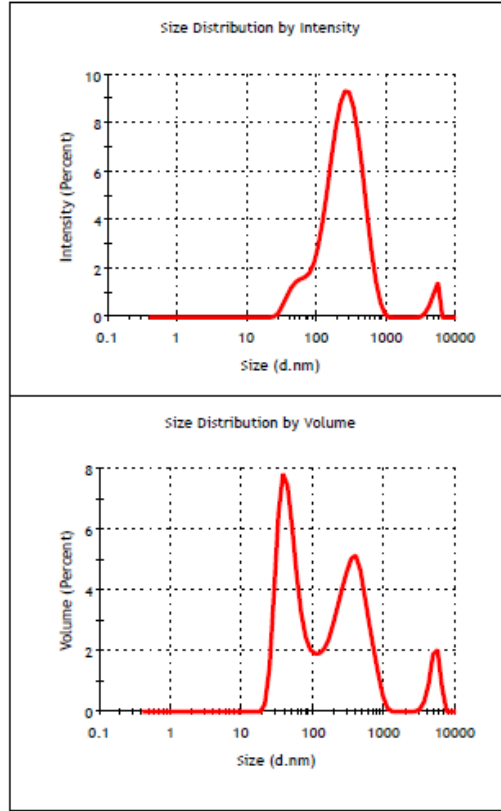
Şekil 5. 16 LPS biyomolekülünün boyutlarının grafik olarak gösterimi

Çizelge 5. 3 LPS biyomolekülünün yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri

Intensity					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
60	573,5	97,5	331	4957	0
Volume					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
60	74,3	8,6	27	824,9	820,8

Çizelge 5. 4 Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri

No	Z-Ave d.nm	Pdl	Pdl Width d.nm	MCR kcps	CumFitEr
60	401,6	0,455	270,9	299,9	0,00296



Şekil 5. 17 LPS-BSA konjugatlarının boyutlarının grafik olarak gösterimi

Çizelge 5. 5 LPS-BSA konjugatlarının yoğunluk ve hacim cinsinden boyut değerleri

Intensity					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
254	271,1	96,9	159,8	4975	0
Volume					
No	Peak 1 d.nm	Area Percent	Width d.nm	Peak 2 d.nm	Width d.nm
254	49,59	46,6	20,13	360,4	804,6

Çizelge 5. 6 Zetasizer ölçümleri sonucunda Z-ave cinsinden elde edilen boyut ölçümleri

No	Z-Ave d.nm	Pdl	Pdl Width d.nm	MCR kcps	DCR kcps	CumFitEr
254	182,9	0,477	126,3	280,8	1030,2	0,00587

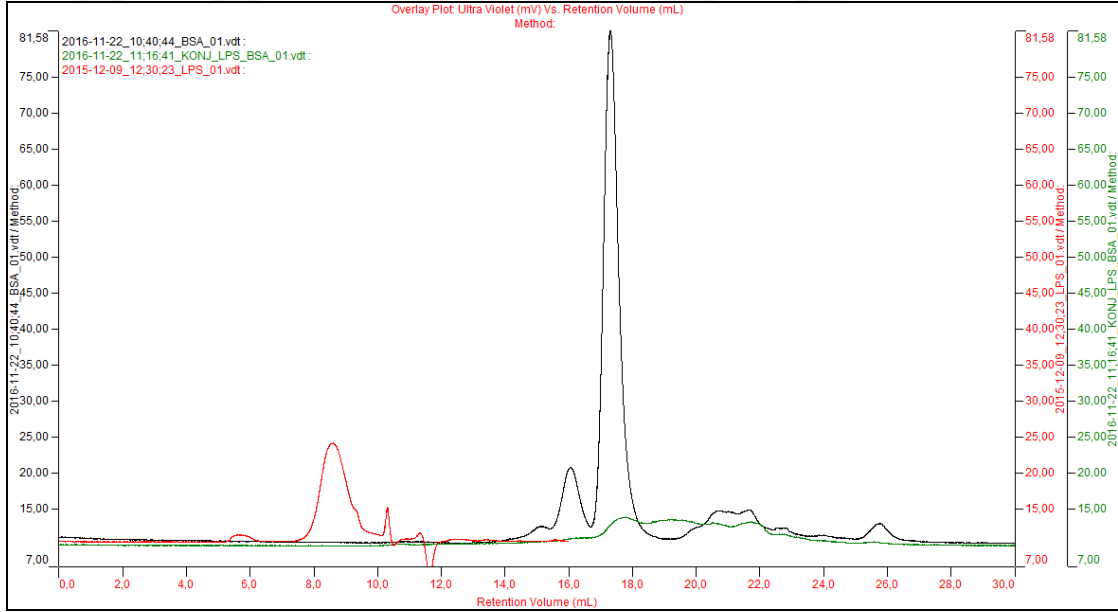
Çizelge 5. 7 BSA proteinin Zeta Potansiyel Değerleri

