

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞAP HASTALIĞI VIRÜSÜNÜN VP1 KAPSİD  
PROTEİNİNİN ANTİJENİK ÖZELLİKLİ 40-60 AMİNO  
ASİD DİZİLİ PEPTİDİNİN POLİANYONLARLA  
KONJUGASYONU**

Biyolog Erkan BÜLBÜL

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında Hazırlanan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı** : Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2008

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	v
KISALTIMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	x
ÖNSÖZ .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Peptidler .....	2
2.1.1 Amino Asidler .....	2
2.1.1.1 Amino asidlerin Asid-Baz Özellikleri .....	3
2.1.1.2 Amino asidlerin Optik Özellikleri .....	4
2.1.1.3 Amino Asidlerin Sınıflandırılması .....	4
Polar Olmayan Alifatik R Gruplar .....	5
Aromatik R Grupları.....	5
Polar Yüksüz R Grupları.....	6
Pozitif Yüklü (Bazik) R Grupları .....	7
Negatif Yüklü (Asidik) R Grupları.....	8
2.1.2 Peptidler ve Peptid Bağı .....	8
2.1.3 Proteinlerin ve Peptidlerin Yapısını Etkileyen Kovalent Olmayan Etkileşimi .....	9
2.1.3.1 Van Der Waals Etkileşimi .....	10
2.1.3.2 Hidrojen Bağları .....	11
2.1.3.3 Hidrofobik Etkileşimi .....	12
2.1.3.4 Elektrostatikler (iyonik)Etkileşimi .....	13
2.1.3.5 Disülfid Bağları .....	14
2.1.4 Peptid Sentezi.....	14
2.2 İmmün Sistem .....	15
2.3 Antijenler .....	16
2.3.1 Antijen Olabilme Özellikleri.....	17
Yabancılık .....	17
Molekül Yüzey Yapısı .....	17
Molekül Ağırlığı.....	17
Molekülün Çözünürlüğü ve Sertliği .....	17
2.4 Antikorlar .....	18

2.4.1	Antijene Karşı Primer ve Sekonder Antikor Cevapları .....	20
2.4.2	İmmünoglobulinlerin Yapısı .....	21
2.4.3	Bir İmmünoglobulinin Moleküler Yapısı .....	22
2.4.4	İmmünoglobulinlerin Antijene bağlanma Yeri .....	23
2.5	Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları .....	23
2.5.1	İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri .....	24
2.5.1.1	Polielektrolit Komplekslerinin İmmünojenliği .....	27
2.5.1.2	İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin Çalışma Modeli .....	28
2.6	Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller .....	30
2.6.1	BSA (Bovin Serum Albumin) Proteinini .....	31
2.6.2	BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar .....	32
2.7	Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller .....	34
2.8	Çapraz Bağlama Reaktifleri .....	37
2.8.1	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar.....	38
2.8.1.1	Karbodiimidler .....	39
	EDC .....	39
	CMC .....	40
	DCC.....	40
	DIC .....	41
	N,N-Karbonildiimidazol .....	41
3.	KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ .....	42
3.1	Moleküler Eleme Kromatografisi.....	42
3.2	Fluoresans Spektroskopisi .....	43
4.	DENEYSEL KISIM .....	45
4.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	45
4.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	45
4.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	46
4.2	Poliakrilik asid (PAA) .....	47
4.3	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Sentetik Peptid Dizileri.....	48
4.4	PAA-Peptid Konjugasyon Reaksiyonu .....	51
4.5	Konjugatların Saflaştırılması .....	54
4.5.1	Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri).....	55
4.5.2	Polimer-Peptid Konjugatının Saflaştırılma analiz sonuçları.....	56
4.5.3	Peptid, Polimer, Peptid-Polimer Konjugatı Saflaştırma Öncesi ve Saflaştırma Sonrası FTIR Analiz Sonuçları .....	57
4.6	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında BSA –Poliakrilik Asid Konjugat Sentezi .....	60
4.6.1	Kullanılan Çözeltiler.....	60
4.6.1.1	Hesaplamalar.....	61
4.6.2	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında Sentelenen BSA–Poliakrilik Asid Konjugatının Analiz Sonuçları .....	62
4.6.3	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC)	

	Çapraz Bağlayıcısı varlığında BSA ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenini içeren Biyokonjugat Sentezi .....	64
4.6.3.1	BSA proteini – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin 40-60 Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatin Hazırlanması .....	65
4.6.3.2	BSA proteini – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin 40-60 Peptid Dizisini İçeren konjugata ait HPLC ve Flouresans Analiz Sonuçları.....	66
4.7	BSA ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 40-60 Peptid Dizisini içeren Biyokonjugatların Balb/c farelere enjekte edilmesi.....	67
4.8	Fare Serumlarının alınması .....	68
4.9	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde BSA-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 40-60 Peptid Dizisini içeren Biyokonjugatlara karşı oluşan Antikor Miktar Tayini.....	68
4.9.1	Kullanılan Çözeltiler.....	69
	Sodyum Sitrat Çözeltisi .....	69
	0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2) .....	69
	Yıkama Tamponu .....	69
	Substrat Tamponu.....	69
	% 2 Süt Tozu Çözeltisi .....	69
	Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu .....	69
	4- nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması .....	69
4.9.2	ELİSA Deneyinin Yapılışı .....	70
4.10	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde PAA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 40-60 Peptid Dizisini içeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayin Sonuçları .....	72
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	73
5.1	Biyokonjugatlar ve Yapı Analizleri; Elisa Test Sonuçları.....	73
6.	KAYNAKLAR.....	77
	ÖZGEÇMİŞ.....	82

## SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
M	Molar
mg	miligram
ml	mililitre
n	mol
$\mu$ l	mikrolitre
mV	milivolt
kDa	kilo Dalton
$M_w$	ağırlıkça-ortalama moleköl ağırlığı
$\lambda$	dalgaboyu
Rpm	Dakikada dönme hızı

## KISALTIMA LİSTESİ

PE	Polielektrolit
Ig	İmmünoglobülin
Ab	Antikor
Ag	Antijen
BSA	Bovin serum albumin
CP	Kopolimer
PVP	Poli-4-vinilpiridin
MVP	Metil –vinil- piridin
PEG	Poli etilen glikol
SA	Serum Albumin
GG	Gama Globulin
EK	Elektrostatik Kompleks
KK	Kovalent Konjugat
PEK	Polielektrolit Kompleks
AOH	Antikor Oluşturan Hücre
ELISA	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay
EDC	1-etil-3-dimetilaminopropil
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester
NHS	N-Hidroksisüksinimid ester
OVA	Ovalbumin
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
RI	Kırılma İndisi
IS	Işık Şaçılması
Vis	Viskozite
FMDV	Şap Hastalığı Virüsü

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Bir amino asidin kimyasal formül ile gösterimi ( <a href="http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Assets/aminoAcidStruc.jpg">http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Assets/aminoAcidStruc.jpg</a> ) .....	2
Şekil 2.2	Peptidlerin birincil yapısını oluşturan amino asidlerin şematik gösterimi ( <a href="http://www.wvup.edu/ecrisp/amino_acid.gif">http://www.wvup.edu/ecrisp/amino_acid.gif</a> ) .....	2
Şekil 2.3	Amino asidlerin asidik ve bazik özelliği .....	3
Şekil 2.4	Amino asidlerin zwitter iyonik formları .....	3
Şekil 2.5	Amino asidlerin stereoizomerleri .....	4
Şekil 2.6	Polar olmayan alifatik R grupları .....	5
Şekil 2.7	Aromatik R Grupları .....	6
Şekil 2.8	Polar Yüksüz R Grupları .....	7
Şekil 2.9	Pozitif Yüklü Bazik R Grupları .....	7
Şekil 2.10	Negatif yüklü R Grupları .....	8
Şekil 2.11	İki amino asid arsında peptid bağı oluşumu ( <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid">http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid</a> ) .....	9
Şekil 2.12	Van der Waals kuvvetlerinin iki atom arasında oluşması ( <a href="http://www.steve.gb.com/images/science/van_der_waals_forces.png">http://www.steve.gb.com/images/science/van_der_waals_forces.png</a> ) .....	10
Şekil 2.13	Farklı moleküller arasında oluşabilecek Hidrojen bağlarının gösterimi .....	11
Şekil 2.14	Yüksük moleküller arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimler .....	12
Şekil 1.15	Antijen molekülü .....	16
Şekil 2.16	Antijene spesifik antikör molekülleri ( <a href="http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/aviruses/immune-system-part.html">http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/aviruses/immune-system-part.html</a> ) .....	21
Şekil 2.17	İmmünglobulinin şematik yapısı .....	23
Şekil 2.18	Fare karaciğer hücrelerinde antikör oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; 2-PC-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ve Poliakrilik asidin (PAA) (b) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Peolielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10 <sup>-6</sup> eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 2004, 1996a) .....	25
Şekil 2.19	a-b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri .....	25
Şekil 2.20	Polimer-metal komplekslerinin [Me]/[PE] <<1(I) ve [Me]/[PE]>>1 (II) oranlarında oluşan yapı .....	26
Şekil 2.21	Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 2004, 1996a) . .....	27
Şekil 2.22	Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı	25
Şekil 2.23	Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerin modellerinin yapısı .....	26
Şekil 2.24	İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a) .....	30
Şekil 2.25	Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat. ...	32
Şekil 2.26	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA*B konjugatı) (Mustafaev vd., 2002). 33	33
Şekil 2.27	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır(Mustafaev, 2002) .....	33
Şekil 2.28	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler .....	35
Şekil 2.29	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler .....	35

Şekil 2.30	Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000) .....	36
Şekil 2.31	Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, Mustafaev, 2004).....	37
Şekil 3.1	Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram .....	43
Şekil 4.1	0.01 M PBS pH 7 içerisinde hazırlanmış % 0.05 PAA çözeltisinin Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a),UVdetektörü(b),Işık Saçılması detektörü (c),Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	48
Şekil 4.2	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisinin 1mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı.....	50
Şekil 4.3	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisinin 1 mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı.....	51
Şekil 4.4	PAA- Peptid konjugatının kongugasyon akış şeması .....	52
Şekil 4.5	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizili peptidi ile PAA nın Karbodiimid yöntemi ile sentezlenen konjugatının(1), Polimerin(2), Peptidin(3) kromatogramları görülmektedir. ....	53
Şekil 4.6	0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{peptid}/n_{BSA} = 3$ oranında sentelenen Polimer-Peptid konjugatlarının floresans spektrumu .....	54
Şekil 4.7	Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi.....	55
Şekil 1.8	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizilimli peptidin PAA 'ya konjugatının Toyopearl dolu maddesi olan bio-rad kolonundan saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometrede yapılan analizine ait spektrumu	56
Şekil 1.9	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizilimli peptidin PAA 'ya konjugatının Toyopearl dolu maddesi olan bio-rad kolonundan saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometrede yapılan analizine ait spektrumu	56
Şekil 4.10	Antijenik özellikli 40-60 peptid dizisine ait FTIR analizi.....	57
Şekil 4.11	Polimer PAA ait FTIR analizi .....	58
Şekil 4.12	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan ayırma kolonu öncesi FTIR analizi.	58
Şekil 4.13	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan biorad kolonundan geçirildikten sonraki FTIR analizi.....	59
Şekil 4.14	0.0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{BSA}/n_{PAA} = 4.5$ oranında sentelenen BSA nın HPLC spektrumu .....	62
Şekil 4.15	0.0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{BSA}/n_{PAA} = 4.5$ oranında sentelenen PAA nın HPLC spektrumu .....	62
Şekil 4.16	0.0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{BSA}/n_{PAA} = 4.5$ oranında sentelenen PAA-BSA konjugatının HPLC spektrumu .....	63
Şekil 4.17	0.0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{BSA}/n_{PAA} = 4.5$ oranında sentelenen PAA-BSA konjugatının HPLC spektrumu.....	63
Şekil 4.18	0.0.1 M PBS pH7' de hazırlanmış $n_{BSA}/n_{PAA} = 4,5$ oranında sentelenen PAA-	



	BSA konjugatının floresans Spektrumu.....	64
Şekil 4.19	0.0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$ oranında sentelenen BSA-Peptid konjugatının floresans Spektrumu.....	66
Şekil 4.20	0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$ oranında sentelenen BSA-Peptid konjugatının floresans Spektrumu .....	66
Şekil 4.21	Kuyruk veninden madde enjeksiyonu .....	68
Şekil 4.22	Indirek ELISA’nın şematik gösterimi .....	71
Şekil 4.23	0.5mg/0.2 ml Şap Hastalığı Virüsünün 40-60 dizisini içeren biyokonjugatlar ile immünize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) VP/AA-Peptid’e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği .....	72
Şekil 5.1	0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$ oranında sentelenen Polimer-Peptid konjugatlarının floresans spektrumu .....	74
Şekil 5.2	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizilimli peptidi ile PAA nın Karbodiimid yöntemi ile sentezlenen konjugatının(1), Polimerin(2), Peptidin(3) kromatogramları görülmektedir.....	74
Şekil 5.3	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan ayırma kolonu öncesi FTIR analizi	75
Şekil 5.4	Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan Bio-Rad kolonundan geçirildikten sonraki FTIR analizi.....	76

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1	FTIR değerlendirme tablosu .....	60
-------------	----------------------------------	----

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve becerisi ile beni yönlendiren, yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmalarımın her yönde önünü açan, eşsiz desteği ile bana her konuda yardımcı olan, değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölüm Başkan Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE'ye;

Biyomühendislik Bölümü ve Laboratuvarlarını kuran, bu laboratuvarlarda tez çalışmalarımın yapılmasına imkan sağlayan, ilgisini, özverisini ve yardımlarını esik etmeyen, dersleriyle engin bilgisinden yararlanma imkanı sunan, rahmetli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'ye;

Yüksek lisans eğitimim süresince bana bilgi ve tecrübelerinden yararlanma imkanı sunan değerli hocam, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Huriye KUZU'ya;

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile beni yönlendiren, çalışmalarımın her aşamasında çok büyük emekleri olan Araş. Gör. Dr. Banu MANSUROĞLU'na;

Laboratuvar çalışmalarında, Flouresans ölçümlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Yasemin Budama BATTAL'a, Gerekli HPLC analizlerimi gerçekleştiren Araş. Gör. Dr. Banu MANSUROĞLU'na ve Arş. Gör. Kadriye KIZILBEY'e, bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını eksik etmeyen Araş. Gör. Serap ACAR'a, Başak İŞCANI'na, Mithat ÇELEBİ'ye ve Erdem KARABULUT'a;

Eğitim ve öğretimimde hiçbir fedarkâlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili Annem, Babam ve Kardeşlerime;

Yaşamıma dahil oldukları günden bugüne her daim yanımda yer alan değerli patronum Emin GÜNDOĞDU'ya, sevgili kardeşim İhsan BÜLBÜL'e, dostlarım Tamer AKAR 'a ve Birkan BÖYÜK'e;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve motivasyonumu hep üst seviyede tutan tüm iş ve okul arkadaşlarıma gösterdikleri manevi destekten dolayı sonsuz teşekkür ederim.

## “Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Antijenik Özellikli 40-60 Amino Asid Dizili Peptidinin Polianyonlarla Konjugasyonu”

### ÖZET

Biyolojik uyumlu bir sentetik polimer ve fonksiyonunun nizamlanması amaçlanan biyomolekül içeren makromolekül kompleksleri-Biyopolimer sistemler, korunmuş ilaçlar, yapay aşular, tanı kitleri vb. biyoteknolojik ürünler gibi geniş bir ölçüde uygulama alanı bulmaktadırlar.

Bu tez çalışmamızda Şap hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin antijenik özellikli 40-60 amino asid dizili sentetik peptid antijeni kendiliğinden adjuvant etkisi olan Polielektrolit taşıyıcısına bağlanarak biyopolimer sistem, yani biyokonjugat geliştirilmiş ve yapı özellikleri incelenmiştir.

Biyokonjugatın sentezi, polimerin (PAA) karbodiimid varlığında aktifleştirilerek peptide bağlanması ile gerçekleştirilmiş, yapı ve karakterizasyonu çeşitli fizikokimyasal yöntemler (HPLC, FTIR, 4 Dedektörlü Viskotek Sistemi-Ultra-viole Visible, Işık Saçılması ve Viskozite- Flouresans Spektroskopisi) uygulanarak polimerin sentetik peptidle bağlanma mekanizması, biyokonjugat partiküllerin yapısı ve reaksiyon şartlarına bağlı olarak yapı çevrilmeleri incelenmiştir.

Sentezlenmiş biyokonjugat Biyo-Rad kolonundan geçirilerek saflaştırılmıştır. Ürünün saflığı FTIR analizleri ile takip edilmiştir.

Bu konjugatın immünojenik özellikleri ELISA yöntemi ile incelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Polielektrolit, Biyopolimer sistemler, İmmünojen, Polimer-Peptid konjugatı, Şap hastalığı virüsü (Foot-and-mouth Disease)

“The Conjugation of Antigenic peptide with a sequence of 40-60 amino acid found in VP1 capsid protein of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) disease virus with polyanions”

## **ABSTRACT**

Macromolecular complexes-Biopolymere systems comprising a biocompatible synthetic polymer and a biomolecule targeting functional regulation are used in a wide range of applications including protected drugs, synthetic vaccines, diagnostic kits, biotechnological products, etc.

In our thesis, we studied structural properties of biopolymer system, namely bioconjugate which developed as synthetic peptide antigens 40-60 amino acids long of VP1 capsid protein of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) bound spontaneously to polyelectrolyte carrier that shows an adjuvant effect.

Bioconjugate synthesis was achieved with activation of polymer (PAA) with carbodiimide and with peptide binding. Using various physicochemical methods (HPLC, FTIR, Viscotek-with Ultra-violet Visible, Light Scattering, and Viscosity Quadruple Detector Systems, Fluorescence Spectroscopy), its structure and characterization, binding mechanism of the polymer with synthetic peptide, structure of bioconjugate particles and structural conversions due to reaction conditions were investigated.

Synthesized bioconjugate was purified by passage through a Bio-Rad column. FTIR analysis was used for the purity of the product.

Immunological properties of this conjugate were analyzed with ELISA method.

**Key words:** Polyelectrolyte, Biopolymer systems, Immunogen, Polymer-Peptide conjugates, Foot-and-Mouth disease virus

## 1. GİRİŞ

Sentetik polielektrolitlerin (PE), proteinlerle suda çözünen ve çözünmeyen komplekslerinin oluşumu, bunların fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Lineer ve küresel makromoleküllerin su ortamında birleşme mekanizması ile, oluşan komplekslerin mekanizması incelenmiş ve sistematikleştirilmiştir (Mustafaev, M.I., 1996a)

Son zamanlarda sentetik polielektrolitlerin (elektrik yüklü polimerler) fizyolojik aktif özelliklerinin ortaya çıkması ve bunların ilaç preparatları için taşıyıcı gibi kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. (Mustafaev, M.I., 1996a).

Farklı protein antijenlerinin belirlenmesi biyokimya, immünoloji ve moleküler biyoloji alanlarında geniş kapsamlı uygulamalar bulunmaktadır (Smith vd., 1977, 1989)

Bölümümüzde daha önce doktora tez çalışmasında (Dr.Banu Mansuroğlu.) Şap hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteinin antijenik özellikli 135-161, 170-188, 200-213 amino dizimli peptidinin polielektrolitlerle reaksiyonları araştırılmıştır. Polielektrolitlerin proteinler ve peptidler arasında kompleks oluşumu prosesi suda çözünen polikomplekslerin elde edilmesi sistemlerde fazlar arası geçişlerin varlığı incelenmiş ve immünolojik deneyler yapılmıştır.

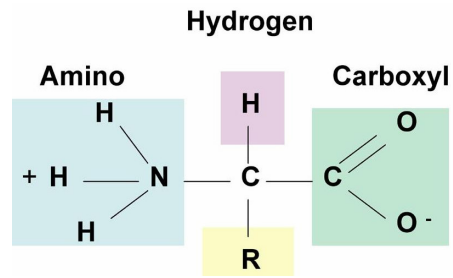
Bu çalışmada ise şap hastalığı VP1, kapsid proteininin antijenik özellikli 40-60 dizili peptidinin poliakrilik asid (PAA) ile karbodiimid varlığında konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sentezlenmiş olan konjugatın yapısı incelenmiştir. Konjugat Tayopear dolgu maddesi içeren Biyo-Rad kolonundan geçirilerek saflaştırılmış; yapı-işlev analizleri kromatografik (HPLC), ultraviyole (UV) ve flourimetrik analizlerle fiziko-kimyasal özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca PAA-BSA, BSA-Peptid konjugatları da sentezlenmiş ve oluşan konjugatların yapı-işlev analizleri incelenmiştir. PAA-Peptid konjugatlarına karşı fare serumlarında spesifik olarak oluşan antikor miktarı ELISA yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Peptidler

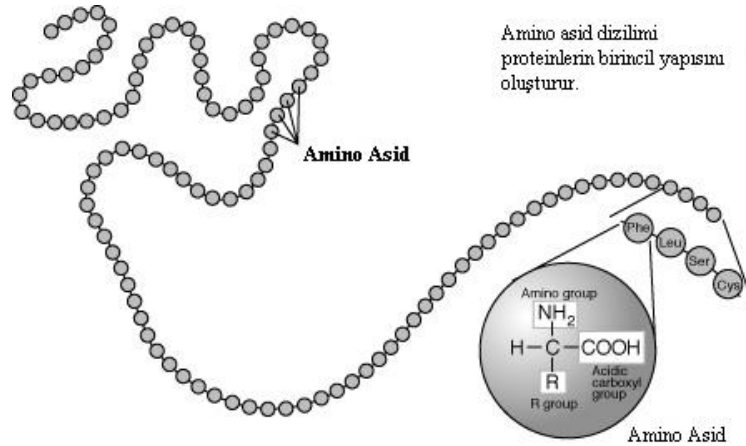
#### 2.1.1 Amino Asidler

Proteinler, amino asidlerin dehidrate (su kaybetmiş) polimerleridir. Her bir amino asit kalıntısı yanındakine özel bir kovalent (peptid bağı) bağlanmaktadır. Proteinlerde bulunan 20 standart amino asidin hepsi de ( $\alpha$ -karbon) bağlanmış bir karboksil grubu ve amino grubuna sahiptir (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 2.1 Bir amino asidin kimyasal formül ile gösterimi(1)  
(<http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Assets/aminoAcidStruc.jpg>)

Amino asit dizilimi proteinlerin birincil yapılarını oluşturur.