BSA			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-9,51	Peak 1:	0	0	0
Zeta Deviation (mV):	0	Peak 2:	0	0	0
Conductivity (mS/cm):	18,8	Peak 3:	0	0	0
Result Quality:	Good				

Çizelge 5. 8 Konjugatın Zeta Potansiyel Değerleri

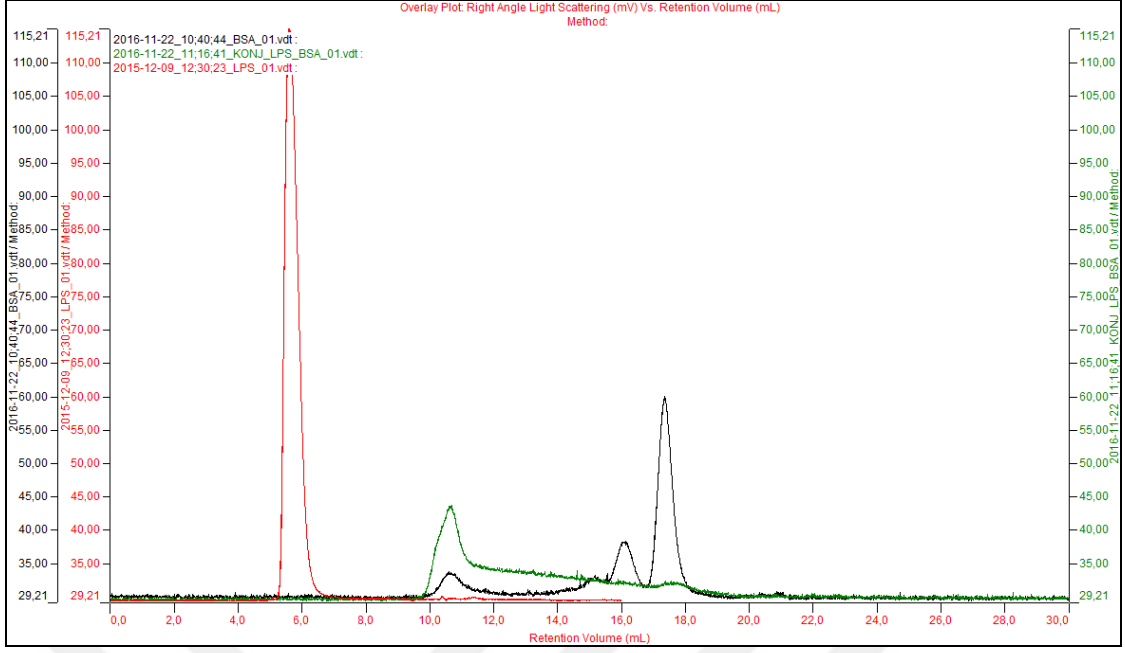
Konjugat			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-9,03	Peak 1:	0	0	0
Zeta Deviation (mV):	0	Peak 2:	0	0	0
Conductivity (mS/cm):	17,8	Peak 3:	0	0	0
Result Quality:	Good				

### 5.4.3 GPC ANALİZİ



Şekil 5. 18 LPS, BSA ve bu iki molekülün konjugatlarının GPC analizleri (UV)





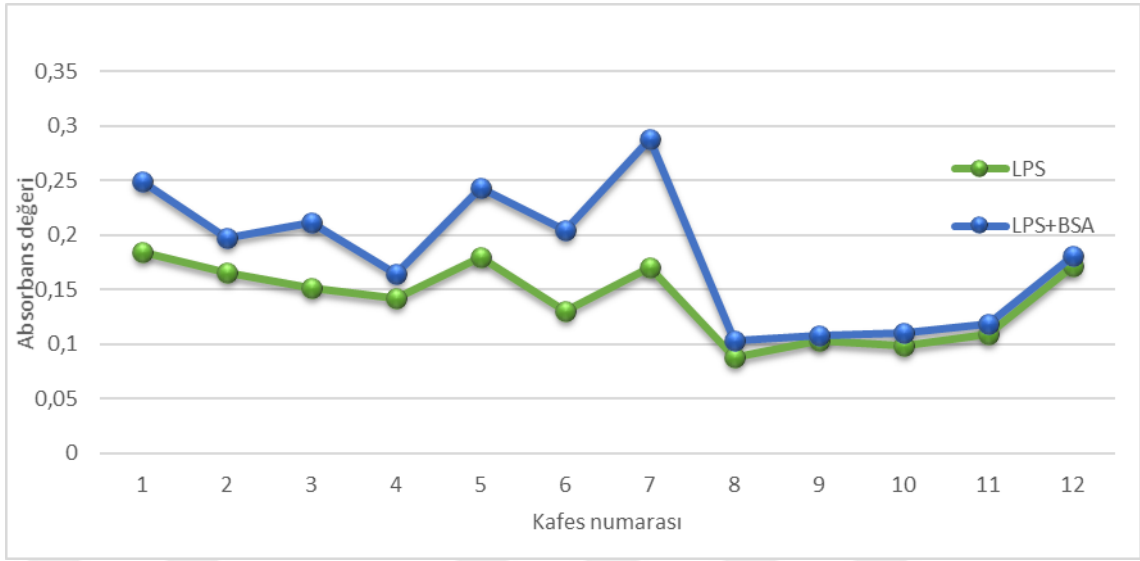
Şekil 5. 19 LPS, BSA ve bu iki molekülün konjugatlarının GPC analizleri (RALS)

#### 5.4.4 ELISA ANALİZ SONUÇLARI

Tübitak MAM'da gerçekleştirilen Balb/c farelerinden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar ile yapılan ELISA analizlerinden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5. 9: Seçilen farelerden alınan kan örneklerinin ELISA analiz sonuçları

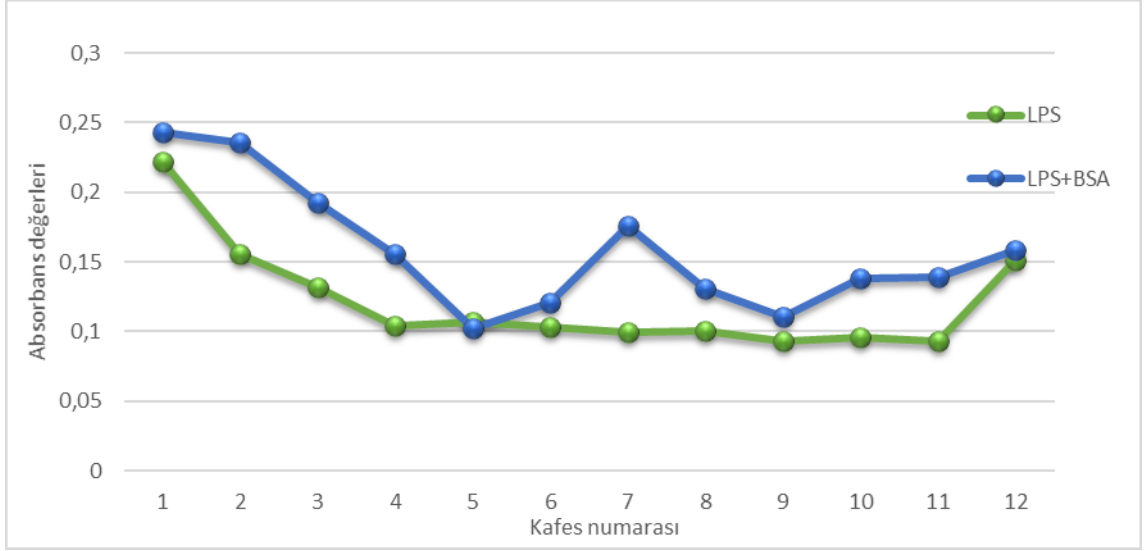
Kafes numarası	Kaplama Malzemesi	
	LPS	LPS+BSA
1	0,184	0,249
2	0,165	0,197
3	0,151	0,212
4	0,142	0,164
5	0,18	0,243
6	0,13	0,204
7	0,17	0,288
8	0,088	0,103
9	0,103	0,108
10	0,098	0,11
11	0,109	0,119
12	0,171	0,181
	OD 405	



Şekil 5. 20 Seçilen numunelerin absorbans değerlerinin grafik gösterimi

Çizelge 5. 10: Seçilen farklı farelerden alınan kan örneklerinin ELISA analiz sonuçları