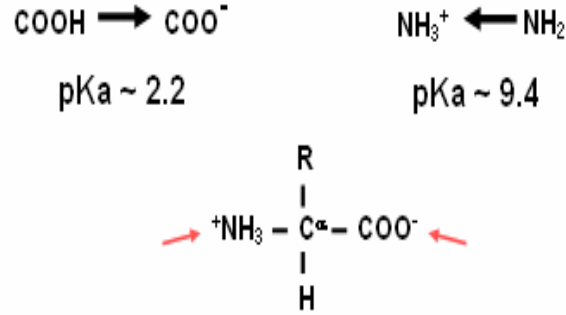


Şekil 2.2 Peptidlerin birincil yapısını oluşturan amino asidlerin şematik gösterimi(2)

([http://www.wvup.edu/ecrisp/amino\\_acid.gif](http://www.wvup.edu/ecrisp/amino_acid.gif))

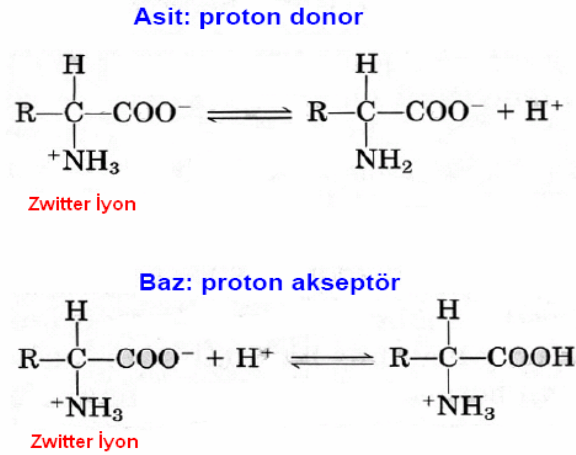
### 2.1.1.1 Amino asidlerin Asid-Baz Özellikleri

Amino asidler asit ve baz gibi davranabilirler çünkü yapılarında hem zayıf bazik bir amino grubu ( $-NH_2$ ), hem de zayıf asidik bir karboksil ( $-COOH$ ) grubu bulundurlar. Amino ve karboksilik gruplarının farklı pKa'ları vardır. (3)



Şekil 2.3 Amino asidlerin asidik ve bazik özelliği

Bir amino asid suda çözüldüğünde veya fizyolojik (hücredeki) pH da dipolar iyon veya zwitter iyon olarak bulunurlar. Bir zwitter iyon asit (proton vericisi) gibi veya baz (proton alıcısı) gibi davranabilirler.



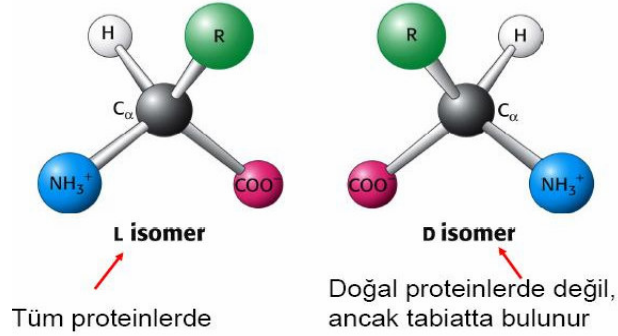
Şekil 2.4 Amino asidlerin zwitter iyonik formları



Bu çift yönlü yapıya sahip maddeler **amfoterik** veya **amfolitler** (amfotelik elektrolitler) olarak adlandırılırlar. Bir amino asidin dış çevreye karşı yüksüz olduğu pH, **izoelektrik nokta** olarak adlandırılır ve **pI** ile gösterilir. İzoelektrik noktada amino asid üzerindeki pozitif ve negatif yükler birbirine eşittir (Murray vd., 1993).

### 2.1.1.2 Amino asidlerin Optik Özellikleri

Glisin dışındaki tüm amino asidlerde  $\alpha$ -karbon Atomu; Karboksil grubu, Amino grubu, R grubu ve Hidrojen atomu olmak üzere dört bağ yapar.  $\alpha$ -karbon atomu bir **kiral** merkezdir.  $\alpha$ -karbon atomunun çevresindeki orbitaler tetrahedral düzende bağlandıklarından, dört farklı grup, ayna görüntüsü kendisiyle çakışmayan iki farklı uzaysal düzenlenim oluşturur.



Şekil 2.5 Amino asidlerin stereoizomerleri (4)

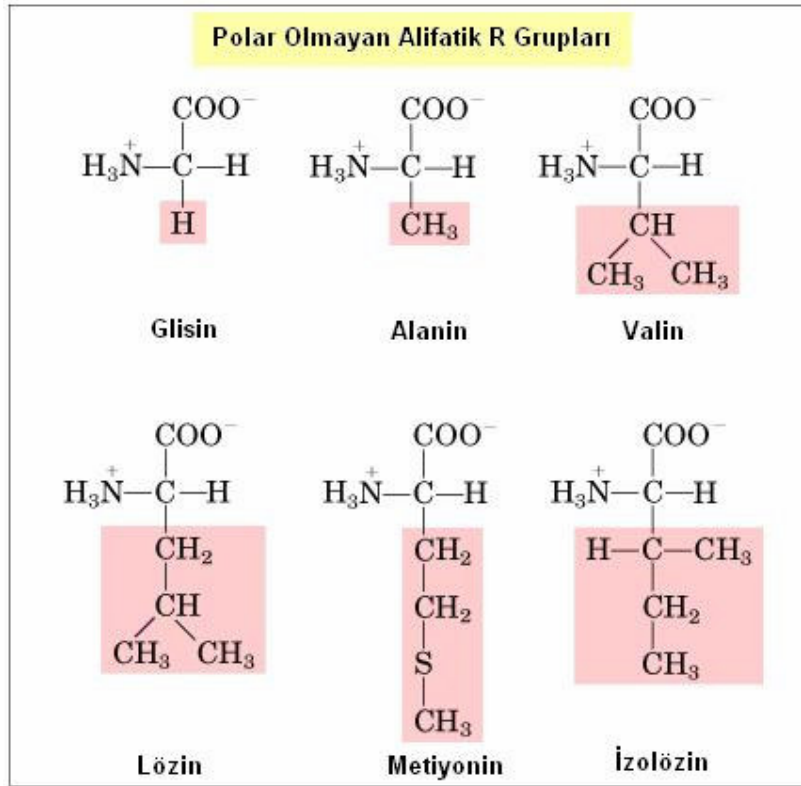
Bu iki form, bir tür stereoizomerler olup, “**enantiyomerler**” olarak tanımlanır. Kiral merkezi sahip tüm moleküller optikçe aktiftir; yani düzlemsel polarize ışığı çevirirler. Kiral merkezi ewdolan biyolojik bileşiklerin hemen hepsi, doğada D (Dekstrorotator= Işığı sağa çeviren) veya L (Levorotator =ışığı sola çeviren) şeklinde tek bir stereoizomerik formda bulunur. Proteindeki amino asit kalıntıları L-stereoizomerik formda bulunurlar.

### 2.1.1.3 Amino asidlerin sınıflandırılması

Amino asitlerin sudaki çözünürlüğünü etkileyen elektrik yükü, büyüklük ve yapısal yönden farklı olan yan zincirlere veya R gruplarıyla ayrılır. Amino asitleri; R gruplarının özelliklerine göre, özellikle polariteleri veya biyolojik pH’da suyla tepkimeye girme eğilimlerine göre 5 ana sınıfta gruplandırabiliriz.

### ***Polar olmayan Alifatik R grupları***

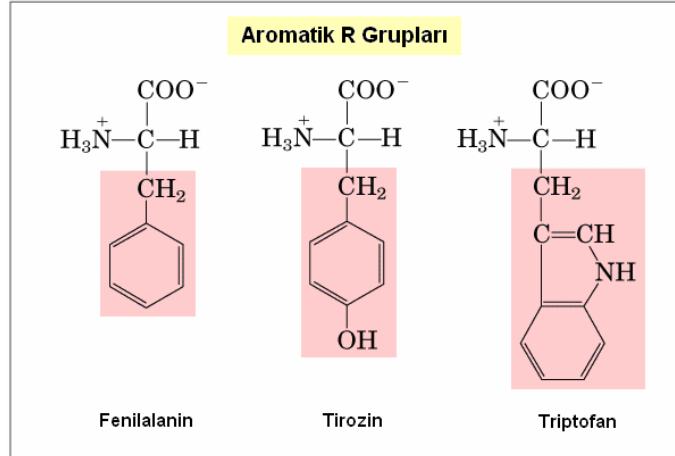
Bu amino asit sınıfındaki R grupları polar olmayan ve **hidrofobiktir**. Proteinlerde alanin, Valin, Lösin, İzolösinin yan grupları bir araya gelip kümeleşerek, hidrofobik etkileşimlerde protein yapısını sabitler. Glisin en basit yapıya sahiptir. Resmen polar olmamasına karşın, çok küçük yan zinciri hidrofobik etkileşimlere katılmaz. Sülfür içeren iki amino asiden biri olan metiyonin ise yan zincirlerinde polar olmayan tiyoeter grubu içerir.



Şekil 2.6 Polar olmayan alifatik R grupları(5)

### ***Aromatik R Grupları***

Aromatik yan zincirde, fenil alanın tirozin ve triptofan göreceli polar olmayan (hidrofobik)lardır. Hepsi hidrofobik etkileşimlere katılabilir. Tirozinin hidroksil grubu hidrojen bağı yapabilir ve bu bazı enzimler için önemli bir işlevsel gruptur. Tirozinin hidroksil grubundan, triptofanda indol halkasındaki azottan dolayı, fenil alanına göre daha polardır. Triptofan ve tirozin bir dereceye kadar da fenil alanın, ultraviyole (UV) ışığı absorplar. Bu, 280 nm dalga boyunda birçok proteinin ışığı karakteristik absorplamasını açıklar, bu özellik proteinlerin tanımlanmasında araştırmacılara yardımcı olur.

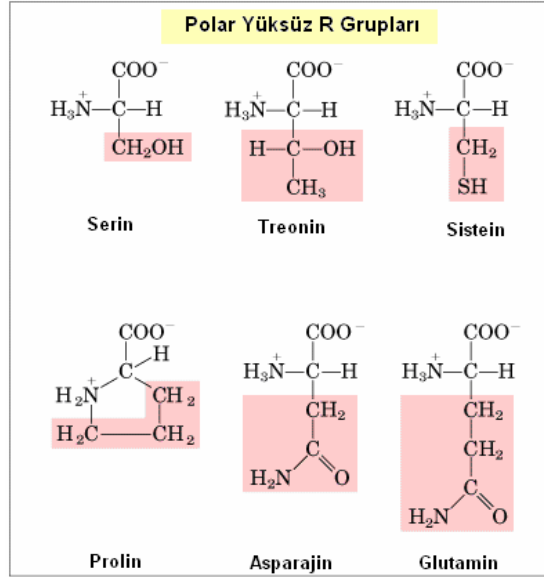


Şekil 2.7 Aromatik R Grupları (5)

### ***Polar Yüksüz R Grupları***

Bu grup amino asitler polar olmayan amino asitlere göre suda daha çözünebilir ve daha hidrofildir, çünkü içerdikleri işlevsel gruplar suyla hidrojen bağı yapar. Bu grup asitler Serin, Treonin, Sistein, Prolin, Asparajin ve Glutamini kapsar. Serin ve Treonin hidroksil gruplarıyla, Sistein sülfidril grubuyla, Asparajin ve Glutamin ise amid gruplarıyla ılımlı polariteye katkıda bulunurlar. Prolin ise, farklı bir halka yapısına sahiptir ve yalnızca ılımlı polardır. Prolin kalıntısındaki ikincil amino grubu (imino), prolin içeren polipeptid bölgelerinde yapısal esnekliği azaltıp, katı konformasyona neden olur.

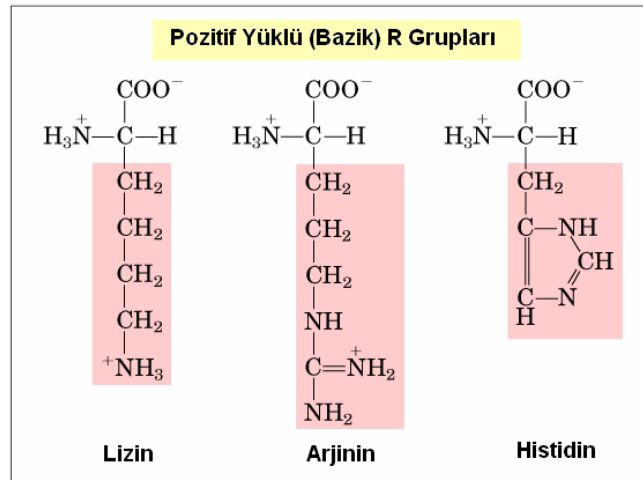
Asparajin ve glutamin, proteinlerde bulunan diğer amino asitlerden aspartat ve glutamatın amidleridir. Asparajin ve glutamin asit veya bazlarla kolayca hidrolizlenip bu amino asitlerde dönebilir. Sistein ise kolaylıkla, kovalent bağı dimerik amino asit olan sistine oksitlenir. Sistein iki sistein molekülünün veya kalıntısının disülfid bağıyla bağlanmış halidir. Polar olmayan bu disülfid bağı kalıntı, **kuvvetli hidrofobiktir**. Disülfid bağı, protein molekülünün bölümleri arasında veya farklı protein zincirleri arasında kovalent bağ yaparak birçok proteinin yapısı için özel bir rol oynar.



Şekil 2.8 Polar Yüksüz R Grupları(5)

### Pozitif Yüklü (Bazik) R Grupları

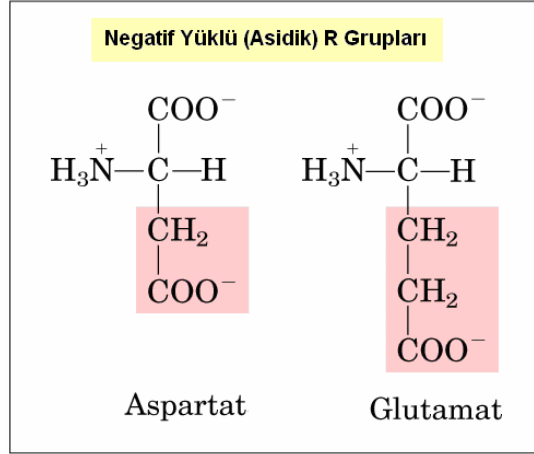
Hidrofilik R gruplarının çoğu, pozitif veya negatif yüklüdür. Alifatik zincirinin  $\epsilon$  pozisyonunda ikinci birincil amino grubuna sahip Lizin, pozitif yüklü bu guanidin grubuna sahip arjinin ve imidazol grubu içeren histidin pH 7.0 da pozitif yüklü R grubu içeren amino asitlerdir. Histidin nötrale yakın pKa değerine sahip iyonize olabilen yan zincir içeren tek standart amino asidir. Bir çok enzim katalizli tepkimede, His kalıntısı proton alıcısı/vericisi olarak tepkimeyi kolaylaştırır.



Şekil 2.9 Pozitif Yüklü (Bazik) R Grupları(5)

## Negatif Yüklü (asidik) R Grupları

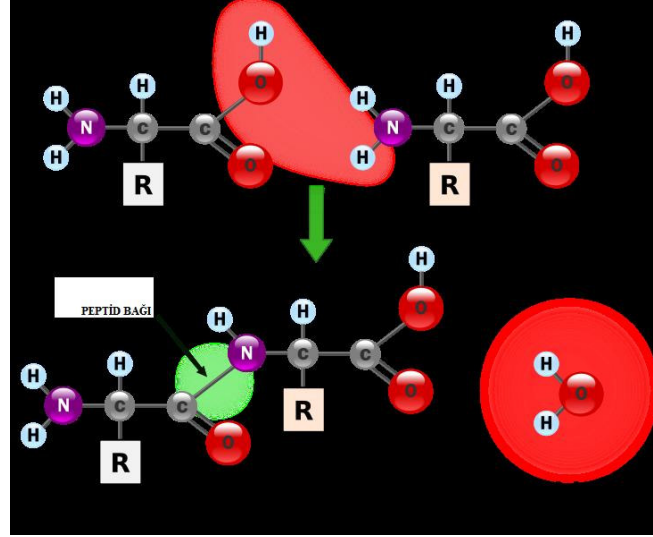
İkinci karboksil grubuna sahip Aspartat ve glutamat pH 7.0 'de negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asidir (Nelson ve Cox,2005).



Şekil 2.10 Negatif yüklü (asidik) R Grupları(5)

### 2.1.2 Peptidler ve Peptid Bağı

Peptid bağı, amino asidlerin peptidlere ve proteinlere polimerleşmesine yol açan kondenzasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bağıdır. İki amino asidin birleşmesiyle oluşan yapıya **dipeptid** denir. Basit bir dipeptid; bir amino asidin korboksil grubuyla diğer amino asidin amino grubu arasında kovalent bağ oluşması ve aralarından 1 mol suyun ayrılmasıyla oluşur. (6)



Şekil 2.11 iki amino asid arasında peptid bağı oluşumu  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Amino\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid))

Üç amino asidin iki peptid bağıyla tripeptid bağıyla bağlanmasıyla oluşan yapılar **oligopeptidler**, çok sayıda peptidin bağlanmasıyla oluşan, molekül ağırlıkları 10.000 'in altında olan yapılar ise, **polipeptidler** olarak adlandırılır (Nelson ve Cox, 2005).

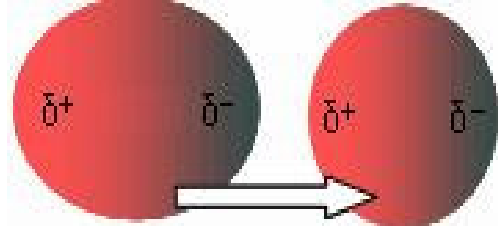
Polipeptidler lineer polimerlerdir. Bir polipeptid zincirinin ucundaki amino asid kalıntısı, serbest  $-NH$  grubu, amino asit kalıntısının diğer ucu ise serbest  $-COO^-$  grubuna sahiptir. Bu iki grup, N-ucu (N-terminus) ve C-ucu (C-terminus) olarak adlandırılırlar (Solomons ve Fryhle, 2004).

### 2.1.3 Proteinlerin ve Peptidlerin Yapısını Etkileyen Kovalent Olmayan Etkileşimler

Kovalent olmayan bağlarda bağlanmış atomlar arasındaki etkileşimler (yani non-covalent etkileşimler) doğal protein yapısı ve kararlılığını belirlemede önemli rol oynar. Termodinamik ve spektroskopik çözümler, bu kovalent olmayan etkileşimleri tespit etmek ve anlamak için kullanılır. Doğal ve katlanmış proteinler arasındaki serbest enerji genellikle birbirleri ile dengede olan entropik düzenlenmelerden kaynaklanır (Franks, 2002). Kovalent olmayan etkileşimler, proteinlerin yapılanmasında çok büyük önem taşırlar. Hidrojen bağı hidrofobik etkileşimler, elektrostatik bağlar ve Van der waals kuvvetleri protein konformasyonunda önemli bir etkiye sahip olan kovalent olmayan etkileşimlerdir.

### 2.1.3.1 Van der Waals Etkileşimleri

İki tane yüksüz atom birbirine çok yaklaştırılırsa, yüzeilerindeki elektron bulutları birbirini etkiler. Bir çekirdeğin etrafındaki konumlarının rastgele değişikliği, geçici bir elektrik dipolü oluşturabilir; bu arada çok yakınında bulunan bir diğer atom ise, dipole zıt bir elektrik dipol oluşturabilir. Oluşan bu iki zıt dipol birbirlerini zayıf bir etkileşimle çekerek, iki çekirdeği birbirine daha da yakınlaştırır. Bu zayıf güçteki çekimlere “**Van der Waals Etkileşimleri (ya da London kuvvetleri)**” denir.



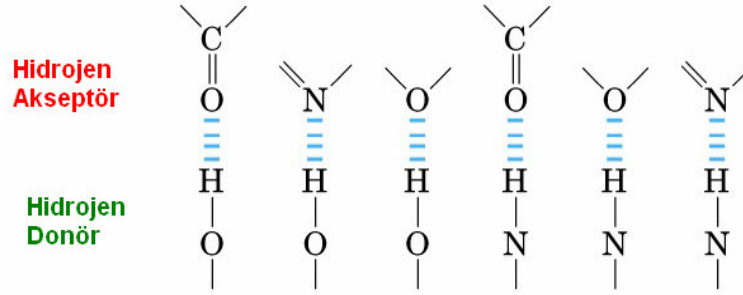
Şekil 2.12 Van der Waals kuvvetlerinin iki atom arasında oluşması(7)

([http://www.steve.gb.com/images/science/van\\_der\\_waals\\_forces.png](http://www.steve.gb.com/images/science/van_der_waals_forces.png))

İki çekirdek birbirine daha yakın bir duruma geldiklerinde, elektron bulutları birbirlerini itmeye başlar. Van der Waals temasında olduğu söylenir (Nelson ve Cox , 2005).

### 2.1.3.2 Hidrojen Bağları

Bir hidrojen bağı, azot ve oksijen gibi elektronegatif atomların hidrojenle etkileşime girmesiyle meydana gelir(McDonald,1994;Pace vd.,1996).



Şekil 2.13 Farklı moleküller arasında oluşabilecek Hidrojen bağlarının gösterimi(8)

Hidrojen bağları, proteinlerin üç boyutlu yapısının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu makromoleküllerde; makromolekülün bazı kısımları arasında meydana gelen bağlar sonucunda gelen bağlar sonucunda oluşan özel formdaki katlanmalar, makromoleküllerin fiziksel ve biyokimyasal rollerini belirler. Proteinlerde hidrojen bağları, bir ana zincirdeki oksijenler ile diğer zincirdeki amid hidrojenler ile diğer zincirdeki amid hidrojenleri arasında meydana gelir(Siegbahn vd.;1996).

Bir hidrojen bağının enerjisi yaklaşık olarak 2 ile 20 kJ /mol arasındadır. Bu enerji, bir protein molekülünün katlanmasının stabilizasyonu için yeterli bir enerji değildir. Bir protein katlanmasında, protein ile su molekülü arasında oluşan hidrojen bağı kırılır ve bazılarının yerini molekül içi hidrojen bağları alır ve çözücünün entropisi azalır(McDonald,1994;Pace vd.;1996).