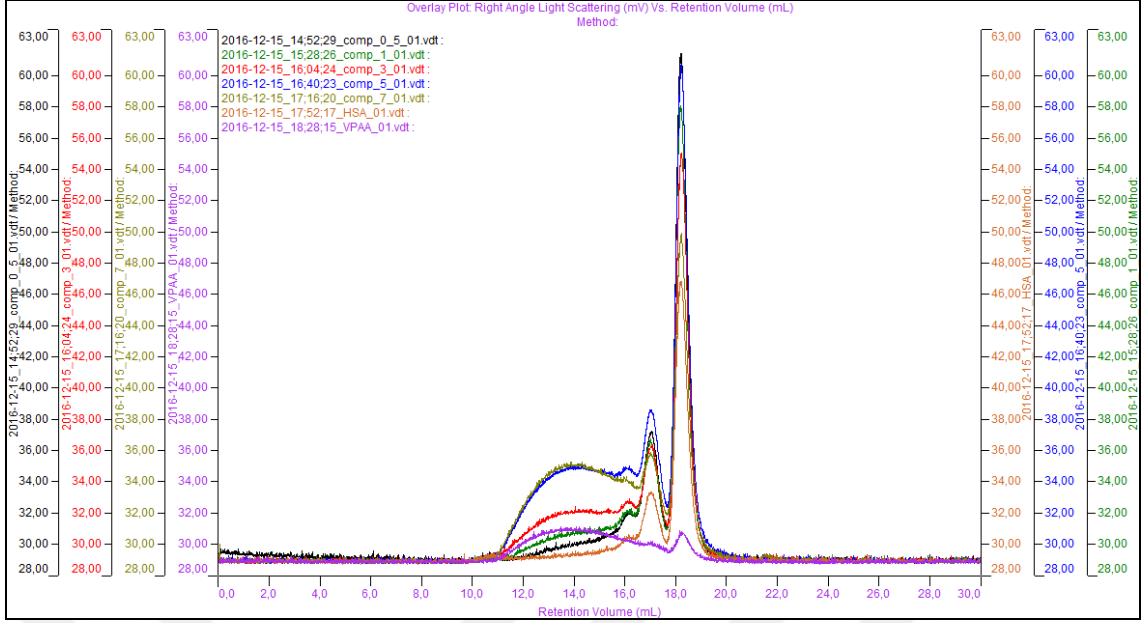
Kafes numarası	Kaplama Malzemesi	
	LPS	LPS+BSA
1	0,222	0,243
2	0,156	0,236
3	0,132	0,192
4	0,104	0,156
5	0,107	0,102
6	0,103	0,121
7	0,099	0,176
8	0,1	0,131
9	0,093	0,11
10	0,096	0,138
11	0,093	0,139
12	0,151	0,158
	OD 405	



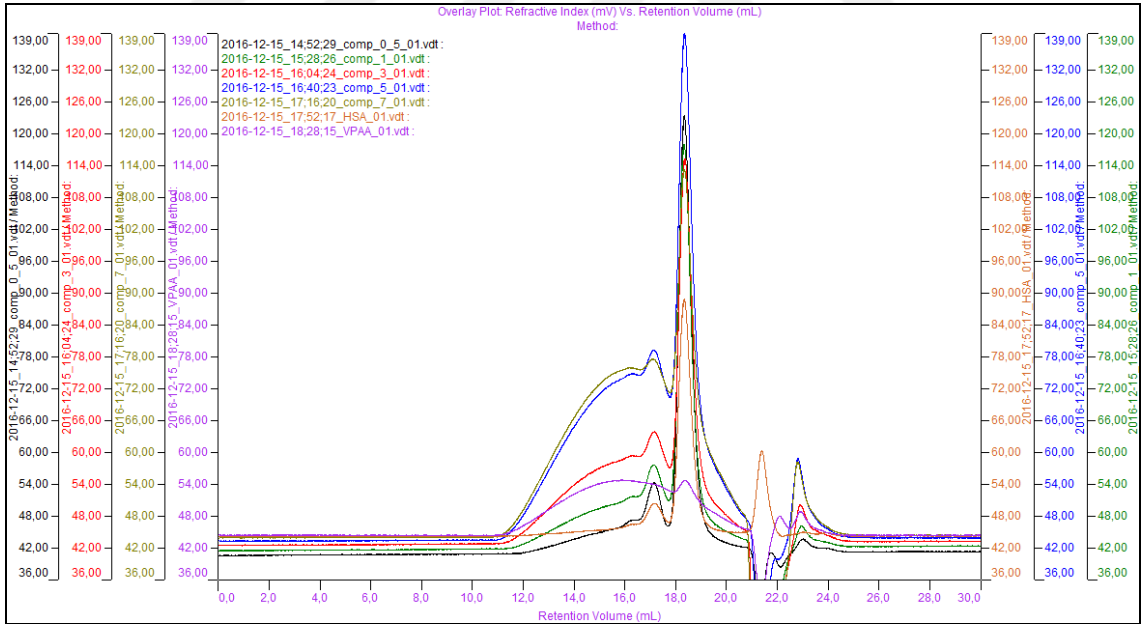
Şekil 5. 21 Seçilen numunelerin absorbans değerlerinin grafik gösterimi

### 5.5 HSA- P(VP-co-AA) KOMPLEKSLERİNİN ANALİZLERİ

Asetik Asit Tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan komplekslerin başarısı GPC cihazında ölçülmüştür. Kompleksler, bileşen oranları HSA sabit tutularak (1mg/ml) 0.5, 1, 3, 5 ve 7 olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 5. 22 0.5, 1, 3, 5, 7 oranlarında oluşturulan komplekslerin, HSA ve P(VP-co-AA) moleküllerinin Işık Saçılması Kromatogramı



Şekil 5. 23 0.5, 1, 3, 5, 7 oranlarında oluşturulan komplekslerin, HSA ve P(VP-co-AA) moleküllerinin Kırılma İndisi Kromatogramı

### SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 6.1 P(VP-co-AA ) SENTEZ VE KARAKTERİZASYON TARTIŞMA

P(VP-co-AA) polimerizasyonunun gerçekleştiğini doğrulamak için yapılan FT-IR analizi 1600-1750  $\text{cm}^{-1}$ , 1170-1350  $\text{cm}^{-1}$  ve 1400  $\text{cm}^{-1}$  tayflarında pik vermiştir. Alınan bu sonuçlar beklenen bir sonuçtur, 1717 $\text{cm}^{-1}$  tayfı C=O karboksilik grubuna aitken 1423  $\text{cm}^{-1}$  tayfı pirolidon halkasında bulunan C-C grubuna aittir. Elde edilen bu spektrum polimerizasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. GPC analizlerinden elde edilen sonuçlara göre kopolimerizasyon reaksiyonu başarıyla sonuçlanmıştır. Petrov ve arkadaşları yapılan çalışmalarda P(VP-co-AA) polimerinin uygun bir taşıyıcı olmanın yanı sıra bağışıklık sistemini güçlendirici adjuvan özelliği olduğunu göstermişlerdir. Bu yüzden bu polimerin potansiyel bir sentetik aşı oluşturmada uygun bir aday olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 6.2 DEKSTRAN ALDEHİTİNE AİT TARTIŞMA

Dekstran ve dekstran aldehitin FT-IR spektrumu incelendiğinde 1650, 2841 ve 2875 $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında pikler verildiği görülmektedir. 1650 $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda elde edilen pik dekstran üzerindeki -C=O grubunun gerilmesini gösterirken 2841 ve 2875 $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları aldehit grubunun oluştuğunu göstermektedir. Bu işlemler LPS molekülüne uygulandığında benzer sonuçların elde edileceği söylenebilir [35].

### 6.3 P(VP-co-AA) -BİYOMOLEKÜL KONJUGASYONUNA AİT TARTIŞMA

Çalışmanın bu aşaması biyomolekül ve taşıyıcı molekül arasında oluşturulacak konjugasyon reaksiyonlarının analizi için yapılmıştır. HSA ve P(VP-co-AA) konjugatlarının GPC analizi konjugasyon işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Şekil 5.13'te görülebildiği gibi P(VP-co-AA) kopolimeri kendi başına düşük bir pik vermektedir, fakat bu kopolimer HSA proteini ile konjuge oldukça ve konjugasyon oranı arttıkça; saf HSA'nın verdiği kadar şiddetli olmayan ve saf kopolimerden şiddetli bir pik vermektedir. Ayrıca Şekil 5.12'de verilmiş olan Işık Saçılması Kromatogramı'na bakılırsa; HSA proteini 18. dakikada, P(VP-co-AA) kopolimeri 12. dakikada bu iki molekülün oluşturduğu konjugatlar ise 10. ile 15. dakikalar arasında pik verildiği görülmüştür; oluşan konjugat, konjugatı oluşturan moleküllerden daha büyük bir boyuta ulaşmıştır. Bu karışımların hazırlanma yöntemiyle aynı şekilde yapılmış olan LPS-BSA konjugatlarının da benzer şekilde başarılı sonuç vermesi beklenmiştir; Şekil 5.19'deki kromatogram incelendiğinde oluşan konjugatın biyomolekül ve protein arasında olduğu görülebilir. Bu konjugasyonun eldesinden sonra, konjugat canlı bir sisteme aşı olarak verildiğinde canlıda oluşan antikor oluşumu takip edilebilir. Bu antikorlar ileride yapılması planlanan tanı kitinin temelini oluşturmaktadır çünkü tanı kiti hastalıklı olmasından şüphelenen canlıdan alınan kanın antikor ile birleştirilmesi ELISA platelerine bağlanan antijenlerin etkileşimini temel olarak olacaktır.