Ayrıca proteinlerin yan zincirleri de, proteinin yüzeyinde hidrojen bağları oluşturabilme özelliğine sahiptir(9). Bazı amino asitler yan zincirlerinde taşıdıkları fonsiyonel gruplara göre, aralarında hidrojen bağları oluşturabilirler.

Örneğin :

- Alkol grubu içeren iki amino asit arasında: Serin, Tronin ve Tirozin,
- Biri alkol biri asid içeren iki amino asit arasında: Tirozin ve Asparajin

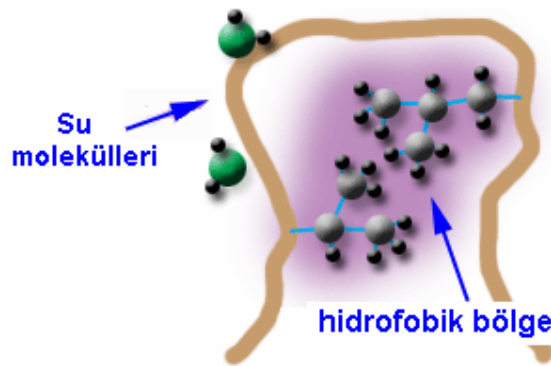


- İkiside asid grubu içeren amino asidler arasında: Asparajin ve glutamik asid.
- Biri alkol biri amin grubu taşıyorsa: Serin ve Lizin
- Biri alkol biri amid grubu içeriyorsa: Serin ve Asparajin.

### 2.1.3.3 Hidrofobik Etkileşimler

Polar olmayan gruplar, su ile etkileşmeyi pek tercih etmezler çünkü su ile hidrojen bağı oluşturmazlar. Polar olmayan grupların su molekülleri ile etkileşiminin olmaması, polar olmayan moleküllerin kendi aralarında etkileşime girmesi ile sonuçlanır; yani polar olmayan moleküller polar olmayan bir ortamı tercih ederler. Polar olmayan bu grupların başka polar olmayan gruplarla etkileşmeleri **Hidrofobik Etkileşimler** olarak adlandırılır. Hidrofobik etkileşimler, protein molekülünün sulu ortamdaki kararlı yapısının oluşmasına sebep olan katlanmalarının en önemli sebebidir (Patthy,1999).

Hidrofobik etkileşimler, molekülleri bir arada tutarlar. İki yada daha fazla hidrofobik grup, su molekülleriyle çevrildiklerinde, birleşme eğilimi gösterirler. Su molekülleri, su ağındaki hidrojen bağlarının engelleyici etkisini azaltmak için hidrofobik grupları bir araya getirir. Bu yolla hidrofobik grupların su molekülleri tarafından itilmesi ve bu şekilde bir arada tutulması, “hidrofobik bağlar” ile açıklanmıştır.



Şekil 2.14 Yüksük moleküller arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimler (10)

([http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b\\_weakforces.html](http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b_weakforces.html))

Hidrofobik etkileşimler, globular proteinlerin katlanması ve 3 boyutlu yapısını almasında en önemli kuvvetlerden biridir ve amino asitlerin hidrofobik yan zincirlerinin proteinin iç kısımlarına gömülmesi ile sonuçlanır. Frank ve Evans'ın ( Frank ve Evans,1945) polar olmayan türdeki moleküllerin, sudaki düşük çözünürlüklerini açıkladıkları çalışmalarına bağlı olarak, Kauzmann ilk kez 1950 lerin sonlarında proteinlerin katlanmalarının karmaşıklığını “**hidrofobik**” kavramıyla açıklamıştır (Kauzmann,1959).

Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin özel üç boyutlu bir yapı oluşturarak, fonksiyonel hale gelmek üzere katlanmasında en önemli faktördür. Amino asitlerin dizilişleri otomatik olarak, proteinin üç boyutlu yapısını belirler. Deneysel olarak ta bilindiği gibi, katlanma eğilimdeki proteinlerin hidrofobik yan zincirleri su moleküllerinden uzaklaşarak, proteinin iç kısımlarına çekilir.

Hidrofobik etkileşimleri bu kadar tercih edilebilir kılan şey ise, hidrofobik etkileşimleri kendiliğinde meydana gelmesi ve evrenin entropisinde azalmaya neden olmasıdır(Campbell ve Farrell 2006).

#### **2.1.3.4 Elektrostatik (İyonik) Etkileşimler**

Elektrostatik çekimler tarafından ortaya çıkan iyonik etkileşimler, iki karşıt yüklü ya da benzer yüklü moleküller arasında meydana gelir. Amino asit yan zincirleri, lizin, arjinin ve histidin amino asitlerinde olduğu gibi pozitif yük taşıyabilir veya aspartat ve glutamat amino asitlerindeki gibi negatif yük taşıyabilirler. Ayrıca, proteinlerin veya peptid zincirlerinin NH-ucu ve COOH-ucu çoğunlukla iyonize formda bulduklarından, protein veya peptid molekülleri pozitif veya negatif yükler taşıyabilirler.

Bütün bunlar proteinin yapısında elektrostatik etkileşimlerin meydana gelmesini sağlar. Yüklü moleküller genellikle, proteinin suyla etkileşimi girebileceği yüzeyinde yerleşmiş durundadırlar. Proteinin yüzeyindeki bu yüklü gruplar arasında meydana gelen etkileşimler “ elektrostatik etkileşimler” yada “tuz köprüleri” olarak adlandırılırlar. Ve bu etkileşimler proteinin stabilizasyonunda çok önem taşırlar. Bu etkileşimleri örnek olarak, pozitif yüklü lizin molekülünün, negatif yüklü lizin molekülünün, negatif yüklü glutamat molekülüyle etkileşimi şekilde gösterilmektedir.

### 2.1.3.5 Disülfit Bağları

Disülfit bağı, iki sülfür atomu arasında meydana gelen kovalent bir bağıdır. Bu kovalent bağlar, birincil dizilimde farklı pozisyonlarda yerleşmiş sistein amino asidlerinin R grupları arasında meydana gelir. Bu bağlar proteinlerin katlanması, yapısı ve fonksiyonu açısından oldukça önemlidir(Mustafaev ve Mustafaeva,2002).

Her sitein amino asidi, yan zincirinde fonksiyonel grup olarak tiyol grubu (-SH) taşır.Amino asidlerden birindeki sülfür atomu ile, amino asid diziliminde farklı bir pozisyondaki sistein amino asidine ait sülfür atomu arasında, tersinir (geri dönüşümlü) bir kovalent bağ meydana gelir. Ve tiyol grupları okside olarak disülfid bağını (S-S) meydana getirirler.

### 2.1.4 Peptid Sentezi

Peptid ismi ilk kez, 1906 da Emil Fischer tarafından bulunmuştur (Nispen,1987).

Bir peptid, 3-50 amino asidin bir araya geldiği bir zincirdir. Peptidlerin biyokimya, farmakoloji ve nörobiyolojide yapısal ve fonksiyonel olarak anahtar rolleri vardır ve enzimoloji, immunoloji ve moleküller biyoloji araştırmaları için önemli bir yere sahiptirler (Barany vd.,2004).

Birçok peptid, potansiyel olarak yararlı bir ajandır ve ticari bir öneme sahiptir. Peptidler genel olarak;

- Dokudan saflaştırma yoluyla (ancak bu yöntem dokulardaki bazı peptidlerin düşük konsantrasyonlarından dolayı zordur);
- Genetik mühendisliği yöntemleri ile;
- Doğrudan kimyasal sentez yöntemleri ile

Olmak üzere 3 yolla sentezlenebilirler. Bu yöntemlerin kullanılmasında pek çok zorluğun bulunması, kimyasal sentezi birçok açıdan önemli bir tercih haline getirmiştir. Ayrıca kimyasal sentez, ticari uygulamalara ilaveten, büyük proteinlerin özgül bölgelerinin sentezi, proteinin yapısı ve işlevinin çalışılması açısından artan bir öneme sahiptir. Bu teknolojiye ana katkı 1962'de R.Bruce Merrifield'den gelmiştir (Nelson ve Cox,2005).

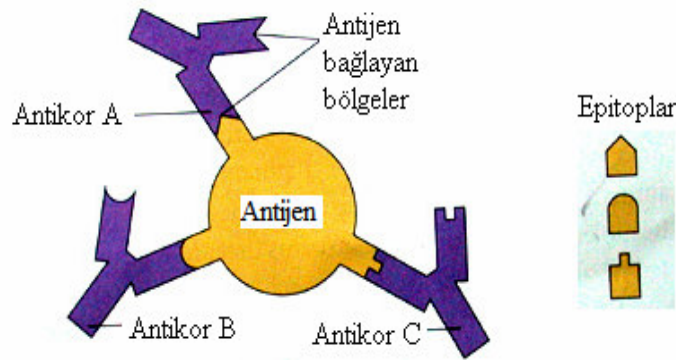
## 2.2 İmmün Sistem

İmmün sistemin günümüzde ileri derecede kompleks ve adaptasyon gösterebilen bir defans mekanizması haline gelmesi 400 milyon yıldan uzun bir süre almıştır. Ana işlevi, bizi yabancı ve zararlı maddelerden, mikroorganizmalardan, toksinlerden ve malign hücrelerden korumaktır. Dış ve iç ortamdaki kaynaklanan etkenlere karşı yaşayan organizmaların korunması, immün sistemin ancak devamlı bir gelişim halinde olması ile sağlanabilmektedir. Böylece immün sistem, endojen maddelere karşı destrüktif cevapları inaktif hale getirmeyi ve komşu dokularda gelişebilecek hasarları önlemeyi öğrenmiştir. Birçok immün cevap sınırlı bir süre devam eder ve aşırı reaksiyonların önlenmesi için düzenleyici mekanizmalarla kısıtlanır. İmmün sistemin esas görevi tehlikeli etkileri yararlı olanlardan ayırmasıdır. Örneğin mikroorganizmalar ve bakteriyel toksinlerle infiltrasyon bir organizma için tehlike oluştururken polen inhalasyonu veya yiyecek antijenlerinin mideden bağırsağa infiltrasyonu zararsızdır. Malign hücrelerin veya yabancı hücrelere ait materyalin destrüksiyonu olumlu etkiler iken (örn., paraziter enfeksiyonda) konak dokusuna karşı direkt ataklar (örn., oto immün hastalıkta) istenmeyen etkilerdir. İmmün sistemin kendine karşı destrüktif olaylardan kaçınması tolerans olarak adlandırılır. Primer lenfoid organlarda mevcut oto-antijenlere karşı yönlendirilmiş lenfositlerin birçoğu santral tolerans denen bir olayla ortadan kaldırılır. Periferik tolerans ise daha nadir endojen yapılarda veya vücudun bölgelerinde gelişen bir diğer mekanizmadır. Yunan tarihçi Thucydides, İsa'dan 430 yıl önce Atina'da çıkan veba salgınına tanımlayarak "bu hastalık aynı kişide asla iki defa görülüyor" diye kayıt düşmüştür. Eski insanlar, nasıl olduğunu bilmeseler bile zararlı etkileri karşılayacak ampirik yöntemler geliştirmişlerdir. Bir İngiliz hekim olan Dr Eduard Jenner (1749-1823), sığırcı çiçeği kabuğu ile James Phipps adlı bir kişiyi aşılama ve bir süre sonra bu kişide iyi bir bağışıklık gözlenmesi, Jenner'i bu konuda daha fazla çalışmaya sevk etmiştir. 1798'de çalışmalarını bir kitapta toplamış ve çiçek aşısının metotlarını içeren bu eserin üzerinden 2 yıl geçmeden aşı tüm Avrupa'da yayılmıştır. Böylece Jenner aslında yüzyıllardır bilinen, fakat yayınlanmadığı için üstü örtülü kalan çiçek aşısının kaşifi sıfatını kazanmış ve "İmmünolojinin Kurucusu" olarak kabul edilmiştir. İmmünolojide ilk bilimsel gelişme, bir kimyacı olan Pasteur'un 1880'lerde yaptığı gözlem ve deneylerine dayanır. Pasteur, tavuk kolerası etkeninin bekletilmekle virulansını kaybettiğini ve tavuklara verildiğinde, onları virulan süşun enfeksiyona karşı koruduğunu göstermiştir. Aynı yöntemle hayvanlar için şarbona karşı da bir aşı hazırladı. Ehrlich (1987) antikörlerin sentezi konusunda ortaya koyduğu teoriye göre, antikör üreten hücreler, yüzeylerinde çok çeşitli yan zincirler bulundururlar ve bunlar hücre içine besin maddelerini almakla görevlidirler. Bu yan

zincirlerden biri kendine uyan bir toksik madde ile bloke edilecek olursa hücre buna tepki olarak aynı yan zincirden fazla miktarda üretir. Bunların bir kısmı dolaşımında antikorlar olarak bulunur. Erhlich, ayrıca antijen-antikor birleşmesini anahtar-kilit ilişkisine benzetmiş ve reaksiyonun kimyasal yapıda olduğunu ileri sürmüştür. Elektroforez ve ultrasantrifügasyonla atılan ilk adımların ardından teknolojiye elde edilen baş döndürücü gelişmelerle (immün elektroforez, immün radyo mikroskopi, doku kültür tekniği, radyoimmünoassay, enzim immünoassay, immün flouresans, immün blotting, moleküler hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, flowsitometri ve diğerlerinin bulunması ve uygulamaya konulması) ve yine moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinde sağlanan ilerlemelerle knock-out transgenik fare modelleri gibi çeşitli genetik manipulasyonlar, uygun yöntemlerle birçok “bilinmeyen”in aydınlığa çıkmasını sağlamıştır (Erganiş ve İstanbuloğlu, 1993).

### 2.3 Antijenler

Bir organizmaya girdiği zaman kendine özgü immün cevaba yol açan ve sonuçta antikor oluşturan, efektör T lenfosit gibi immün cevap ürünleriyle özgül olarak *in vitro* veya *in vivo* koşullarda reaksiyona giren maddelere **antijen** denir. Antijen moleküllerinin yüzeyindeki antijenin özgüllüğünü belirleyen kimyasal yapılara determinant (antijenik uç), bu determinant gruplara **epitop**; epitopa uygun ve antikor molekülünde bulunan özgül uçlara **paratop** adı verilmektedir. Yalnız başına immün cevap oluşturmayan, ancak oluşmuş immün cevapla reaksiyona girebilen veya bir protein molekülü ile birleştiğinde antijen özelliği kazanabilen maddelere ise **hapten** adı verilmektedir. Antijenik özgüllüğü belirleyen determinantlara sahip bir taşıyıcı protein molekül ile birleşen haptenler, immün cevap oluşmasını sağlamaktadır (Özbal, 2000).



Şekil 2.15 Antijen molekülü (11)

### 2.3.1 Antijen Olabilme Özellikleri

**Yabancılık**, Biyolojik bir kriterdir. Bir kimyasal maddenin antijen olabilmesi için ilişki kuracağı canlının kalıtsal olarak yapısına yabancı olması gereklidir. Bu yabancılık onun kimyasal birimlerin diziliş farklılığından ve üç boyutlu yapısından ileri gelmektedir. Antijen organizmaya ne kadar uzak ise kaynak için o kadar iyi bir antijendir. Bakteri, virüs ve benzeri protista alemi canlılar insanlara tamamen uzaktır ve insanlarda çok antijen reaksiyonlar verirler (Özbal, 2000).

**Molekül Yüzey Yapısı**, Her determinant antijenik değildir. Bir antijeni oluşturan moleküller ne kadar farklı dizilirse antijenite o kadar artar. Farklı amino asitlerden oluşan proteinlerin tek tip moleküllerin birleşmesiyle oluşan lipitlerden daha antijenik olmasının nedeni budur Lenfositlerin; antijen yüzeyindeki determinantların kimyasal yapısı ile etkileşmesiyle, antijenin her bir determinantına özgü immün cevap oluşmaktadır. Antijenin determinantlarını oluşturan moleküller aynı olsa bile, moleküllerin sıralanışında farklı diziliş gösterenler, immün sistemi farklı uyararak değişik özgüllükte immün cevaba yol açarlar. Lizin, alanin, glutamik asit, tirozin gibi amino asitlerin eklenmesi ile antijenite artar ve bu moleküllerin farklı dizilişleri ile antijenik özellik de değişmektedir (Özbal, 2000).

**Molekül Ağırlığı**, Fiziko kimyasal bir kriterdir. Molekül ağırlığı ( $M_A$ ) 5 kilo dalton (kD)'dan düşük ise zayıf antijendir. Molekül ağırlığı arttıkça hacim ve yüzey de artar. Antijenin yüzey alanının fazlalığı antikorla etkileşip bağlanabilme özelliği artar. En kuvvetli antijenler molekül ağırlığı 100 kD'dan büyük olan protein ve protein bileşikleridir (Özbal, 2000).

**Çözünürlük ve Sertlik**, Antijen özelliği gösteren bileşikler, vücut sıvılarında metabolize olurlar. Konak organizmada yavaş adsorbe olan ve organizmadan yavaş atılan maddeler konak ile daha uzun süre ilişkide kalacaklarından antijenitesi daha yüksek olacaktır. Bazı kimyasal bileşiklerde tirozin ve prolin gibi amino asitlerin bulunması, moleküle yapısal sertlik vererek antijen olabilme yeteneğini artırmaktadır (Özbal, 2000).

Antijen niteliği taşıyan bir maddenin antijen olarak etkinlik göstermesinde önemli olan başka faktörlerde rol oynamaktadır. Antijenin girdiği konak türü, antijenin miktarı, antijenin giriş yolu ve giriş süresi immün cevabın oluşumunda önemli diğer faktörlerdir. Tür veya bireylerin lenfosit yüzeylerinde bulunan reseptör yapı farklılıklarına bağlı olarak, bazı antijenlerin bir tür organizmada immün cevap oluşturmalarına karşın, diğer bir türde bu cevap sağlanamamaktadır. Çok az miktarda verilen antijen immün sistemde yeterli uyarıyı yapamayarak immün cevap oluşturmayacağı gibi, çok fazla miktarda verilen antijen de immün sistemi baskılayarak immünolojik felç veya özgül immün cevapsızlık meydana getirebilmektedir (Özbal, 2000).

## 2.4 Antikorlar

Antijen veya immünojenlere karşı oluşturulan ve antijenik epitoplara ile özgül olarak reaksiyona giren moleküllere denir. Bunlardan spesifik bağlanma gösterenlere **antikor** denir.

Antikor moleküllerinin yapısal analizlerinin kapsayan çalışmaların en eskileri, immünize bireylerin kanında doğal olarak oluşan antikor karşılaşmaları ile ilgilidir. Antikorlar ilk kez kanın sıvı kesiminden (serum) elde edilmiş olup bunlar birkaç farklı anatomik bölgede bulunmuşlardır

i. Antikorlar stoplazmik membrana bağlı bölümlerde (endonlazmik retikulum ve golgi cisimliği) ve antikor moleküllerinin sentezlendiği B lenfositlerde bulunur.

ii. Antikorlar kan plazmasında (sıvı kesim) ve B hücrelerinden antikorların salgılandığı doku sıvılarında bulunurlar.

iii. Antikorlar mononükleer fagositler, antikor sentezlemeyen öldürücü hücreler ve mast hücreler gibi esasen immün etkili hücrelerin yüzeylerinde bulunurlar ki bunlar antikor bağlanması için özgün reseptörlere sahiptirler.

iv. Antikorlar mukus ve süt gibi salgı sıvılarında bulunurlar.

Kan ve plazma pıhtı halinde iken, geriye kalan sıvıda antikor ihtiva eden kesim *serum* adını alır. Bir kısım antijene bağlanan çok miktarda antikor molekülü ihtiva eden bir serum örneği *antiserum* adını alır. Plazma veya serum glikoproteinleri elektroforez yöntemiyle albumin ve globulinlere ayırabilir. Elektriksel alanda proteinler katoddan anoda doğru sırasıyla  $\gamma$  globulin,  $\beta$  globulin,  $\alpha_2$ - globulin,  $\alpha_1$ - globulin, ve albumin olmak üzere 5 bant halinde dizilir. Bu Ig'lerin çoğu  $\gamma$  globulin'dir.

Antikorların araştırma ve klinik tanılarda kullanımına yönelik pek çok test sistemi geliştirilmiştir. Bunlar antikorların spesifik oldukları ve antijene immün kompleksler oluşturarak bağlanmaları ile ilişkilidir. Böyle komplekslerin formasyonunda çözeltideki ışık saçmanı gözlenmesiyle antijen belirlenebilir. Ayrıca antikora özgü antijen santrifujle ve bu komplekslerin toplanmasıyla veya kimyasal ajanlarla antikorların çöktürülmesinde çözeltilerden saflaştırılabilir. Jellerde antijen-antikor çökeltileriyle antijen varlığı belirlenebilir. Klasik *Ouchterlony* yönteminde antijen ve antikorun jeldeki difüzyonuyla çözünmeyen kompleksin çökelti hakkında (antijen ve antikorun dengeye ulaştığı difüzyon bölgesinde) antijen tespit edilebilir.

On yıl öncesine kadar monoklonal antikorların basit bulunan poliklonal antikorlara karşı

tedavi bakımından önemli avantajlara sahip olduğu kabul edilmiştir. Son birkaç yıldır poliklonal antikorlarda bazı klinik uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar ya fare karın sıvısında veya in vitro üretim sistemlerinde yerleştirilmiş, transforme olmuş hücre soylarında elde edilir. Poliklonal antikor üretimi antijen ile immüni sonucu bağışıklanan hayvanın kanından sonra elde edilmesi ve bunun saflaştırılmasını sağlar. Antiserumlar denatüre proteinlerin immünoelot (=immün emdirme) ile belirlenmesinde veya immünpresipitasyonda (=immün çökeltme) başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Manaklonal antikorların afiniteleri (antijene ilgisi) belirlenebilir, ancak poliklonal antikorlar farklı afiniteli kompleks antikor karışımını ihtiva ettikleri için belirlenemez. Gerçi monoklonal antikor tekniklerinin gelişimi ile belirlenen ilerlemeler özgünlük, homojenlik ve antikorların sayısını değiştirirse de, poliklonal antikorlarda monoklonal antikorlardan daha makbul olan pek çok nitelik hala vardır. Örneğin, antiserum üretimi, monoklonal antikor üretiminden daha az zaman ve emek ister.

Birden fazla epitopu olan antijenler poliklonal antikorlarla karıştırıldıkları zaman moleküller arası köprülerle stabilize olan formdaki kompleksler oluşur. Kompleks formasyonda bir antikor birden fazla antijen molekülü bağlar.