### 6.4 LPS-BSA KONJUGASYONUNA AİT TARTIŞMA

Konjugasyon reaksiyonunun başarısı FTIR, ZetaSizer ve GPC cihazları ile doğrulanmıştır. Bu sentezlenen konjugatların farelere enjekte edilmesi ile oluşan antikor seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

FTIR analizi sonunda  $1680-1850\text{ cm}^{-1}$  tayflarında ve  $3300-3500\text{ cm}^{-1}$  tayflarında pikler elde edilmiştir. Bu pikler sırasıyla karbonil ve amino gruplarını temsil etmektedir. Yani konjugasyon reaksiyonunun sonucunda elde edilen ürün filtrelendikten sonra kalan kısımda, biyomolekül ile proteinin barındırdığı gruplar bulunmaktadır. Bu sonuçtan yola çıkılarak konjugasyon reaksiyonunun başarılı olduğu ileri sürülebilir fakat doğrulamak için boyut analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir [27], [36].



Zeta analizlerinden yola çıkılarak elde edilen konjugat moleküllerinin dinamik yarıçapının ve zeta değerlerinin BSA proteinine ait değerlerinden küçük, LPS biyomolekülünden büyük olduğu görülebilir. Zeta potansiyellerinin incelendiğinde oluşan konjugatın zeta potansiyelinin -9,51'den -9,03'e yükseldiği görülmüştür. Bunun sebebi LPS biyomolekülünün BSA proteini ile başarılı şekilde gerçekleşen konjugatıdır. BSA proteini net negatif yüke sahiptir ve bağlanan biyomolekül bu yükü pozitif doğru çekmiştir. Bu sonuç konjugasyonun gerçekleştiğini ve konjuge molekülünün kompakt bir yapı oluşturup hacmice küçüldüğünü göstermektedir [18].

GPC; UV ve RALS analizleri sonucunda elde edilen kromatogramlar konjugatın, saf LPS'den daha geç ve BSA proteini ile hemen hemen aynı zaman aralığında detektörlere ulaştığını göstermektedir. Bu sonuç FTIR ve Zeta sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde BSA-LPS konjugasyonunun başarılı olduğu sonucuna varılabilir.

Tübitak MAM 'de Balb/c farelerine LPS ile aşı uygulandıktan sonra Elde edilen konjugatların ELISA platelerine kaplanıp dolaylı ELISA analizinin yapılması fareler tarafından üretilen antikorların daha iyi tutunmasını sağlar. LPS biyomolekülü ELISA platelerin polistiren yüzeyine kendi başına zayıf olarak bağlanabilirken bu molekülün BSA proteini ile konjuge edilmesi antijenlerin ELISA platelerine bağlanıp eklenen antikorların ortamda kalmasını ve yıkama işlemleri sırasında uzaklaşmamasını sağlar. Bu yöntemin başarısı Çizelge 5.9-5.10'da ve Şekil 5.20-21'de konjugat kullanılan platelerin saf biyomolekül kullanılan platelere göre daha yüksek absorpsiyon vermesi ile görülmüştür. Bu şekilde Q Humması hastalığı için şekilde kolay ve otomize edilmiş bir ELISA yöntemi elde edilmiştir; bu yöntem ile gerçekleştirilen konjugatların ileriki çalışmalarda sentetik aşı üretiminde kullanılabilir [4], [5], [14].

Bu sonuçlardan yola çıkılarak; LPS-BSA konjugasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve bu konjugatların istenen amaca, yani LPS molekülünün ELISA platelerini daha sağlam bağlanmasını sağlamaya, ulaşıldığı söylenebilir.

## **6.5 HSA-P(VP-co-AA) KOMPLEKSLERİNE AİT TARTIŞMA**

Fiziksel etkileşimlere dayanan HSA-P(VP-co-AA) komplekslerinin GPC kromatogramları Şekil 5.22 ve 5.23'de verilmiştir. Bu komplekslerde protein konsantrasyonu sabit

tutulmuştur ve biyopolimer miktarı gittikçe artmıştır; mol oranları 0.5, 1, 3, 5 ve 7 olacak şekilde hazırlanan komplekslerin kromatogramlarından yola çıkılarak; kompleks boyutunun 5 oranına kadar sabit bir şekilde arttığı; 7 oranında fazla miktardaki polimerden dolayı çöküntü oluşumu olduğu için kromatogramda beklendiği yerde görülmediği sonucuna varılmıştır. Numuneler GPC'ye verilmeden önce filtrelendiği için oluşan çöküntülerin filtrede kalması ve bu yüzden cihazda görülmediği söylenebilir. İki kromatogramda da görülen ve oranlarla paralel bir değişim gösteren piklerden yola çıkılarak kompleks oluşumunun başarılı olduğu sonucuna varılabilir.



## KAYNAKLAR

---

- [1] Angelakis, E. ve Raoult, D., (2010). "Q Fever", *Veterinary Microbiology*, 140: 297-309.
- [2] Mustafaev, M., (2004). "Functional Biopolymer Systems", *Sigma*, 4: 40.
- [3] Luxenhofer, R., Han, Y., Schulz, A., Tong, J., He, Z., Kabanov A.V. ve Rainer Jordan, (2012). "Poly(2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics", *Macromolecular Journals*, 33: 1613-1631.
- [4] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer subunit vaccines", *Pure Appl. Chem.*, 76: 1659-1677.
- [5] Peng, Y. Zhang, Y. Mitchell, W.J. ve Zhang, G., (2012). "Development of lipopolysaccharide targeted peptide mimic vaccine against Q fever", *The Journal of Immunology*, 189: 4909-4920.
- [6] Sağlam, G. A. ve Şahin, M., (2016). "Coxiella burnetii in samples from cattle herds and sheep flocks in the Kars region of Turkey", *Veterinari Medicina*, 61: 17-22.
- [7] van den Brom, R. van Engelen, E. Roest, H.I.J. W., v.d.H. ve Vellema, P., (2015). "Coxiella burnetii infections in sheep or goats: an opinionated review", *Veterinary Microbiology*, 181: 119-129.
- [8] Vilas M. Vaidya, Malik, S.V.S., K.N. Bhileganokar, R.S. Rathore, Kaur, S. ve S.B. Barbuddhe, (2008). "Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductibe disorders", *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, 33: 307-321.
- [9] Khalili, M., Diali, H.G., Mirza, H.N. ve Mosavi, S.M. (2015). "Detection of *Coxiella burnetii* by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5: 119-122.
- [10] Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., Rockey, D.D. ve Hackstadt, T., (1995). "Differential Interaction with Endocytic and Exocytic Pathways Distuingish Parasitophorous Vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*", *Infection and Immunity*, 64: 796-809.

- [11] Cowen, C., (2015). Q Fever Subunit Vaccine, eds. Biology. Honors Research Fellows and Undergraduate Research Scholars Thesis Texas A&M University, 29.
- [12] Abbas, A.K. Lichtman, A.H.H. ve Pillai, S., (2014). Cellular and Molecular Immunology, Canada: Elsevier on VitalSource.
- [13] Topuzoğulları, M. Koç, R.Ç. İšoğlu, S.D. Bağırova, M. Akdeste, Z. Elçiçek, S. Öztel, O.N. Baydar, S.Y. Ateş, S.C. ve Allahverdiyev, A.M., (2013). "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis ", Journal of Biomedical Science, 20.
- [14] Cordeiro, A.S. Alonso, M.J. ve de la Fuente, M., (2015). "Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides", Biotechnology Advances, 33: 1279-1293.
- [15] Peek, L.J. Middaugh, C.R. ve Berkland, C., (2008). "Nanotechnology in vaccine delivery", Advanced Drug Delivery Reviews, 60: 915-928.
- [16] KARAHAN, M., Tuğlu, S. ve AKDESTE, Z.M. (2013). "Polyelectrolytes and its Biological Properties", Sigma, 31: 85-106.
- [17] Banoo S., B.D., Bossuyt P., Herring A., Mabey D., Poole F., Smith P.G., Sriram N., Wongsrichanalai C., Linke R., O'Brien R., Perkins M., Cunningham J., Matsoso P., Nathanson C.M., Olliaro P., Peeling R.W. ve Ramsay A., (2010). "Evaluation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases: General Principles", Nature Reviews-Microbiology, 8: 13.
- [18] Serap, A., (2006). Peptit Protein Kovalent Konjugasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [19] Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Morgan, D. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. Wilson, J. ve Hunt, T., (2008). Molecular Biology of the Cell, UK: Garland Science.
- [20] Bujaz, A., (2012). "Structures of bovine, equine and leporine serum albumin", Acta Crystallographica, 68: 1278-1289.
- [21] Wang, Y., Yu, H., Shi, X., Luo, Z., Lin, D. ve Huang, M. (2013). "Structural Mechanism of Ring-opening Reaction of Glucose by Human Serum Albumin", Journal of Biological Chemistry, 288: 15980-15987.
- [22] M.P. Riberio, P.I.M., S.P. Miguel, P. Coutinho ve I.J. Correia, (2013). "Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing", Materials Science and Engineering C, 33: 2958-2966.
- [23] Goodrazi, N., R.V., G. Kamalinia, F. Atyabi ve R. Dinarvand, (2013). "A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy", Carbohydrate Polymers, 92: 1280-1293.