Monoklonal antikorlar teşhisdeki yaygın kullanımlarının yanı sıra tedavide de önemli bir biçimde kullanılmaktadır. Kanserin kimyasal (kemoterapötik) tedavisinde, tümör antijenleri belirlenerek bunlara karşı elde edilen monoklonal antikorlar, özgün kimyasal ajanlara bağlanarak organizmaya verilir ve doğrudan monoklonal antikorların tümör hücrelerine yapışmasıyla tedavi gerçekleşir. Radyoaktif maddelerle işaretlenen monoklonal antikorlar ile de, organizmaya enjekte edilerek tümör yapıya bağlanması ve kanserin erken tanısı mümkün olmaktadır

Merkez sinir sistemi ve kalp hastalıkları, otoimmün hastalıkların tedavisi, toksik ilaçların incelenmesi, doku tanımlamaları, ilaç denemeleri, saflaştırma işlemleri monoklonal antikorların yaygın olarak kullanıldığı alanlardır. Monoklonal antikorlarla birçok tanı kitleri geliştirilmiştir: Doğum kontrol testleri, AIDS virüslerinin tanı kitleri, kanser tanısı, virüs enfeksiyonlarının tanı kitleri, bakteri enfeksiyonlarının tanı kitleri, bitki zararlıları olan antijenlerin tanı kitleri, vd.



### 2.4.1 Antijene Karşı Primer ve Sekonder Antikor Cevapları

Bir insan veya hayvana, belli bir antijen ilk defa enjekte edildiğinde, antijenin niteliğine, dozuna ve veriliş yoluna bağlı olarak, 7-10 gün içerisinde serumda antikorlar belirmeye başlar. Antikor düzeyleri 1-10 hafta boyunca artarak maksimuma vardıktan sonra, aylar içinde azalarak, hatta ölçülebilir düzeyin altına iner. Primer cevapta, antijen enjeksiyonundan sonra IgM antikorları, IgG antikorlarından daha önce sentezlenmeye başlar fakat 2. haftada IgG antikorlarının yükselmeye başlamasından sonra giderek azalırlar. Organizmada süreli antikor yapımını frenleyen feedback inhibitör mekanizmaların bulunduğu gösterilmiştir.

İmmün bellek hücreleri antijene ait bilgileri saklı tutarlar. Bu nedenle, antikor düzeylerinin düşmesinden haftalar, aylar, hatta yıllar geçtikten sonra aynı antijen yeniden şırınga edilirse, efektör T hücreleri ile antikor yapıcı hücrelerin süratle proliferere olmaları sonucu, bu defa, antikor cevabı daha süratle gösterir. Antikorum antijene affinitesinde primer cevapta olduğundan daha fazladır. (sekonder ve anamnestik cevap) Bu pozitif immünolojik belliktir. Sekonder cevapta sağlanan antikor yoğunluğu primer cevapta elde edilen yoğunluğun 10-50 katına ulaşabilir. Maksimum antikor cevabı için primer ve sekonder antijen enjeksiyonları arasındaki enterval 1 aydan az olmamalıdır. Sekonder immün cevapta IgM paterni primer cevapta olduğu gibidir. Burada antikor cevabını büyüten IgG antikorlarıdır.

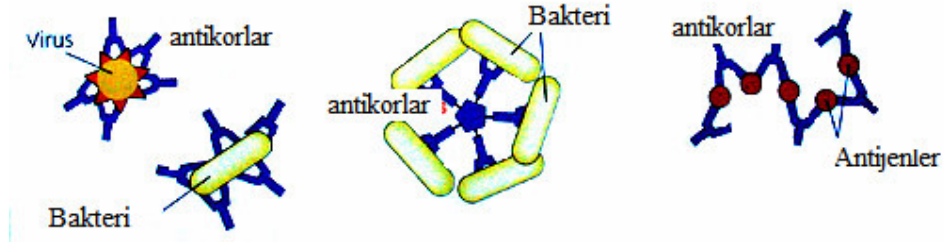
Primer cevabı oluşturan antijene benzer yapıdaki başka antijenler de (çapraz antijenisite gösteren enfeksiyon etkileri), ilk antijene ait primer antikor düzeylerini arttırarak sekonder (anamnestik) cevap oluşturabilirler.

Antikor düzeyleri, gereken hallerde uygun aralıklarla uygulanan destekleme (booster) dozlarla sürdürülebilir.

Antijenler "adjuvan" denen bir takım maddelerle birlikte enjekte edildikleri takdirde, spesifik antijene karşı organizmada daha güçlü bir immün yanıt oluşturabilirler. Genellikle fosfat ve aliminyum hidroksit gibi mineral tuzları; içinde öldürülmüş mikrobakteri bulunan madensel yağ-su emilsiyonları (Freund'un komplet adjuvanı) adjuvan olarak sıklıkla kullanılırlar. Bunlar antijeni enjekte edildiği yerde daha uzun süre tutmak suretiyle, immün sistemi uzun süreli stimüle ve belki forse ederek antikor cevabını büyütürler. Ancak bir immün cevabın büyüklüğü sınırsız değildir. Endükte edici ve baskılayıcı mekanizmaların birlikte çalışması ile immün cevap optimumda tutulur.

Bazı hallerde primer antijenik stimulus immün mekanizmada öyle değişiklik yapabilir ki,

ikinci stimulus tam tersine, zayıf immün cevap veya cevapsızlık oluşturabilir. Bu bir “negatif” bellek örneğidir ve “kazanılmış immün tolerans” olarak ta isimlendirilir.



Şekil 2.16 Antijene spesifik antikor molekülleri  
(<http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/aviruses/immune-system-part.html>)

#### 2.4.2 İmmüoglobulinlerin Yapısı

İmmüoglobulinler (=Antikorlar) antijenik uyarım sonucu B-lenfositlerin değişimi ile oluşan plazma hücreleri tarafından sentezlenir. Antikorlar kimyasal, fiziksel ve immünolojik olarak incelendiklerinde aralarında önemli farklılıklar bulunduğu saptanmıştır bu farklılıklar antikor moleküllerinin karbonhidrat miktarları, elektroforez hızları, molekül ağırlıkları, amino asit yapıları, taşıdıkları H(=ağır) polipeptid zinciri gibi özelliklere dayanmaktadır. Buna göre de birbirinden farklı beş ayrı özellikte immüoglobulin grubu ayrılmış ve İmmüoglobulin G (IgE) olarak adlandırılmıştır.

Bir kişinin kanında bulunan antikorlar bir karışımdır. Çeşitli antijenlerin çeşitli epitoplarına karşı olmuşlardır. Ig yapısını incelemek için kimyasal yapısı aynı, özdeş olan Ig'lere gereksinim vardır. Antikor sentezleme ile görevli olan plazma tümörleşirse (bu başlarsa) Multiple-myeloma denen bir hastalık meydana gelir. Myeloma hastalığında tek bir plazma hücresinden gelişen genetik yapıları aynı plazma hücre konileri meydana gelir. Bunların sentezlediği immüoglobulinler de aynı, özdeş kimyasal yapıya sahiptirler. Myeloma hücrelerince sentezlenen homojen yapıdaki bu immüoglobulinlerin araştırılmasıyla Ig yapısı hakkında bilgiler elde edilmiştir.

### 2.4.3 Bir immünglobulinin Moleküler yapısı

İmmünglobulinler glukoprotein yapısındadırlar ve yaklaşık %90'ı polipeptid , %10'u karbonhidrattır. İmmünglobulinler temelde benzer yapı gösterirler ve bir Ig molekülü "monomer" adı da verilen en az bir **temel birim**den oluşmuştur. Ig'lerin moleküler yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için, üzerinde en çok çalışılmış , incelenmiş ve monomer bir yapı gösteren IgG molekülünün yapısı örnek olarak anlatılacaktır. Diğer Ig çeşitlerinin farklı özellikleri yeri geldikçe belirtilecektir. Ig yapısını Şekil-2.17'yi inceleyerek açıklayalım.

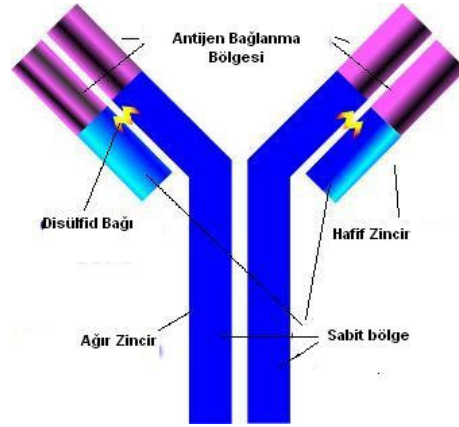
Bir Ig molekülü elektron mikroskopta incelendiğinde Y harfi şeklinde görülür. Ig'ler globulin yapısında protein olduklarına göre, polipeptid zincirlerinden meydana gelmişlerdir. Monomer (=bir temel birim)den oluşan IgG molekülünde iki çeşit polipeptid zinciri vardır ve her bir çeşitten ikişer adet bulunmaktadır.

- |        |                     |        |                   |
|--------|---------------------|--------|-------------------|
| - Ig G | (gamma ) H zinciri  | - Ig M | (mü) H zinciri    |
| - Ig A | (alfa) H zinciri    | - Ig D | (delta) H zinciri |
| - Ig E | (epsilon) H zinciri |        |                   |

Ig molekülünde hafif zincirler Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında, ağır zincirler ise hem kol, hem de gövde kısmında bulunurlar. Kollarda hafif ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları polipeptid zincirleri bir arada tutarak Ig molekülünü oluştururlar.

H ve L zincirlerinde her polipeptid zincirinde olduğu gibi NH<sub>2</sub> ile sonlanan bir aminoterminal uç ve COOH ile sonlanan karboksiterminal uç bulunur. Ig molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları aminoterminal uçlardır ve antijenler bu kısımlara bağlanır. H ve L zincirlerinin aminoterminal uca yakın olan kısımlarındaki aminoasitlerin diziliş sırası değişebilir özellikte olduğundan bu bölgelere **V bölgesi (=Variable=değişken)** adı verilir. Bu değişkel kısımlar Ig molekülünün (yani antikorun) oluşumuna neden olan antijen molekülüne uyacak özellikte sentezlenirler. Polipeptid zincirlerinin geri kalan kısmında değişkenlik görülmediğinden bu kısımlara **C bölgesi (=Constant=Değişmez)** adı verilir.

**Ig molekülü domenleri** : Ig molekülünü oluşturan polipeptid zincirlerinde ilmik şeklinde katlanmayla oluşan ve yine disülfid bağlarınca tutulan kıvrım veya kangal şeklinde yapılar vardır. Bunlara **Domen** (=kangal=Domain) adı verilir. Ig'lerin birçok fonksiyonu bu domenlerle ilişkilidir. Değişken bölgedekiler V domenleri (hafif zincirdekine VL, ağır zincirdekine VH ), değişmez bölgedekiler ise C domentleri (yine hafif zincirdekine C<sub>L</sub> , ağır zincirdekine, sayıları birden fazla olduğundan CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) olarak adlandırılırlar. Böylece hafif zincirlerde 2, ağır zincirlerde ise 4 adet domen bulunur. IgM ve IgE'de ise 5 adet (ek olarak CH<sub>4</sub>) domen vardır.



Şekil 2.17 İmmünglobulinin şematik yapısı

#### 2.4.4 İmmünglobolinlerin Antijenle Bağlanma Yeri

Antikorların antijenlerle girdiği reaksiyonlara göre işlevleri şöyledir.

Antitoksin antikorlar , aglütinin antikorlar , presipitin antikorlar, nötrleyen antikorlar ve kompleman bağlayan antikorlar.

Ig'nin Fab kısmı antijenle bağlanır. -Fc kısmı değişik hücre zarlarındaki FcR moleküllerine bağlanır.

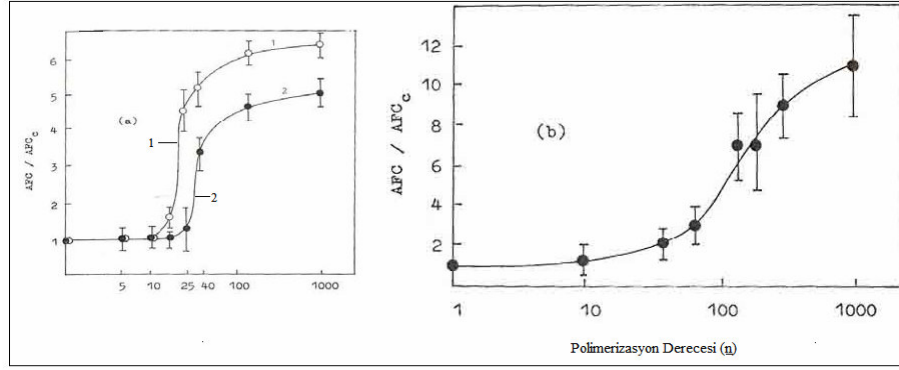
Ig'nin Fab kısmında , V-Değişken kangallarında , 30-35 , 50-55 , 95-100aa larda çok değişken bölgeler (Hypervariable Region) bulunur ki antijenle spesifik bağlanmada burada olur antijen epitopunun tamamlayıcısıdır.

#### 2.5 Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları

Doğal olmayan polielektrolitlerin organizmaya verildiğinde komplemant sisteme, hemopoiesise (Hemopoiesis), kan pırtılaşma sistemine etki ederek yüksek biyolojik aktiflik sağladığı bilinmektedir (Mustafev, 1996a). Polielektrolitlerin (PE) biyolojik etkilerinin temeli biyosistem komponentleri (hücreler, proteinler v.s) ile kooperatif etkileşimde bulunmalarına dayanmaktadır.

### 2.5.1 İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri

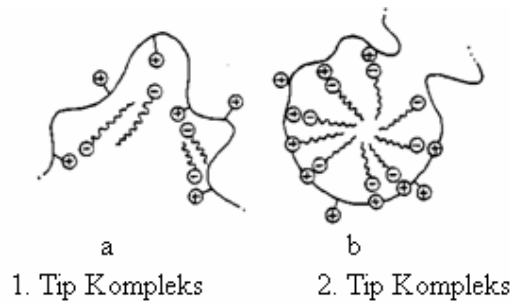
1970'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. PE'lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler hayvanlara immünize edilerek, immün cevabın yükselmesinde PE'lerin etkili oldukları gösterilmiştir. PE'lerin bakteri, virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması sonucu immün cevabın artması ve devamlı bir immün koruyuculuk sağlaması sentetik aşı tasarlama fikrini ortaya çıkarmıştır (Mustafaev, 1996a). Yüklü olmayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinil pirilidon, polietilen glikol) eritrositlerin kompleksleri yapılmış, fakat bu kompleksler immün cevapta artış sağlayamamışlardır yani bu tür yapılı polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bu bilgiler ışığında yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitlerin (PE), (negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen polimerler; polianyonlar, polikasyonlar ve bunların kopolimerleri) monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır (Mustafaev 1996c, 1996d, 1996e, 1996f, 1996 g, 1996h, Başalp, 1996; Özeroğlu, 1996b; Güney, 1997; Saraç, 1997a, 1997b; Özeoğlu, 1997; Mustafaev, 1998). Bunun nedeni şu şekilde açıklanmıştır: Bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilmektedir. Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır (Mustafaev, 1996a).



Şekil 2.18 Fare karaciğer hücrelerinde antikor oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 2-PC-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> ve Poliakrilik asidin (PAA) (b) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Peolielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10<sup>-6</sup> eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 2004, 1996a).

Bu konuda yapılan bu ve diğer fizikokimyasal ve immünolojik çalışmalar; immün sistemin uyarılmasında, PE'lerin immün hücrelerin yüzeyi ile etkileşimindeki kooperatif adsorbsiyonun önemli rolü olduğunu ve timusa bağlı olmayan polimer yapılı yapay immünojenlerin oluşum prensibini açıklamaya imkan vermektedir.

PE moleküllerinin sulu ortamlarda supramoleküler yapısının değişmesinin birinci yolu hidrofoblaşmasıdır. Bunun için poliyon zincirlerinin yüzey aktif maddelerle yüklenmesi gerekmektedir. PE'in yüzey aktif maddelere kovalent bağlanması veya yüzey aktif maddelerle PE'in arasında elektrostatik bağlarla kompleks oluşması ile PE'ler hidrofoblaştırılmaktadır. Polimer molekülü ile yüzey aktif maddeler (sodyum dodesil sulfat, sodyumdezoksi şelat, setil trimetil, amonyum bromür v.s.) arasında elektrostatik kompleks oluşumundan meydana gelen komplekslerin yapısı yüzey aktif madde/PE oranına bağlıdır (Mustafaev, 2004, 1996a)

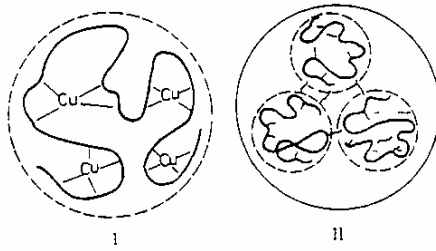


Şekil 2.19 a-b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri

Şekil 2.19 a'da yüzey aktif madde/PE oranının küçük olduğu değerlerde oluşan 1. Tip Kompleks, Şekil 2.19b'de ise yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun artması durumunda oluşan 2. Tip Kompleks görülmektedir. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun artırılması ile

birinci tip intramoleküler komplekste karşılıklı etkinin artması sonucu 2. Tip elektrostatik kompleks oluşur. 2. Tip kompleksin kompaktlığı 1. Tip komplekse göre daha fazladır (Mustafaev, 2004, 1996a).

Supramoleküler yapının değişmesinin ikinci yolu, PE'lerin geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturmasıdır. Bu metal iyonları az yüklü veya nötral polimer molekülleri ile birleşerek, bu polimerlerin hem komplementer yüzeylerle kompleks oluşturma etkisini, hem de polimer zincirlerinin çözeltideki konformasyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. Örneğin  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında intramoleküler agregasyon oluşturur ve partiküller asimetrik yapıya yakın bir forma geçerler (Mustafaev, 2004, 1996a).

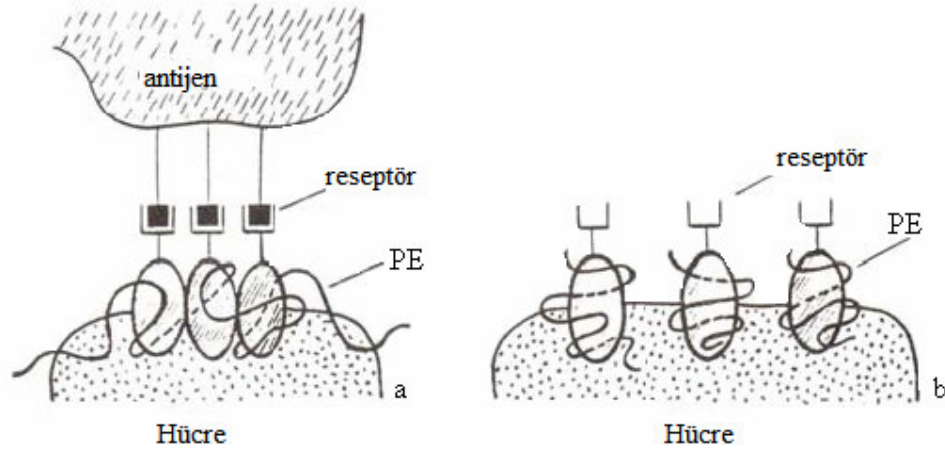


Şekil 2.20 Polimer-metal komplekslerinin  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \ll 1$  (I) ve  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \gg 1$  (II) oranlarında oluşan yapı

PE-Metal kompleks bileşenlerinin oranlarının sabit değerlerinde oluşan PE komplekslerinin yapısı çözeltideki PE'in başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Fazla seyreltilmiş çözeltelerde PE-Metal kompleksleri kompakt yapıdadır. Polimerin başlangıç konsantrasyonu arttıkça metal iyonları ile makromoleküller arasında çapraz bağlar oluşur ve sistemde assosiyeye olmuş asimetrik partiküller meydana gelir (Mustafaev, 1996a).

PE-Metal ve PE-Yüzey aktif madde komplekslerinin immün sistem üzerine etki mekanizması genelde aynıdır ve PE kompleksinin kimyasal yapı çevrimlerine bağlıdır. Kimyasal olarak açık yapı ile karakterize edilen PE kompleksleri immün sistemi güçlü uyaranlardandır. PE kompleksleri kompaktlaştığında ya immün sistemi uyardırmaz ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliğinin oluşmasında protein faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Öyke ki; kana enjekte edilmiş PE makromolekülleri kanda plazma proteinleri ve ya hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilirler ve makrofajlar tarafından adsorbe edilebilirler. Ayrıca; PE kompleksinin immün sistemi stimule etmesi; PE kompleks bileşiminin hem polimer zincir uzunluğuna, hem de kompleksin kompaktlığına bağlıdır. Stokiometrik olmayan PE kompleksleri antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında birden fazla noktada etkileşim imkanı sağlamaktadır (Şekil 2.21a). Stokiometrik PE

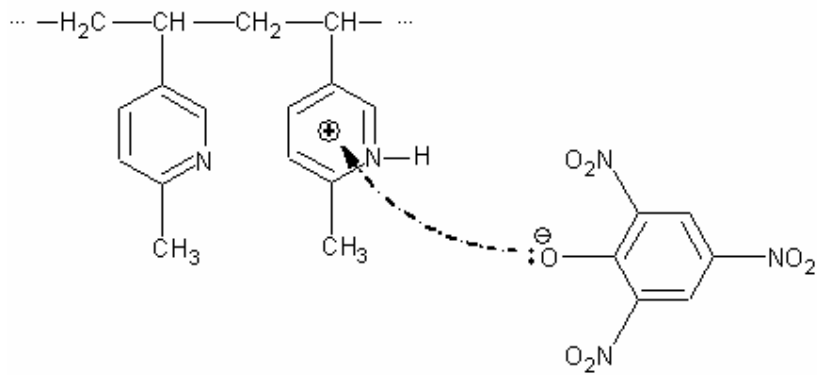
komplekslerinde ise antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim ihtimali azalmakta ve birbirinden izole olmuş kompleksler oluşmaktadır (Şekil 2.22b).



Şekil 2.21 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri  
(a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 2004, 1996a).

### 2.5.1.1 Poeliektrolit Komplekslerinin İmmünojenliği

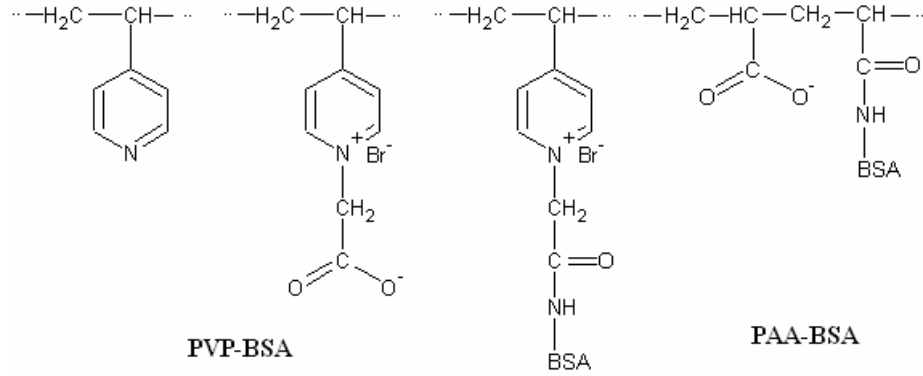
Doğal olmayan PE olarak sentezlenmiş ilk suni antijen poli-2-metil-5-vinil-piridininin trinitrofenol ile elektrostatik kompleksidir.



Bu suni antijen organizmaya immünize edildiğinde immün cevap oluşturması için bir adjuvanta (yardımcı) ihtiyaç göstermez ve timus organı olan veya olmayan hayvanlarda antikor oluşumunu artırır. Doğal olmayan ikinci tip antijen ise; kooperatif, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle kararlı hale getirilen proteinlerin PE-Protein kompleksleridir. Adjuvant olmadan enjekte edilen bu kompleksler bu proteine spesifik antikorların sentezini



uyarmışlar ve immün cevabın oluşmasının immün cevap genlerine ve timusa bağlı olmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda protein antijenlerinin PE'lerle olan kompleksleri efektif aşı özelliği göstermektedir. PE komplekslerinin yapısı ile (stabilitesinin, yükünün, konformasyonunun ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin) immünolojik aktivite arasındaki bağlar analiz edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında polimer bileşimli immünojenlerin model yapısı ortaya konulmuştur (Mustafaev, 1996a).



Şekil 2.22 Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı (Mustafaev, 2004, 1996a).

Poli-4-vinilpiridin (PVP) ve PAA polimeri ile BSA'nın kompleksleri oluşturup bu PE-Protein komplekslerinin immünojenliği incelenmiştir. Tüm bu deneylerden elde edilen sonuçlar immünojenliğin PE'lerin kimyasına bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar; PE-protein komplekslerinin organizma şartlarında kararlı olmasının, bu komplekslerin immün sistemi aktifleştirmesinin en önemli şartı olduğunu göstermiştir. Bu prosesin mekanizmasını anlamak için spesifik antikor oluşturan hücrelerin oluşum kinetiği incelenmiştir (Mustafaev, 1996a).

### 2.5.1.2 Immünojen Polielektrolit Kompleksinin çalışma modeli

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdırlar. İmmünolojik aktif (vaya "pasif") polielektrolit kompleksleri için aşağıdaki model gösterilmiştir (Şekil 2.23). Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz (Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1990, 1996a, 2004).

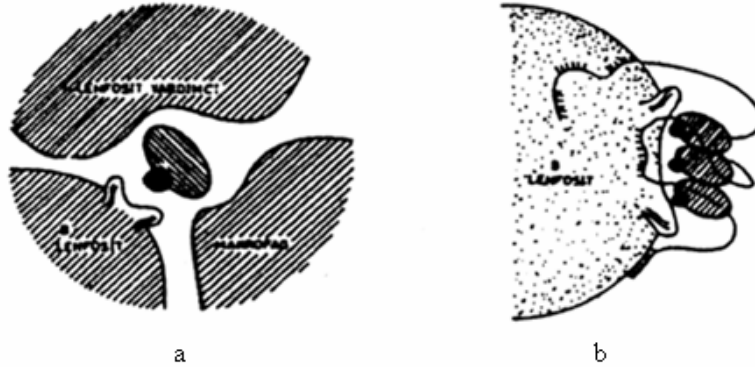


Şekil 2.23 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı.

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktali elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.
- 2) Stokiyometrik yapıli olmayan PEK'leri antijenin birkaç epitopunu içermelidir.
- 3) Yapısında "ilmik" olan PEK'lerin (polimerin bükülebiilen serbest bölümlerinin olması) hem protein yüzeyine yapışmış hem de serbest "ilmik"te bulunan ilave olarak iyonlanmış grupları, PEK yüzeyinde kompleks partiküllerinin çözeltide kalmasına yardım eden yayılmış hidrofili bölge yaratır.
- 4) Antijen moleküllerinden toplanmış ve polimer taşıyıcısı ile stabilize olmuş sert silindir (çubuk) tipli yapı; hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de büyük yüzey oluşmasını sağlar.
- 5) PEK'in biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler v.b.) çok noktali kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyeti; yapısında olan "ilmik"lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili PEK'ler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşma kabiliyetine sahiptir.
- 6) Antijen determinantlarının uygun yerleşmesi ve antijen hücre reseptörleri ile çok noktali karşılıklı etkisi için daha önemli sterik şartlara uygun olan yapıli kompleks. Bu nedenle polivalent aşilar yapmak için polielektrolit kompleksinin mekanik karışımı daha önemlidir.

Şekil 2.24a'da scannig elektron mikroskobu ile sığır eritrositlerinin immünolojik etkiye sahip olan polimerlerle ve bunların protein kompleksleri ile karşılıklı etkisinden oluşan polimer-

hücre komplekslerinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi hem polimerler hem de polimerlerin kompleksleri hücre ile interpolimer kompleks oluştururlar ve bunların agregasyonuna neden olurlar. Yukarıda açıkladığımız gibi hem saf polimer hem de polimer-protein kompleksleri T-hücrelerine bağlı olmadan immün cevap oluştururlar. Alınmış fizikokimyasal sonuçlar T-hücrelerine bağlı olmayan immün cevabın başlaması için antijen hücre kompleksinin sade hipotetik şemasını gösterme imkanı sağlamıştır (Şekil 2.24b).



Şekil 2.24 İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. A- T-Bağımlı cevap. B- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a)

T hücrelerine bağlı olmayan immün cevapta antijen B-lenfosit reseptörü ile yapı-spesifik kontaktın oluşumuna katılır (birinci spesifik sinyal). İkinci sinyal B-lenfositin yüzeyinde absorpsiyon olmuş polimerden ileri gelir.

## 2.6 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

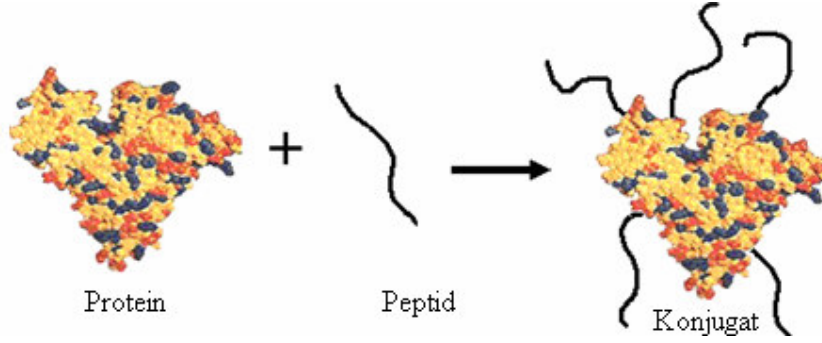
Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasid zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir (Deen vd., 1990). Büyük moleküler boyutlardaki BSA, KLH, OVA gibi globular proteinler, peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar (Acar S, 2006).

BSA ve KLH genel olarak en sık kullanılan taşıyıcı proteinlerdir ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar. Bağlanma (konjugasyon) bölgesi, peptid

dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki herhangi bir nokta olabilir. Peptidler içerdikleri aminoasid kompozisyonuna göre N- ucundan, C- ucundan ya da dizinin içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grubundan konjugasyona girebilirler. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Antijenik peptid dizilimi taşıyıcı proteine (BSA-Bovin Serum Albumin, KLH-Keyhole Limpet Hemocyanin, OVA-Ovalbumin vb.) bağlanacağı göz önünde bulundurularak sentezlenmelidir [12]. Antikor oluşumunda iyi sonuçlar elde etmek için uygun antijenik peptid dizilimini seçmek ve buna bağlı olarak konjugasyonun dizaynını yapmak oldukça kritik noktalardır. Peptidin taşıyıcı protein yüzeyinde konumlanması ve yerleşimi seçilen bağlanma yönteminden etkilenmektedir. Sisteine dayalı amino asid spesifik bağlanma yöntemleri genel olarak maleimidler ile yapılmakta ya da serbest -SH grubunun kovalent olarak etkileşmesine dayanmaktadır. Diğer bağlanma yöntemleri ise genel olarak serbest amino grupları için glutaraldehid ya da N-Hidroksisüksinimid reaktif grupları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Peptidler antikor oluşturmak amacı ile immünizasyon için proteinlerle bağlanacağı zaman konjugasyon için spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması, peptid dizilimine sistein eklenmesi gibi klasik yöntemlerden kaçınılması gerekmektedir (Deen vd., 1990, Acar S, 2006).

### **2.6.1 BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini**

Bovin Serum Albumin (BSA) antikor oluşumda konjugasyon için genel olarak en yaygın kullanılan taşıyıcı proteindir. Serum proteinlerinden albumin alt sınıfına aittir ve plazmadaki toplam proteinin yaklaşık yarısını albuminler oluşurmaktadır. Bu da albuminlerin plazmadaki en kararlı ve en yüksek znrlkteki protein olduğunu göstermektedir. BSA ise kolay erişilebilirliği, znrlğ vb. Avantajlarından dolayı; deneysel çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Yapısında taşıdığı çeşitli fonksiyonel gruplarından dolayı da konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler ya da haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir (Friedli, 1996).

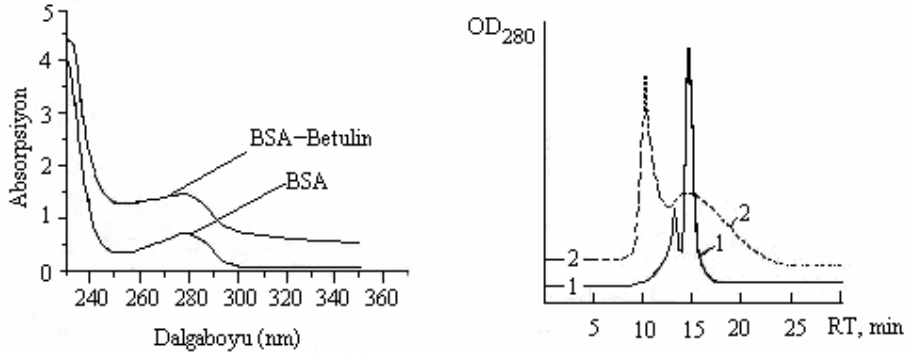


Şekil 2.25 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat

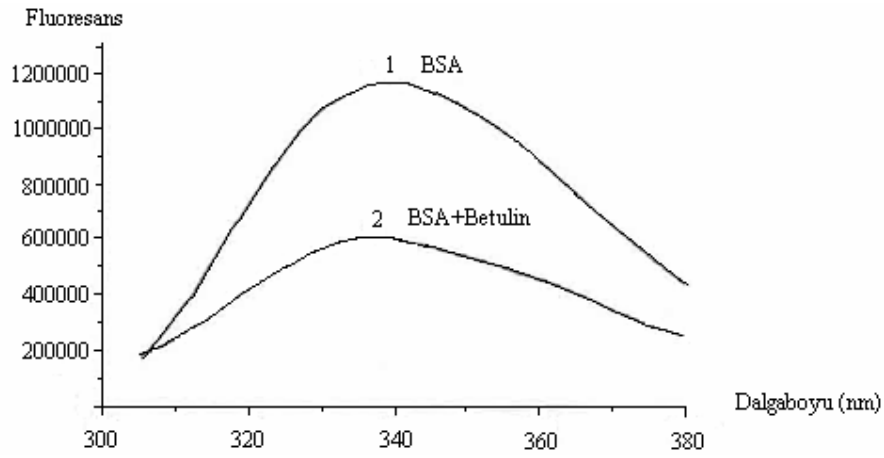
BSA'nın molekül ağırlığı  $66 \times 10^3$  Da olup diğer bir taşıyıcı protein olan Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)'e göre oldukça küçük ve ona göre hem daha yüksek çözünürlüğe sahip hem de daha immünojeniktir. BSA yapısında 60 adet lizin içeren ve 30-35 adet primer amin bölgesine sahip, zayıf antijenik moleküller için oldukça sık kullanılan taşıyıcı bir proteindir (Acar S, 2006).

### 2.6.2 BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar

Mustafaev ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan ve düşük immünojenik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA'ya % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA\*B konjugatları 1-etil3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlenmiştir. Suda çözünebilir özellikteki BSA\*B konjugatlarının UV analizi sonucu agregat oluştuğu gözlemlenmiştir. HPLC analizinde elde edilen kromatogramda ise BSA'ya ait pik ve alıkonma zamanı 1 olarak gösterilirken 2 numaralı örnek BSA\*B konjugatına aittir ve bu kromatogramda iki pik görülmüştür. Konjugatın alıkonma zamanının (RT)'da saf BSA'ya göre kaydığı gösterilmiştir. BSA\*B konjugatına ait kromatogramdaki ilk pik konjugata ikinci pik ise ortamda bulunan ve reaksiyona girmemiş serbest BSA'ya ya da birkaç Betulin molekülüne bağlanmış BSA'ya aittir (Mustafaev vd., 2002).



Şekil 2.26 Saf BSA ve BSA\*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA\*B konjugatı) (Mustafaev vd., 2002)



Şekil 2.27 Saf BSA ve BSA\*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA\*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002)

Deen ve arkadaşlarının (1990) düşük orandaki hidroliz özelliğinden dolayı konjugasyon reaktifi olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)'i seçtikleri konjugasyon çalışmasında, taşıyıcı protein olarak içlerinde BSA'nın da bulunduğu çeşitli moleküllerin, sentetik peptidler (SP) ile konjugatları sentezlenmiştir. N-metil imidazol (NMI)'ün kullanıldığı konjugasyon reaksiyonundan elde edilen konjugatlar ile standart EDC bağlanma reaksiyonu karşılaştırılmış ve NMI'ün bağlanma reaksiyonu ve konjugatın immünojenliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda NMI ile oluşturulan konjugatların serbest peptidlere karşı daha spesifik immün cevaplar oluşturduğu saptanmıştır (Deen vd., 1990.).

## 2.7 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

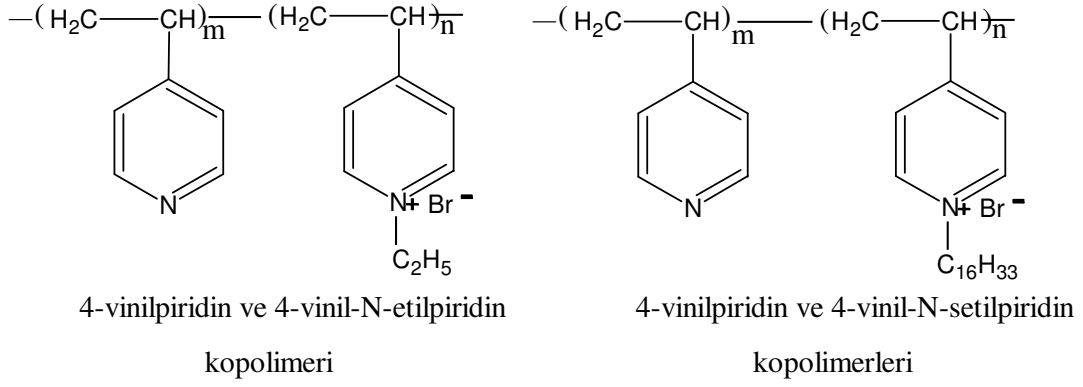
Zayıf immünojenik özellikteki sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidler, proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilik asid (PAA), PoliN-isopropilakrilamid (NIPAA), PoliN-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilik asid (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar (Gürhan vd., 2002).

Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptenler vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immünojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünebilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte olanların suda çözünebilirliğini arttırmak,
- Bölgesel etkilerini yükseltmek,
- İmmünojenik etkilerini ve immünoreaktifliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002, Acar S, 2006).

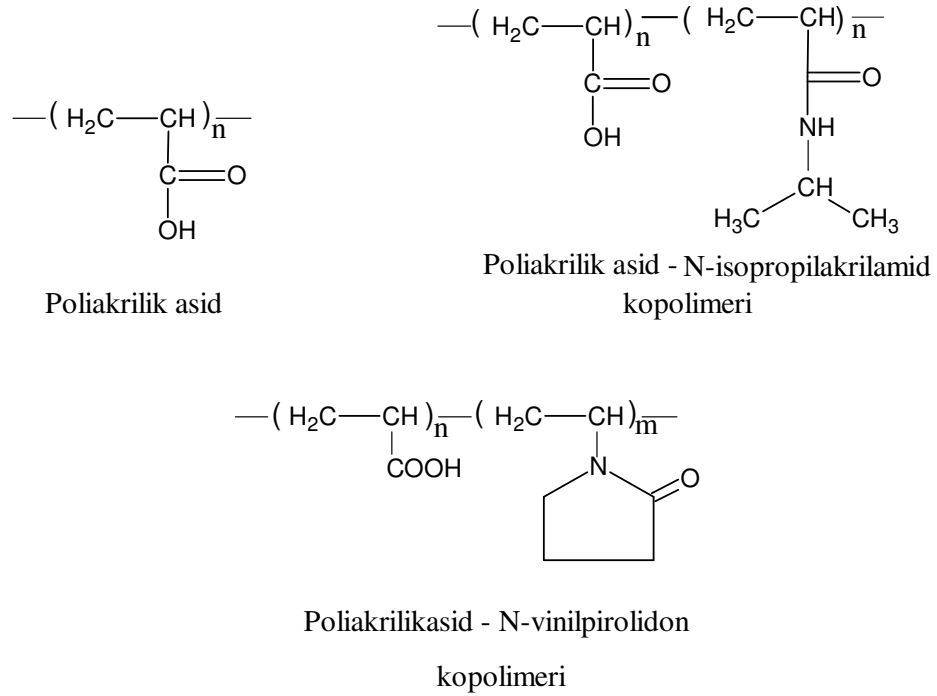
Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünolojik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımıdır (Mustafaev, 1996a). Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi aşağıda verilmiştir (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002).

→ **Katyonik Polielektrolitler**



Şekil 2.28 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler

→ **Anyonik Polielektrolitler**

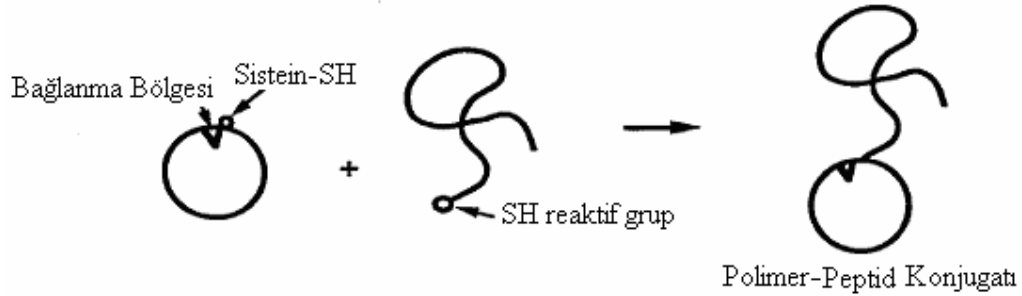


Şekil 2.29 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler

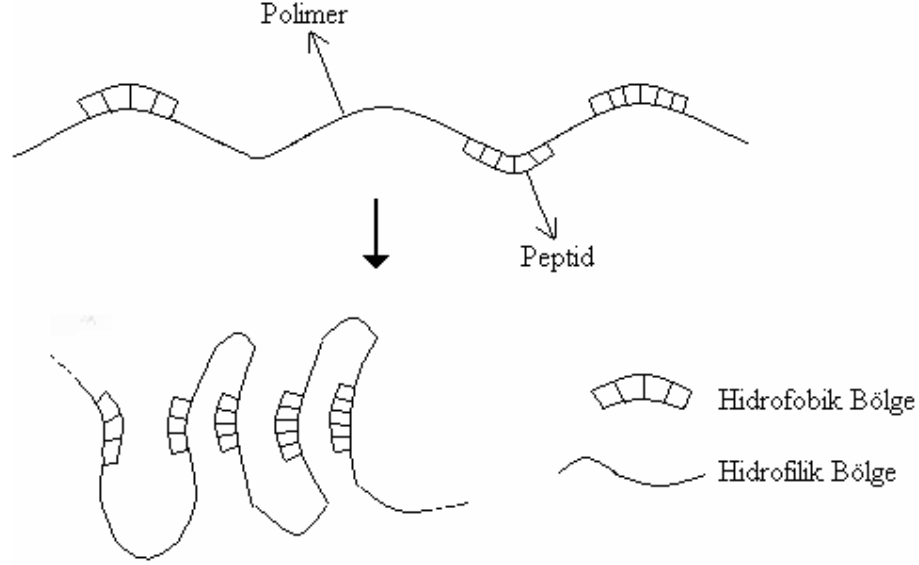


Polielektrolitler, sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yeni nesil aşı bileşenleri olarak düşünülmektedir (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002, Acar S, 2006).

Mustafaev ve arkadaşları tarafından geleneksel metodlar kullanılarak, sudaki makromoleküllerin aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonlar ile protein-lineer polielektrolit, peptid-lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleştirilen iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu; Polimerin karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive edilmesi ve sonrasında karboksil grupları ile proteinin ya da peptidin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonunun oluşumu ile gerçekleşir. Birinci basamak süresince karboksil grubunun karbodiimide saldırması ile O-açılısoüre ara ürünü oluşmaktadır. Daha sonrasında kararsız olan bu ara ürüne peptid ya da proteindeki amino gruplarının saldırmasıyla polimer ile peptid veya protein arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir.



Şekil 2.30 Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000)



Şekil 2.31 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerlerle oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, Mustafaev, 2004)

Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip olduğu Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve konjugatın yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (Mustafaev, 2004).

## 2.8 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugasyon prosedürlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasal reaktiflerdir. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar (Hermanson, 1996).

Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 Å° (1

$A^\circ = 1 \times 10^{-10}$  m) uzunluğunda bir arabulucu (spacer) bulunmaktadır (arabulucu uzunluğu  $0 A^\circ$  olan bağlayıcılar özel bir alt bölüm olan Direkt Çapraz Bağlayıcılardır).

Arabulucu içeren bağlayıcıların bazı avantajları;

- Değişen uzunluktaki arabulucu mesafesi peptide, taşıyıcı protein yüzeyinden çıkabilme özelliği sağlamakta ve böylece peptid daha ulaşılabilir olduğundan daha fazla antijenik özellik göstermektedir.
- Arabulucu en fazla 6 metilen zincirinden oluşmaktadır ve başka bir fonksiyonel grup içermemektedir. Bu da istenmeyen immünolojik cevapların oluşumunu önleyecektir.

Çapraz bağlanma reaktifleri kullanılarak kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır.

### 2.8.1 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların diğer bir grubu ise zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekülü arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlamakta yani ilk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır. Ancak birçok konjugasyon reaksiyonu elde edilen konjugattaki moleküller birbirlerine bağlanırken yapıya yabancı bir madde girmiştir ve bu madde konjugatın kullanılmak istendiği yere göre zararlı olabilmektedir. Örneğin peptid-protein konjugatları, taşıyıcı proteine bağlanmış olan peptide karşı immün cevap oluşumu amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler (Hermanson, 1996 Acar S, 2006).

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

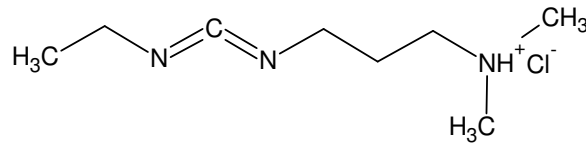
- Primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,
- Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,
- Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır.

### 2.8.1.1 Karbodiimidler

Polimer-peptid, peptid-protein, protein-protein, konjugatlarının oluşturulmasında kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilen karbodiimidlerdir. Suda çözünebilir ve çözünemeyen formlarının bulunduğu karbodiimidler; karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk ederler. Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler daha çok biyokimyasal konjugasyonlarda tercih edilmektedir çünkü biyolojik kökenli birçok makromolekül sulu tampon çözeltilerde çözünmektedir. Sadece karbodiimidler değil aynı zamanda yan ürünler olan üre türevleri de suda çözünen özellikte olduğundan konjugatın saflaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Bunun yanı sıra suda çözünemeyen özellikteki karbodiimidler genel olarak peptid sentezinde ve moleküllerin sadece organik çözücülerde çözünmesi gereken biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda meydana gelen ürünler ve yan ürünler de sadece organik çözücülerde çözünebilmekte suda çözünmemektedir (Hermanson, 1996, Acar S, 2006).

### EDC

EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünebilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünebilir olduğundan diyaliz ya da jel filtrasyon ile kolayca ortamdaki uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar saflaştırılabilir (Sheehan vd., 1961, 1965). Ancak EDC suyun varlığında kararlı olmadığından kimyasal -20 °C'de saklanmalıdır. Daha sonrasında kimyasal kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilmeli ve öyle açılmalıdır bu EDC'nin erkenden bozunmasını önlemektedir. EDC'nin küçük miktarlarını reaksiyon ortamına eklemek için suda stok çözeltisi hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasalın aktivitesini kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir.

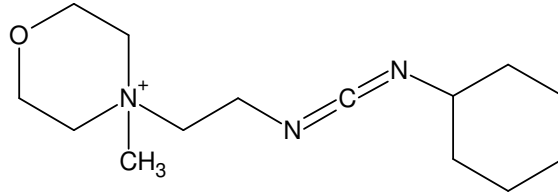


Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Yamada vd., 1981; Chase vd., 1983; Chu vd., 1976; Chu ve Ueno,

1977). Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu  $\delta^+$  yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisoüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir (Williams ve Ibrahim, 1981). Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örneğin sülfidril grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir.

### CMC

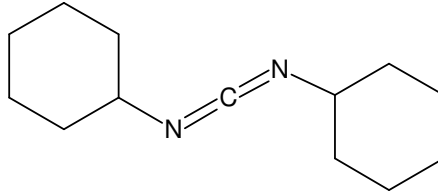
Suda çözünebilir özellikteki 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin konjugasyonunda kullanılmaktadır. Moleküle suda çözünebilme özelliğini sağlayan yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubudur (Hermanson, 1996).



CMC = 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid

### DCC

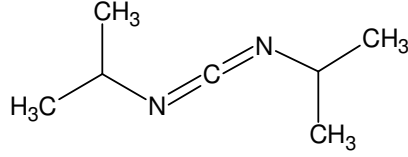
Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir ve 80 °C'a kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilir (Hermanson, 1996 Acar S, 2006).



DCC = N,N' Disiklohegzil karbodiimid

**DIC**

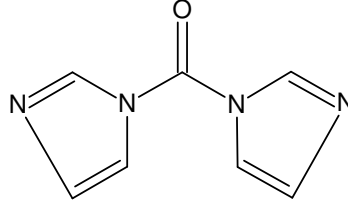
Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir (Hermanson, 1996).



DIC = Diizopropil karbodiimid

**N,N-Karbonildiimidazol**

N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diğer bir direkt çapraz bağlama reaktifidir (Hermanson, 1996).



CDI = N,N'-Karbonildiimidazol

Karbodiimidler oldukça reaktif moleküllerdir ve amino asitlerin rasemizasyonuna neden olabilirler. Bu nedenle, fosfonyum ve uronyum reaktifleri geliştirilmiş ve bu reaktifler yardımıyla aktif ester oluşturulması hedeflenmiştir. Bu moleküller komşu grupların etkisinden (neighbouring effect) dolayı çok tercih edilirler (Chang ve White, 2000 Acar S, 2006).

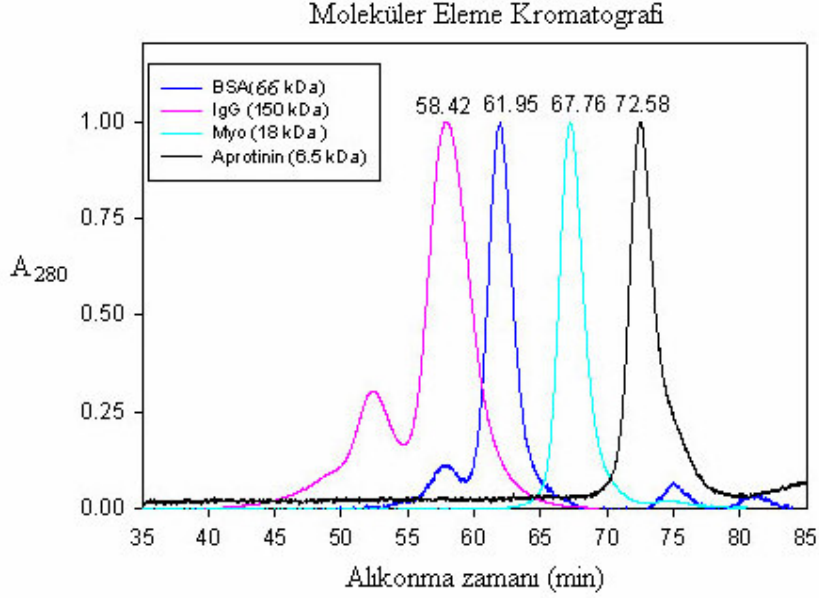
### 3. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

#### 3.1 Moleküler Eleme Kromatografisi

Kromatografi çeşitli maddeleri (biyolojik moleküller, sentetik polimerler, sentetik peptidler vb.) incelemek için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Metod bileşenlerin, 10 cm (HPLC) ile 30 cm (GC) arasında değişen boylarda kalibre edilmiş tüplerden oluşan kromatografik kolon içerisinden geçerken ayrılması temeline dayanmaktadır ve kolon silikajel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri ile doldurulur (Kosarev ve Muranov, 2003).

Moleküler Eleme Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak likit kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır [13]. Monomerik, oligomerik ya da polimerik çoklu bileşenli sistemler, mikro gözeneklere sahip jelde, moleküler eleme prensibine göre ayrılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan protein, peptid gibi biyolojik moleküllerin molekül boyutları birbirlerinden farklıdır. BSA çözeltilerinde; monomer, dimer ve trimer olarak bulunmaktadır. Çalıştığımız şap hastalığı peptidi ise BSA ya göre çok daha küçük bir molekül boyutuna sahiptir. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan serbest peptid, N-metilimidazol ya da üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan BSA gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır (Şekil 3.1) [14]. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Viskozite, Işık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir (Acar S, 2006).



Şekil 3.1 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram

### 3.2 Floresans Spektroskopisi

Spektroskopi, elektromagnetik dalga ile moleküllerin etkileşmesini inceleyen deneysel tekniklerin en önemlilerinden biridir. Floresans spektroskopisi ise maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuştur ve absorpsiyon spektroskopisine benzemektedir ancak absorpsiyon spektroskopisine göre daha hassastır. Floresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassaslıkla tayin edilebilir. Floresans özelliği gösteren maddelerin sayısının az olması yöntem için bir dez avantaj olsa da metodun seçiciliğinin yüksek olması yöntemin önemli avantajlarından bir tanesidir. Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden floresans özellik gösteren Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninden Triptofan en yüksek floresansa sahiptir.

Çalışmamızda kullanılan Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisinin -N terminal uc kısmına eklenen tritofan amino asidi ile yapıya floresans özelliği kazandırıldı.

Serbest haldeki proteinde daha açıkta olan Trp sulu ortamla etkileşim içerisinde ve daha düşük enerjili ışığa ile uyarılabilmektedir. Konjugasyon gerçekleşip Trp sulu ortamdan uzaklaşıp daha içeriye hidrofobik bölgeye girdikten sonra uyarma için gereken enerji artacaktır.



$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.1)$$

Eşitliğinde de görüldüğü üzere uyarma için gereken enerjinin artması dalga boyunun küçülmesine yani  $\lambda_{\max}$  değerinde daha küçük dalga boyuna doğru kaymaya (blue shift) neden olacaktır. Uyarıldığı dalga boyu kayan molekülün yaptığı floresans ışımının  $\lambda_{\max}$  değeri de buna bağlı olarak küçülecek ve blue shift verecektir.

Çalışmamızda öncelikle serbest peptidin  $\lambda_{\max}$  değerleri floresans spektrumları alınarak saptanmıştır sonrasında elde edilen konjugatlarımızdaki Trp'ın konformasyon değişikliğine bağlı olarak değişen  $\lambda_{\max}$  değerleri saptanış ve gözlenen kaymalar yardımı ile konjugasyon oluşumu incelenmiştir (Acar S, 2006).

## **4. DENEYSEL KISIM**

### **4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler**

#### **4.1.1 Kullanılan Cihazlar**

Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre

Precisa XB 220A Hassas Terazî

Sartorius CP225D Hassas Terazî

PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrometre

ThermoLab System Mikroplaka Yıkayıcı 4MK2

ThermoLab System Multiskan Ascent Mikroplaka okuyucu

Heidolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı

Binder Vakum Etüvü

Finnpipette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)

Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı

Shimadzu HPLC Sistemi

IKAMAG Çoklu Karıştırıcı

Milipore-Q Gradient Saf su Cihazı

Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.22 µm

WTW pH level 1 pH metre

Hanna pH221 pH metre

Heidolph Reax top Karıştırıcı

#### 4.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Kimyasal Maddenin Üretildiği Firma
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 40-60 dizilimli sentetik peptidi	Sigma Genosys
Poliakrilik Asid $M_w$ 100 000	Aldrich Chemical Company. Inc.
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropil) kardobodimid hidrasklorür (EDC)	Sigma E7750
4-nitrofenil Fosfat	Sigma 3254
Antimouse Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz	Sigma A0162
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma A 7030
Glukoz, Sigma Ultra %99,5 GC	Sigma G7528
Glycin	Applichem A 1067
Hidroklorik Asid (HCL)	Riedel-de Haen 07102
Magnezyum klorid ( $MgCl_2$ )	Applichem A 1036
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Fluka 71647
Poliakrilik asid ( $M_w$ 100 000)	Aldrich 523925
Sitrik asid Monohidrat	Fluka 27490
Sodyum azid ( $NaN_3$ )	Applichem A1430
Sodyum dihidrojen fosfat ( $NaH_2PO_4$ )	Riedel-de Haen 04361
Sodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ )	Fluka 71647
Sodyum klorür (NaCl)	Fluka 71376
Süt Tozu (Casein)	Sigma C 7078
tri-Sodyum sitrat	Merck 1,06431
Tween 20	Applichem A1389

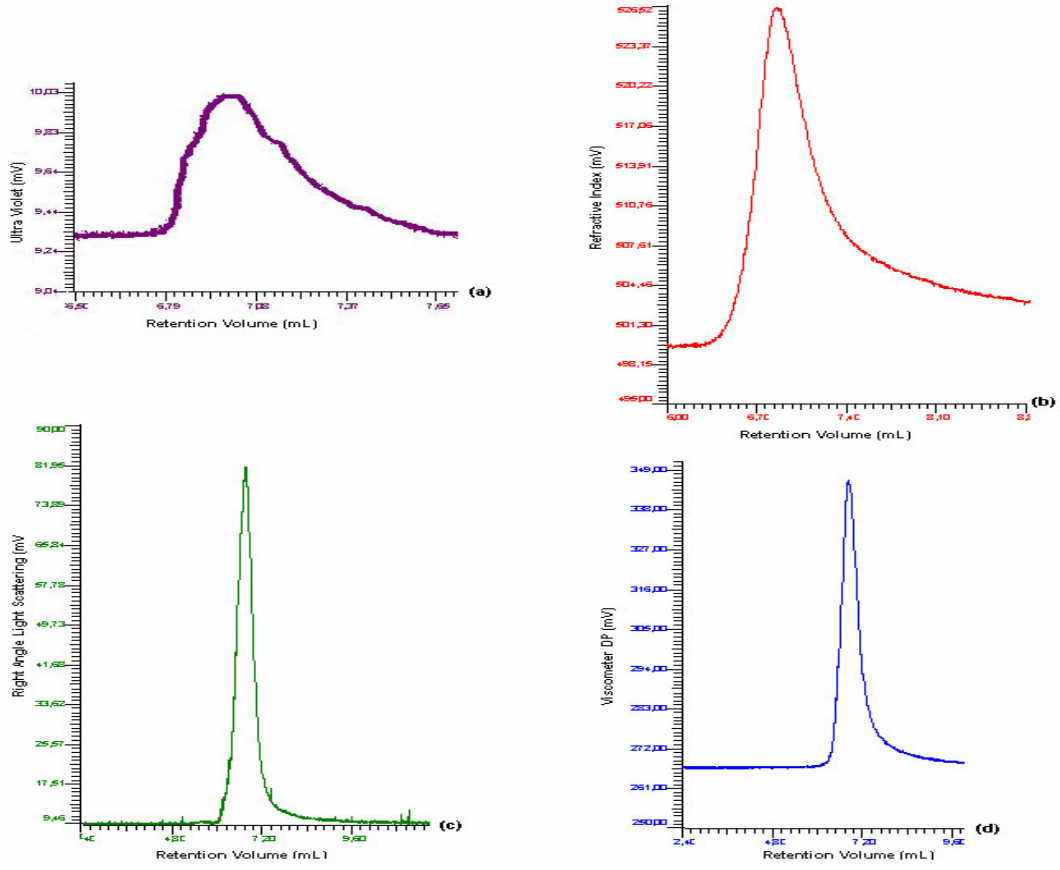
## 4.2 Poliakrilik asid

*Poliakrilik asid (PAA)* : Molekül ağırlığı 100.000'dir.

Poliakrilik asit iyonlaşma derecesi, pH ve sulu çözeltinin iyonik gücüne bağlı olan zayıf bir polielektrolittir. PAA, düşük pH'da hemen hemen disosiyeye olmamasına karşın  $\text{pH} \geq 8$ 'de tamamen yüklü bir zincire sahiptir. Poliakrilik asit, proton alabilen iyonik olmayan çeşitli polimerler, onların türevleri ve katyonik polielektrolitlerle sulu yada organik çözelti ortamında interpolimer kompleks oluşturur.

Kompleks oluşumunda, ortamda karşısındaki ile iletişim içerisinde bulunan polimerin doğası ve molekül ağırlığı gibi bazı parametrelerin yanı sıra çözücü, pH, çözeltinin iyonik gücü, sıcaklık ve polimerin konsantrasyonu önemli etkiye sahiptir. Bunun için metal iyonlarının yüklü makromoleküller ile ilişkisi, herhangi bir ortamda ve biyolojik sistemlerde sergiledikleri fizikokimyasal davranışları anlamak bakımından önemlidir(Mori vd., 2003).

Deneyleerde kullandığımız PAA ticari olarak Sigma Genosys firması tarafından elde edilmiştir. PAA' nın karakterizasyonunu incelemek için, Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M fosfat tamponu (PBS), %0.05 sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen dört dedektörlü Viskotek cihazında analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.1 de görünmektedir.



Şekil 4.1 0.01 M PBS pH 7 içerisinde hazırlanmış % 0.05 PAA çözeltisinin Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

PAA (Mw 100.000) polimerinin dört detektörlü Viskotek cihazından alınan sonuçlar incelendiğinde; bu polimerin UV özelliğine sahip olmadığı görülmektedir.

### 4.3 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Sentetik Peptid Dizisi

Şap hastalığı, halk arasında tabak hastalığı olarak bilinen, bütün çift tırnaklı hayvan türlerinde görülebilen bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık için; Aft Humması, ayak-ağız hastalığı (foot-mouth disease) isimleri de kullanılmaktadır [15].

Şap hastalığı sığır, manda, koyun, keçi ve domuzlarda olduğu gibi, vahşi hayvanlarda da görülebilen oldukça enfeksiyöz bir hastalıktır. Şap hastalığı etkeni olan ve *Picornaviridae* familyasından Aphthovirüs genusuna ait virüsün, immünolojik olarak ayırt edilen yedi

serotipi (O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Asya 1) vardır.

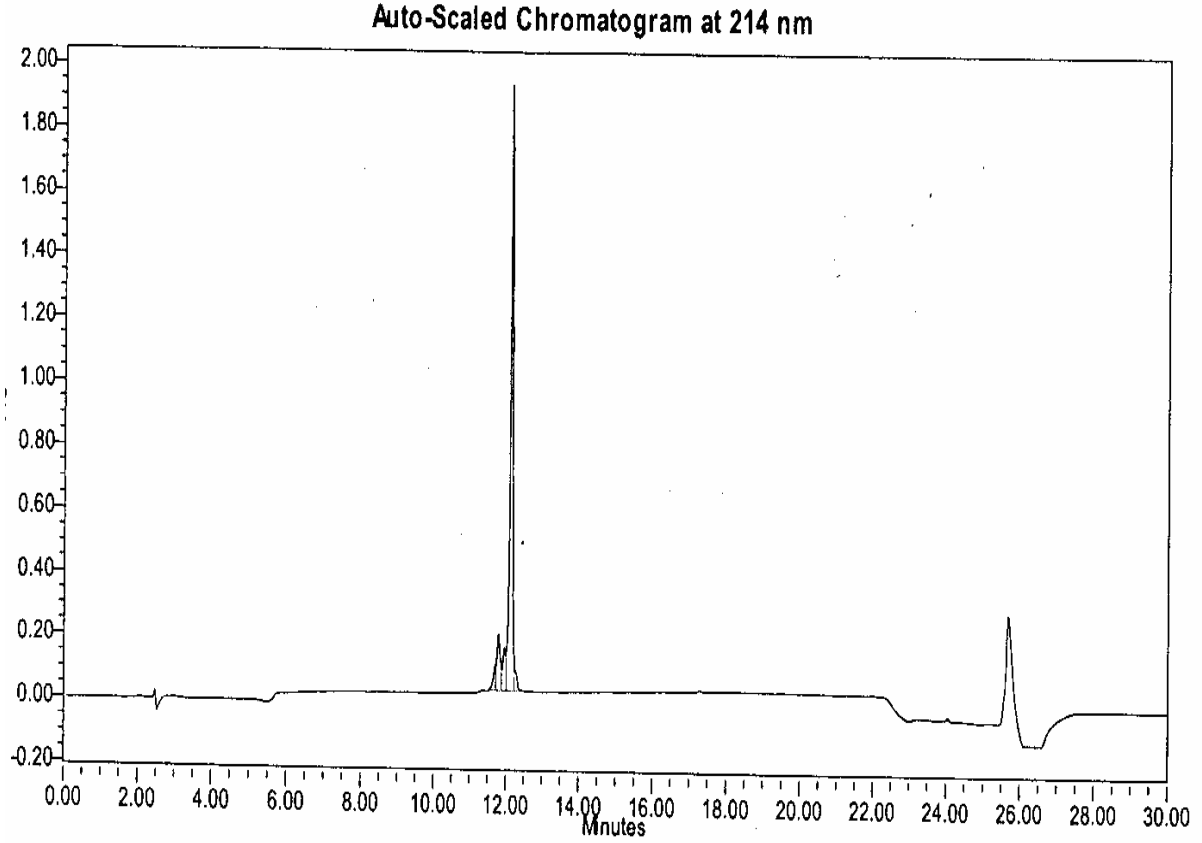
Viral partikül yada virion yaklaşık 8500 nükleotid uzunluğunda pozitif yüklü tek bir RNA zinciri içerir. Bu RNA molekülü küçük bir protein olan VPg'e kovalent olarak bağlanır. Virüs kapsülü zarfsızdır ve VP1, VP2, VP3 ve VP4 yapısal proteinlerinin 60 kopyasını içeren yaklaşık 300 Å çapında isohedral simetriye sahiptir.

Şap Hastalığı Virüsüne karşı sentetik aşı geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılan peptid dizileri Sigma Genosys firması tarafından Fmoc Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile % 91 saflıkta sentezlendi. A<sub>22</sub> serotip Şap hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin fonksiyonel antijen özelliği taşıyan 40-60 peptid dizileri –N terminal ucunda hem triptofan (trp) amino asidi eklenerek, hem de triptofan amino asidi eklenmeden sentezlendi. Peptid dizilerine eklenen triptofan amino asidi floresans verme özelliğine sahip olduğundan sentezlenen biyokonjugatların yapı ve karakterizasyonunun belirlenmesinde önemli bir rol oynadı.

:Sigma Genosys firması tarafından sentelenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 40 – 60 Peptid Dizisi:

Trp-Val-Lys-Ile-Asn-Asn-Thr-Ser- Pro-The- His-Val-Ile-Asp-Leu-Met-Gln-Thr-His-Gln-His-Gly

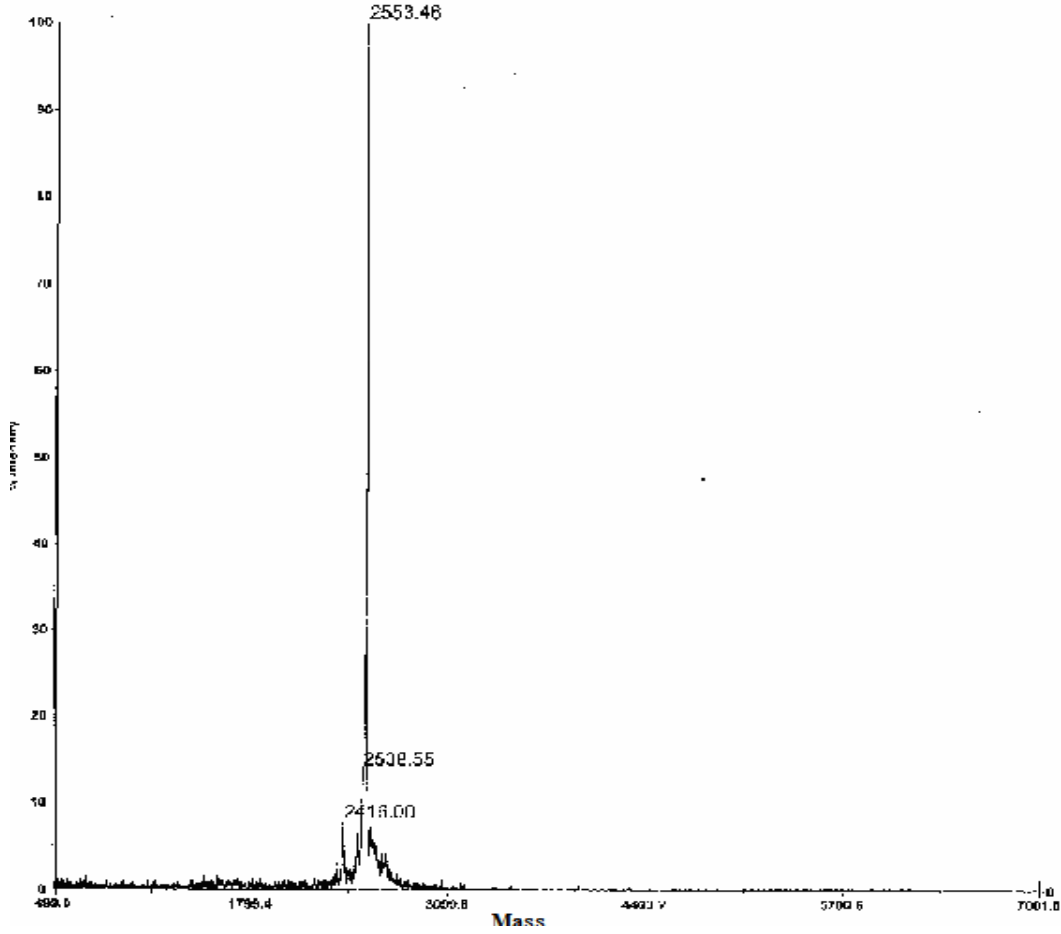
Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M PBS, %0.05 NaN<sub>3</sub> pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen serbest Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid proteinin 40-60 peptid dizisine (Trp-Val-Lys-Ile-Asn-Asn-Thr-Ser- Pro-The- His-Val-Ile-Asp-Leu-Met-Gln-Thr-His-Gln-His-Gly) ait HPLC, MS, Viskotek ve Floresans cihazlarına ait analiz sonuçları



**Integration Results**

	RT	Area	Height	% Area	% Height
1	11.720	382941	80902	3.09	3.39
2	11.783	1113089	176308	9.00	7.39
3	11.946	859285	133925	6.94	5.62
4	12.120	9666477	1903829	78.12	79.84
5	12.227	352616	89615	2.85	3.76

Şekil 4.2 Sigma Genosys firması tarafından sentelenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisinin 1mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı.



Şekil 4.3 Sigma Genosys firması tarafından sentelenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisinin 1 mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı

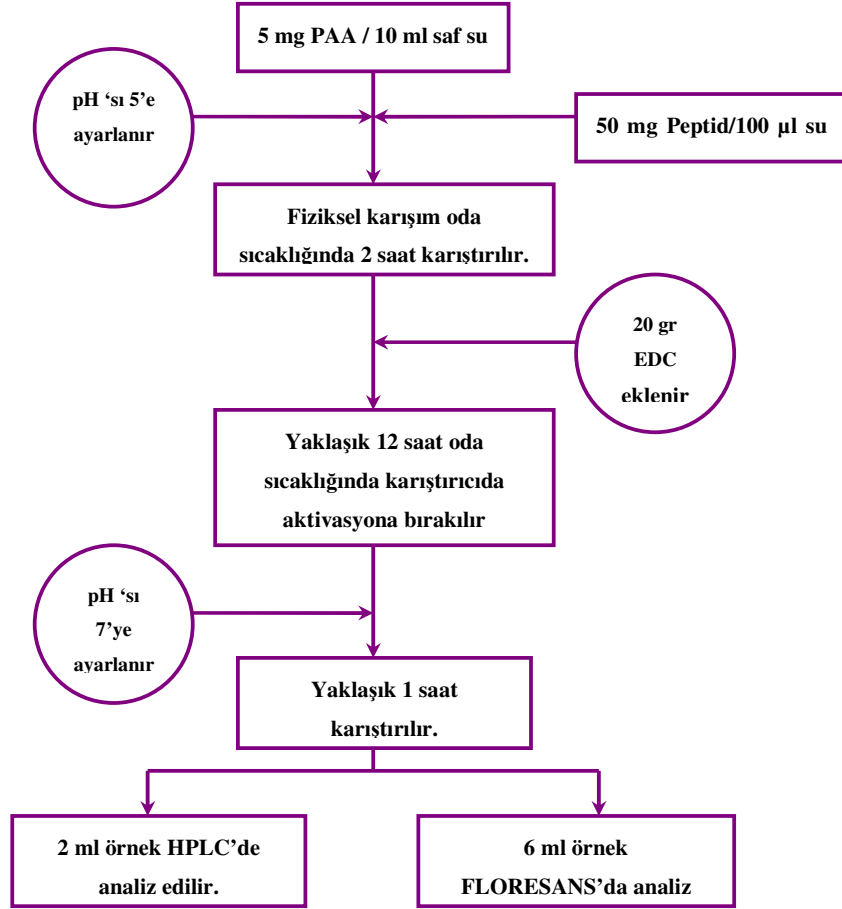
#### 4.4 PAA-Peptid Konjugasyon Reaksiyonu

PAA-peptid biyokonjugatının hazırlanmasında, Karbodiimid kullanılarak polimer aktifleştirilir ve daha sonra peptidle birleşmesi gerçekleştirilir.

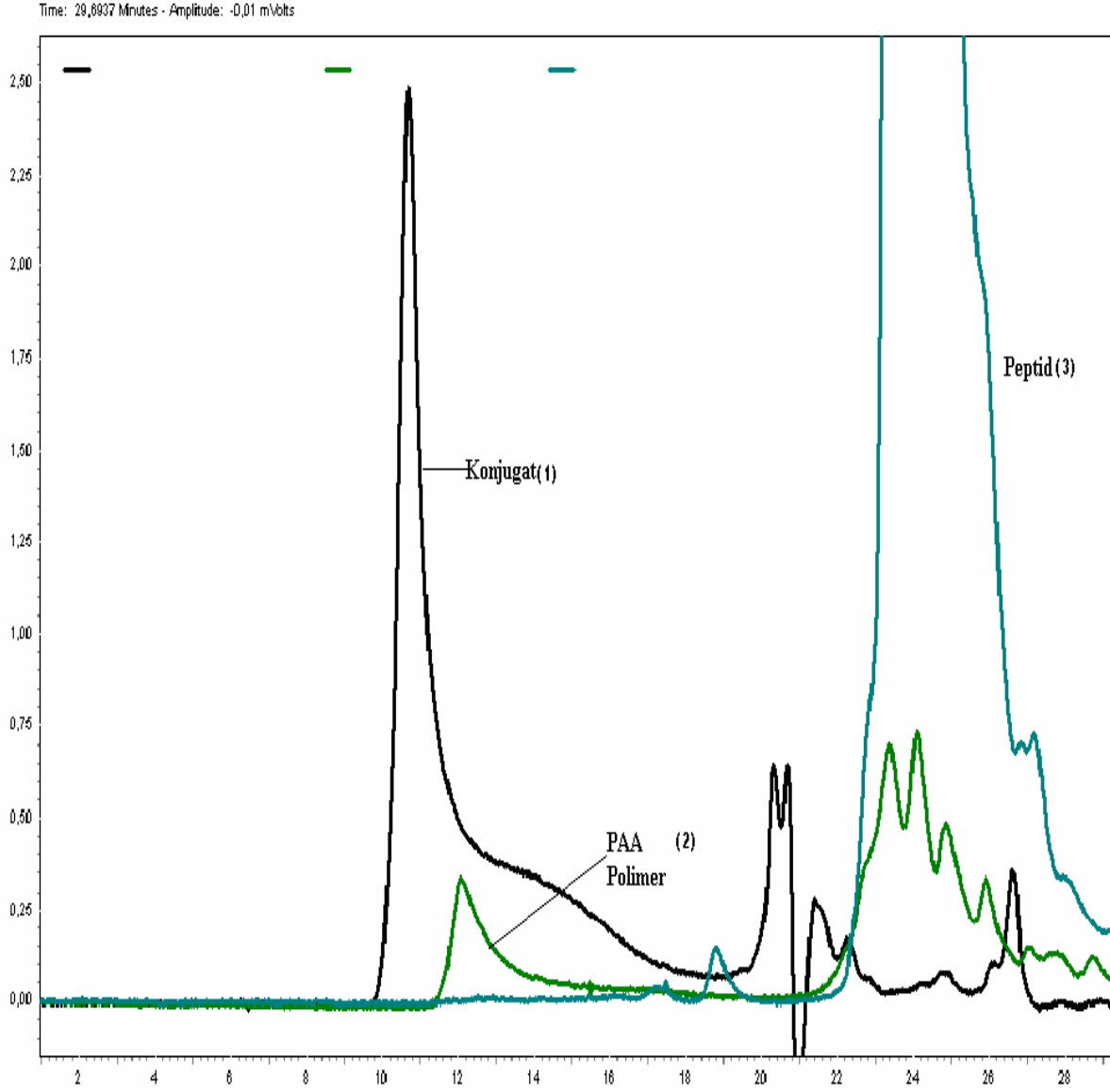
5 mg Poliakrilik asid (PAA Mw=100000) 9,875 ml saf suda çözüldü ve sodyum hidroksid(NaOH) ile Ph'sı 5'e ayarlandı. 50 mg peptid 100 µl suda çözüldü ve polimer çözeltisine eklenir. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra 10 gr suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı fiziksel karışıma ilave edilerek yaklaşık 12 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Daha sonra çözeltinin



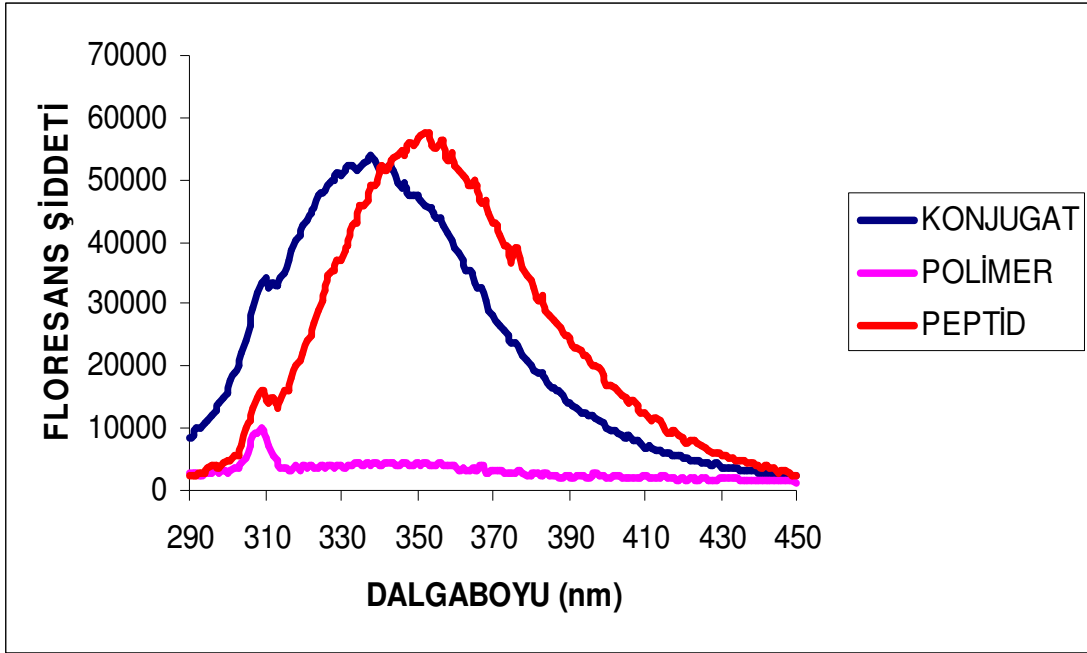
pH'sı kontrol edilerek, Ph 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat Ph=7'de karıştırıldı. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 4.4 PAA- Peptid konjugatının kongugasyon akış şeması



Şekil 4.5 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizili peptidi ile PAA'nın Karbodiimid yöntemi ile sentezlenen konjugatının(1), Polimerin(2), Peptidin(3) kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.6 0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranında sentelenen Polimer-Peptid konjugatlarının floresans spektrumu

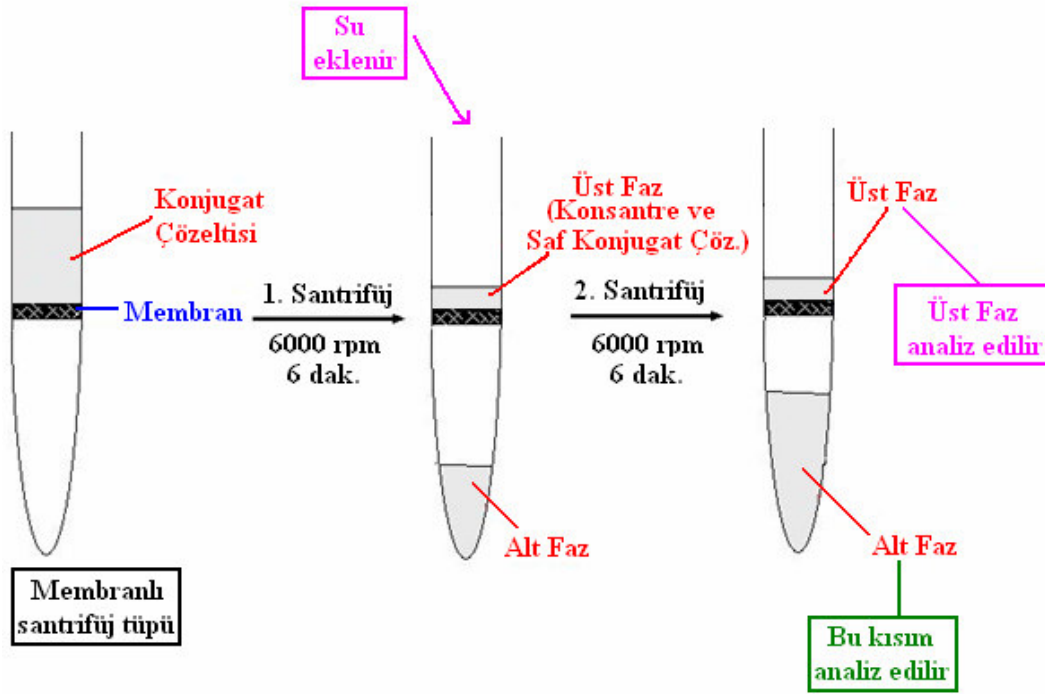
#### 4.5 Konjugatların Saflaştırılması

Konjugasyon işleminden sonra elde edilen Polimer-Peptid ve Peptid-Protein konjugatları üre türevi ya da reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından çeşitli yöntemler kullanılarak ayrılır ve saflaştırılabilir. Bu yöntemlerin içerisinde en yaygın olarak kullanılanları; Moleküler Eleme Kromatografisi (Kolon) uygulanması, Gaz basınçlı filtrasyon ya da Santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri ile) uygulamalarıdır.

Konjugatlar sentezlendikten ve çöktürüldükten sonra, cihazlarda analiz edilmeden önce reaksiyona girmemiş maddelerden veya reaksiyonda oluşabilecek yan ürünlerden ayrılması yani saflaştırılması amacıyla, fosfat pH=7 (PBS) tamponunda çözüldü ve Toyopearl kolon dolgu maddesi olan kolonda saflaştırıldı. Elde edilen fraksiyonların UV spektrofotometrede 280 nm’de spektrumu alındı. Spektrumdaki uygun fraksiyonlar toplandı ve 10.000 Mw ayırma gücüne sahip polietersülfon (PES) membranlı tüpte +4 C ‘de 6000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz birleştirildikten sonra, tuzdan arındırma işlemi uygulandı ve liyafil kurutuldu. Bu fraksiyonlar daha sonra, PBS pH 7’ tamponunda çözümlenerek, Spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

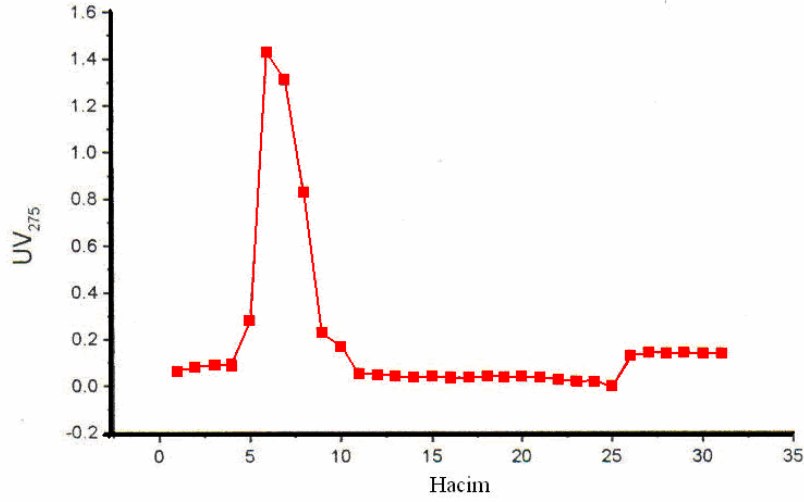
#### 4.5.1 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip mebranları içeren santrifüj tüpleri konjugatların istenmeyen küçük moleküllerden ayrılmasında kullanılmaktadır. Bunun için ayrılacak çözelti membranlı tüpe konular ve tüpün değişen devir ve sürede santrifüjlenmesi sonucu membranın gözeneklerinden daha küçük moleküllerin geçerek alt fazda toplanması ile büyük moleküller (konjugat) üst fazda kalırlar. Böylelikle konjugat hem saflaştırmış hem de konsantre edilmiş olur [16].

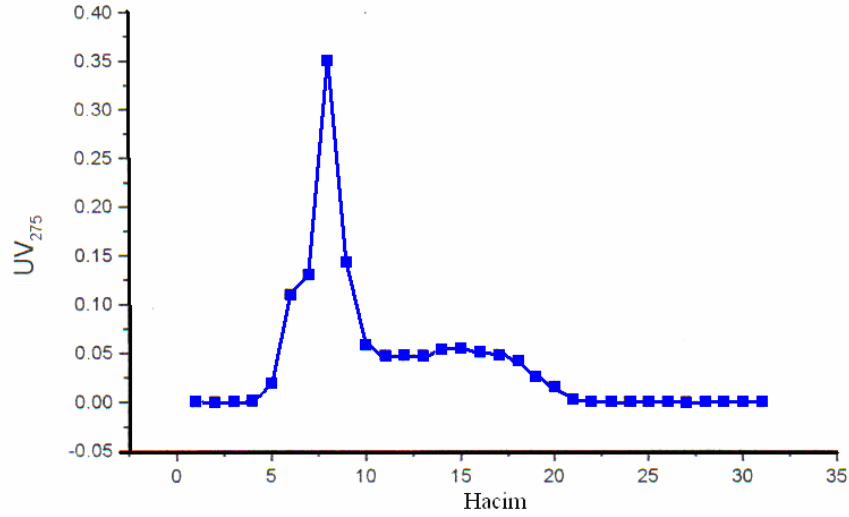


Şekil 4.7 Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi

#### 4.5.2 Peptid-Polimer Konjugatının Saflaştırılma analiz sonuçları



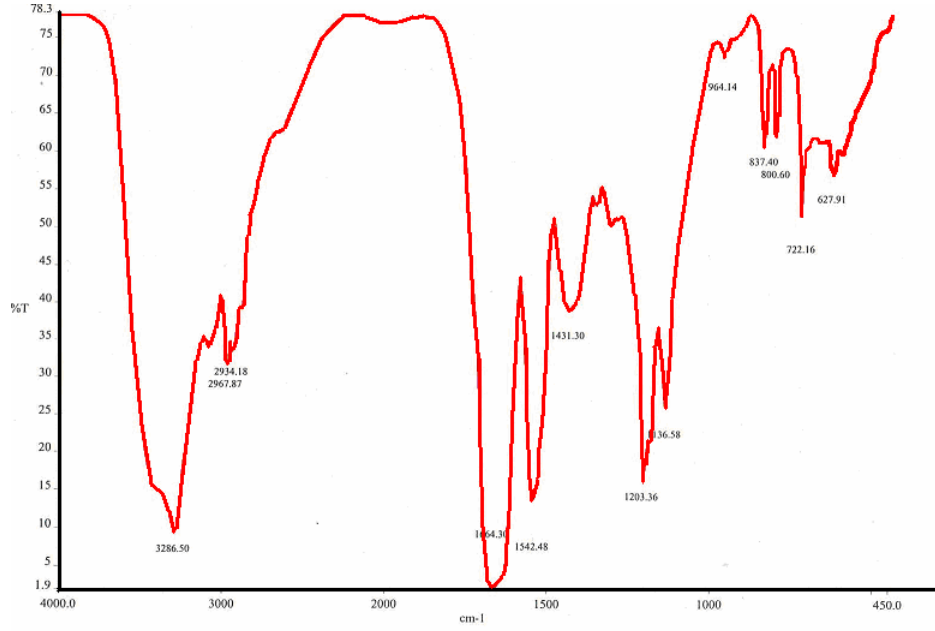
Şekil 4.8 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizili peptidin PAA ile konjugatının Toyopearl dolu maddesi olan Bio-Rad kolonundan saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometrede yapılan analizine ait spektrumu.