- [24] Paramelle, D., Miralles, G., Subra, G. ve Martinez, J. (2012). "Chemical Cross-Linkers for Protein Structure Studies by Mass Spectrometry", *Proteomics*, 13: 438-456.
- [25] DERMAN, S.A., (2012). CANİNE PARVOVİRUS'E AİT ANTİJENİK ÖZELLİKLI SENTETİK PEPTİDLERİN SENTEZİ VE BİYOKONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ, ed^eds. Bioengineering. Turkey Yıldız Teknik Üniversitesi, 251.
- [26] Hermanson, G.T., (2013). *Bioconjugate Techniques*, UK: Elsevier.
- [27] Jiskoot, W. ve Crommelin, D., (2005). *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, USA: Springer Science & Business Media.
- [28] A. Ortin, J.M., E. López, P del Hierro, B. Monrabal, J.R. Torres-Lapasió ve M.C. García-Álvarez-Coque, (2013). "Characterization of chemical composition along the molar mass distribution in polyethylene copolymers by GPC using modern filter-based IR detector", *Macromol Symp.*: 63-80.
- [29] Kızılbey, K., Mansuroğlu, B., Derman, S. ve Akdeste, Z.M., (2009) "Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers", *International Journal of Natural Engineering Sciences*, 3: 36-40.
- [30] Inc., T.F.S., (2010). *ELISA Technical Guide and Protocols*, ed^eds. Tech Tip #65.
- [31] Ueda, H., K.T., Kubota, K. ve Nagamune, T., (1996). "Open sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region", *Nature Biotechnology*, 14: 1714-1718.
- [32] Ueda H., T.K., Kubota K., Suzuki E., Nagamune T., Nishimura H., Schueler P.A., Winter G., Kumagai I. ve Mahoney W.C., (1996). "Open Sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region", *Nature Biotechnology*, 14: 1714-1718.
- [33] E. Eteshola ve D.L., (2001). "Development and Characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels", *Sensors and Actuators*, B: 129-133.
- [34] Massia, S.P. Stark, J. ve Letbetter, D.S., (2000). "Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading", *Biomaterials*, 21: 2256.
- [35] (2014). *Infrared Spectroscopy Absorption Table LibreTexts*, ed^eds. CHEMISTRY. University of California.
- [36] Mansuroğlu, B., Kızılbey, K., Derman, S. ve Mustafaeva, Z. (2010). "Investigation of protein-polyelectrolyte complex and conjugates by high performance liquid chromatography methods", *Turkish Journal of Biochemistry*, 36: 21-28.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Muhammed Yusuf KANDUR  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 10.03.1993/İstanbul  
**Yabancı Dili** : İngilizce/İspanyolca  
**E-posta** : yusufkandur@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Marmara Üniversitesi	2015
Lise		Özel Gökyüzü Koleji	2011

## **İŞ TECRÜBESİ**

<b>Yıl</b>	<b>Firma/Kurum</b>	<b>Görevi</b>
2014-2015	Minho Üniversitesi 3B's (Biomaterials, Biodegradeables and Biomimetics) Research Group (Portekiz)	Stajyer
2013-2014	Marmara Üniversitesi Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyoteknolojisi Laboratuvarı (IBSB)	Laboratuvar Asistanı
2013-2014	PakMaya-Pbio (Pak Biyoteknoloji Laboratuvarı)	Stajyer
2012-2013	Marmara Üniversitesi Bitki Genetiği Laboratuvarı	Laboratuvar Asistanı

## **YAYINLARI**

### **Bildiri**

1. Karahan,M. Pelit-Arayıcı-P, Kandur, M.Y., Frimmelova,M.,Toman,R.,Akdeste-Mustafaeva,Z. (2016). "Water-soluble covalent conjugates of Lipopolysaccharide with Bovine Serum Albumin; 6<sup>th</sup> EuCheMS Chemistry Congress, Seville, İspanya; 11-15 Eylül 2016

### **ÖDÜLLERİ**

1. TÜBİTAK 2211 Yüksek Lisans Bursları; 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı