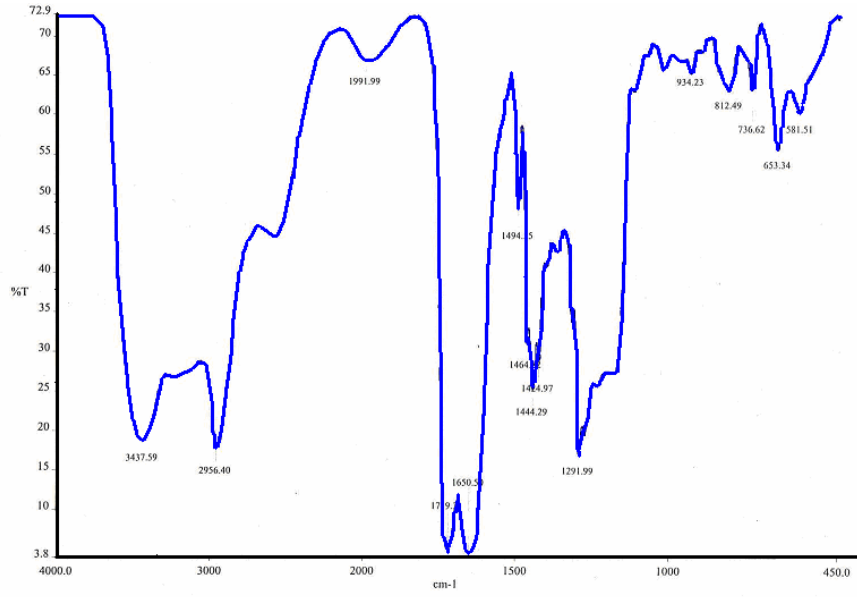
Şekil 4.9 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili peptidin PAA ile konjugatının Toyopearl dolu maddesi olan Bio-Rad kolonundan saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometrede yapılan analizine ait spektrumu

### 4.5.3 Peptid, Polimer, Peptid-Polimer Konjugatı Saflaştırma Öncesi ve Saflaştırma Sonrası FTIR Analiz Sonuçları

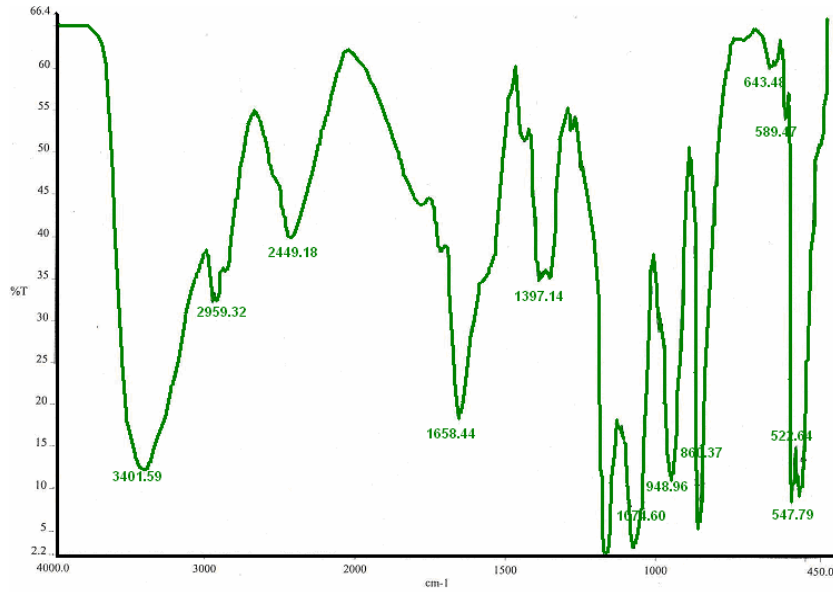
Örneklerin FTIR analizleri, Perkim Emler Spectrum One Universal ATR sampling Accessory FTIR Spektrometre kullanılarak yapılmıştır.



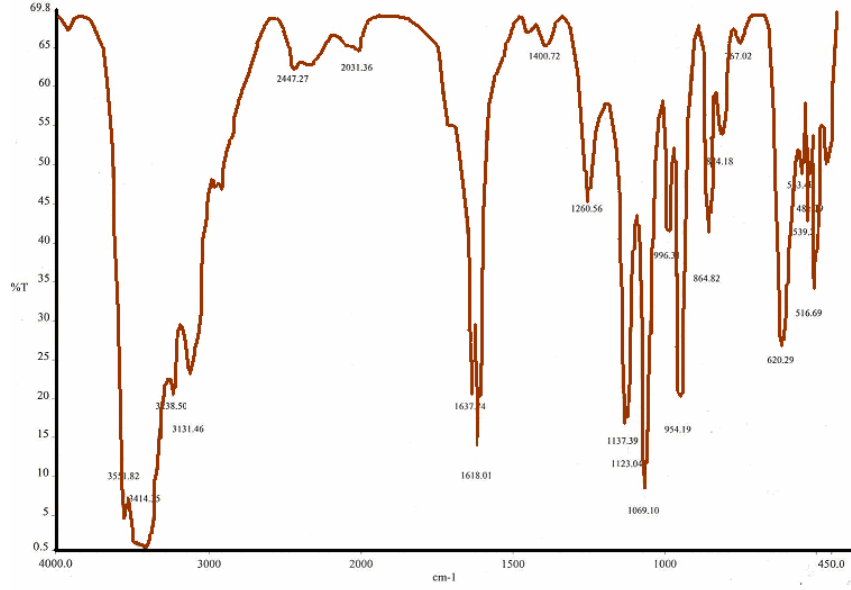
Şekil 4.10 Antijenik özellikli 40-60 peptid dizisine ait FTIR analizi.



Şekil 4.11 Polimer PAA' ya ait FTIR analizi.



Şekil 4.12 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan ayırma kolonu öncesi FTIR analizi.



Şekil 4.13 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan biorad kolonundan geçirildikten sonraki FTIR analizi.

Kolon öncesi ve kolon sonrası FTIR spektrum dalga boyları karşılaştırıldığında, konjugat aynı  $-CO-NH-$  bağı oluşturduğundan dolayı genellikle benzer karakter taşımaktadırlar. Saflaştırma öncesi ve sonrasındaki konjugatların FTIR spektrumları karşılaştırıldığında şekil 4.13 teki spektrumun daha belirgin bantlara sahip olduğu görülmektedir. 2449 cm ve 1397 cm bantlarının saflaştırmadan sonra büyük oranda azalması karbodiimid kalıntısının ve reaksiyonda istenmeyen ürün gibi oluşan üre türevlerinin kaybolduğu görülmektedir. 2900-3400 cm arasındaki geniş bant karbonil grubunun varlığını gösterir ve kongugat spektrumundaki bandın daralması karbonil gruplarının amid gruplarına dönüştüğünü göstermektedir. Bu da konjugasyon reaksiyonunun tamamlandığını göstermektedir.



Çizelge 4.1 FTIR değerlendirme tablosu.

=3400-3200 cm	Keskin N-H, geniş N-H bandı ve zayıf sekonder amin bandı Geniş –OH bandını gösterir
=2900 cm	Alifatik Grup (-CH <sub>2</sub> ; -CH <sub>3</sub> )
=2300 cm	Çift bağ gerilme titreşimleri gözlenir. (COOH gibi)
=1500-1700 cm	C=O gerilme, =1600 cm de –NH <sub>2</sub> eğilme, =1540 – NH eğilme gözlenir.
=1400-1450 cm	C-N- gerilme bandı
=1263-1140 cm	Ar-O, - C-O, -CH-O, -CH <sub>2</sub> -O pek güvenilir değildir eğilme veya gerilmeden gerçekleşir.
=960 cm	Aromatik H(zayıf band), C-H gerilim(kuvvetli band)
=860 cm	-C=CH <sub>2</sub> metilen grubu, diğer bandlarla etkileşimli bölgedir.

#### 4.6 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidratorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında BSA –Poliakrilik Asid Konjugat Sentezi

##### 4.6.1 Kullanılan Çözeltiler

###### ➤ 0.01 mol/L'lik Fosfat Tamponu (PBS) Tamponu (pH=7)

1.1998g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Mw=119.98 g/mol) tartılarak 500ml saf suda çözülür. Aynı zamanda 2.6807g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Mw=268.07 g/mol) tartılarak yine 500ml saf suda çözülür. Bu iki

çözeltiden  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinin üzerine eklenir ve karışıma 8.766 g NaCl ilave edilerek, tekrar karıştırılır. Çözeltinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7'ye ayarlanır.

#### 4.6.1.1 Hesaplamalar

PAA polimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin peptid dizilerini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

$$n_{\text{pep}}/n_{\text{pol}} = \frac{C_{\text{pep}} \times N_A}{M_w(\text{peptid})} \times \frac{M_w(\text{polimer})}{C_{\text{pol}} \times N_A}$$

$N_A$  = Avagadro sayısı

$C_{\text{PAA}}$  = Poliakrilik Asid konsantrasyonu

$C_{\text{BSA}}$  = BSA konsantrasyonu

$M_w$  = Molekül ağırlığı

BSA proteini  $\Rightarrow M_{\text{BSA}} = 66\,000$  Da

40-60 için  $\Rightarrow M_{\text{pep}} = 2553$

$$\frac{n_{\text{BSA}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{C_{\text{BSA}} \cdot M_{\text{PAA}}}{C_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{BSA}}}$$

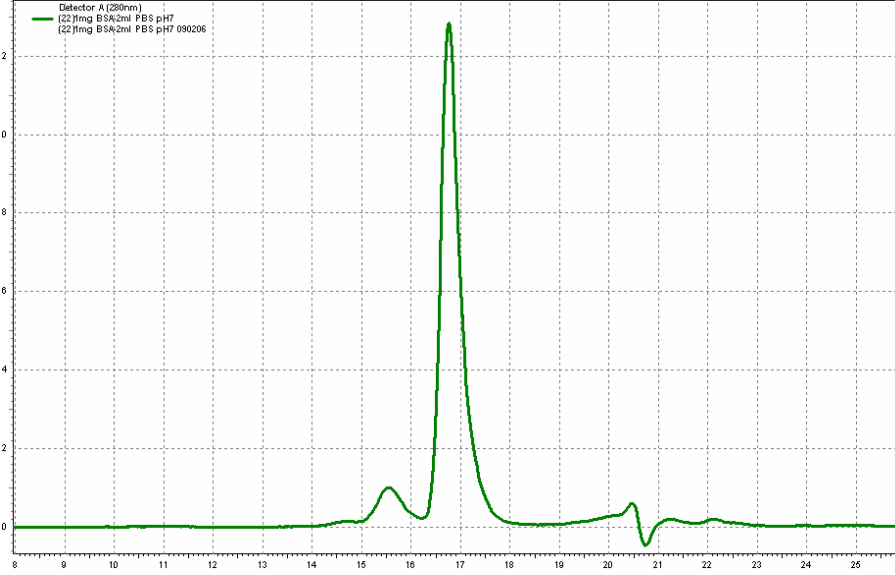
$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 4,5$  olan 10 ml PAA – BSA Konjugat Çözeltisi

$c_{\text{PAA}} = 0.1$  g/100ml = 1 mg/ml = 10 mg/10 ml

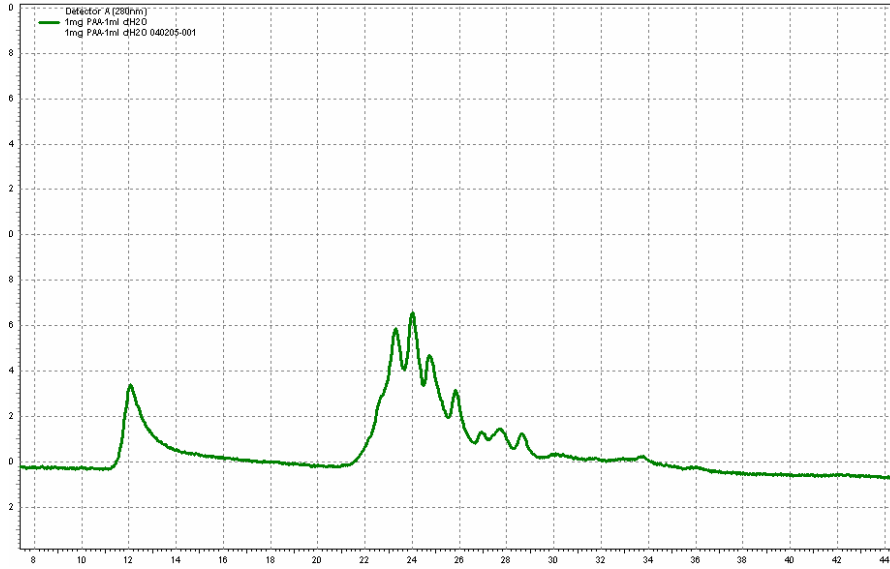
$c_{\text{BSA}} = 0.3$  g/100ml = 3 mg/ml = 30 mg/10 ml

**$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 4,5$  oranına ait konjugatın hazırlanması:** 10 mg PAA 5 ml saf su içerisinde çözüldü. 0.1 N NaOH ile pH 5'e ayarlandı. PAA kopolimerinin karboksil gurupları 80 mg EDC eklenerek aktive edildi ve 1 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra pH değeri 0.1 N NaOH ile 7'ye çekildi. 30 mg BSA proteini ( $M_w=66000$ ) 5 ml PBS içerisinde çözüldü ve manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışan polimer çözeltisi üzerine BSA protein çözeltisine eklendi ve gece boyunca +4 °C'de karıştırılmaya devam edildi. İşlem sonunda konjugatın pH'sı 7'ye ayarlandı. Sentezlenen biyokonjugatın yapı ve karakterizasyonu HPLC kromatografik sistemleri ve florimetrik yöntemlerle incelendi.

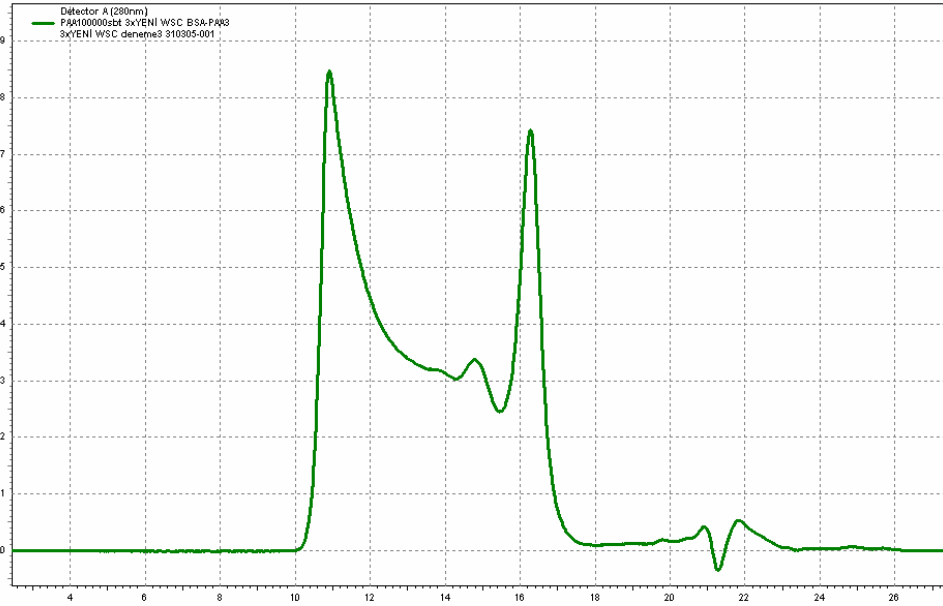
#### 4.6.2 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrklörür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında Sentelenen BSA–Poliakrilik Asid Konjugatının Analiz Sonuçları



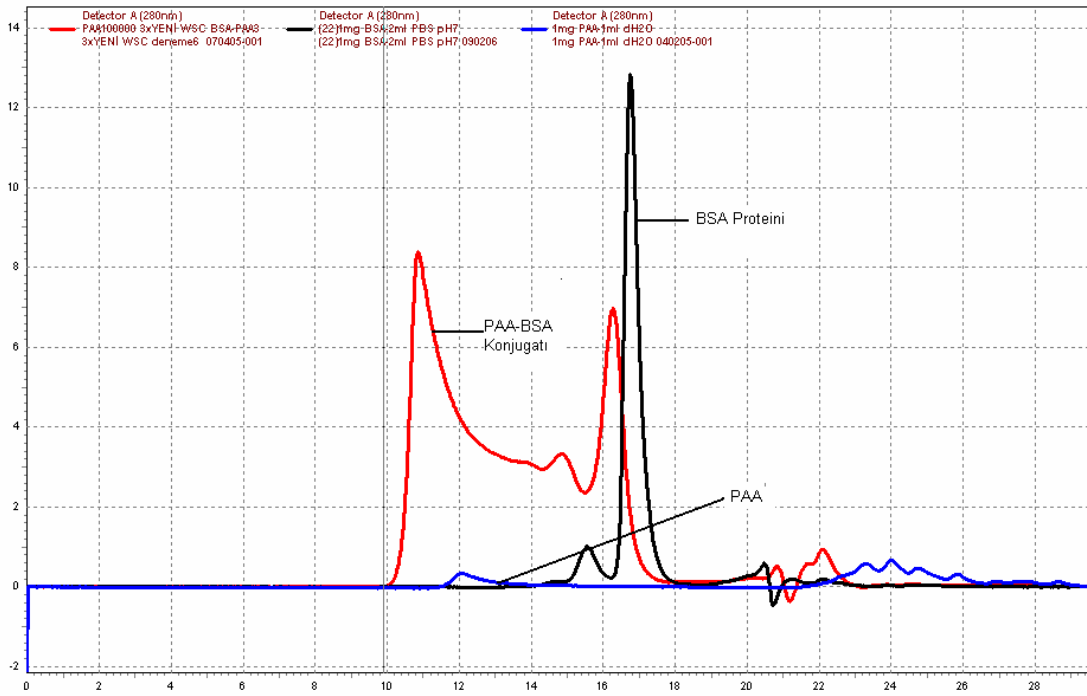
Şekil 4.14 0.01 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{BSA}/n_{PAA}=4,5$  oranında serbest BSA nın HPLC spektrumu



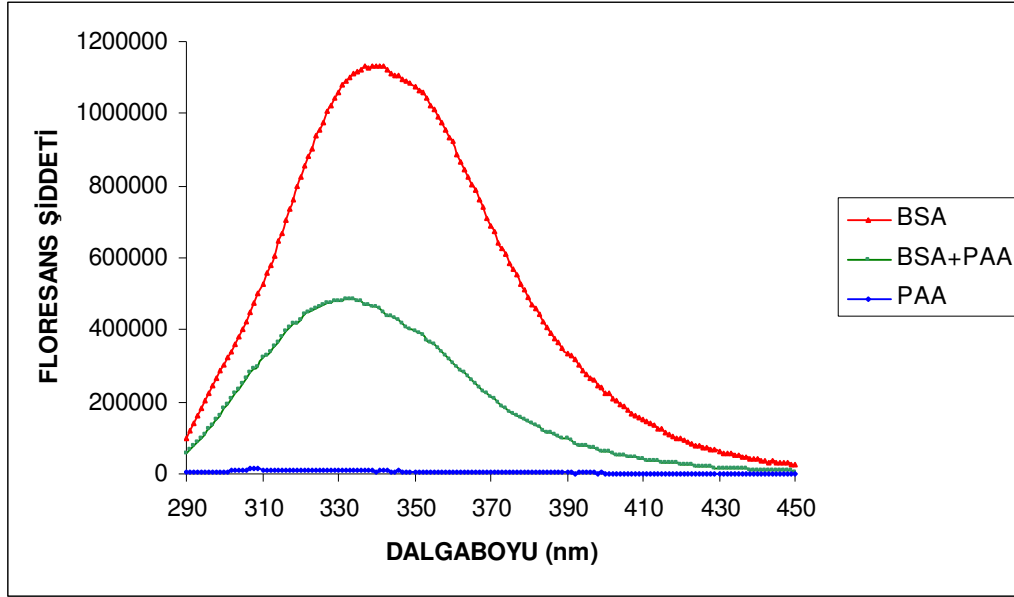
Şekil 4.15 0.01 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{BSA}/n_{PAA}=4,5$  oranında serbest PAA nın HPLC spektrumu



Şekil 4.16 0.0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{BSA}/n_{PAA} = 4,5$  oranında sentezlenen PAA-BSA konjugatının HPLC spektrumu



Şekil 4.17 0.0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{BSA}/n_{PAA} = 4,5$  oranında sentezlenen PAA-BSA konjugatının HPLC spektrumlarının karşılaştırılması



Şekil 4.18 0.0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{BSA}/n_{PAA}=4.5$  oranında sentezlenen PAA-BSA konjugatının floresans Spektrumu

Fluoresans Spektrumunda görüldüğü üzere Serbest BSA için  $\lambda_{max}$  değeri 339 nm. Olarak saptanmıştır. PAA ise tek başına floresans göstermemekte bunun yanında BSA ile karbodiimid yöntemi kullanılarak PAA-BSA konjugatı oluşturulduğunda ise  $\lambda_{max}$  değerinin 331 nm’ye kaydığı yani blue shift verdiği gösterilmiştir. Bu kayma bize BSA’nın PAA ile kompleks oluşturduğunu ve BSA içerisindeki Trp aminoasidinin sulu ortamdan PAA molekülünün sarması sonucu uzaklaştırıldığını göstermektedir.

#### 4.6.3 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrklörür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında BSA ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenini içeren Biyokonjugat Sentezi

A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 yapısal kapsid proteininin 40-60 peptid dizisi PAA ile kovalent konjugasyonu suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrklörür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında gerçekleştirildi.

40-60 için  $\Rightarrow M_{\text{pep}} = 2553$

$$\frac{n_{\text{peptid}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{peptid}} \cdot M_{\text{BSA}}}{c_{\text{BSA}} \cdot M_{\text{peptid}}} =$$

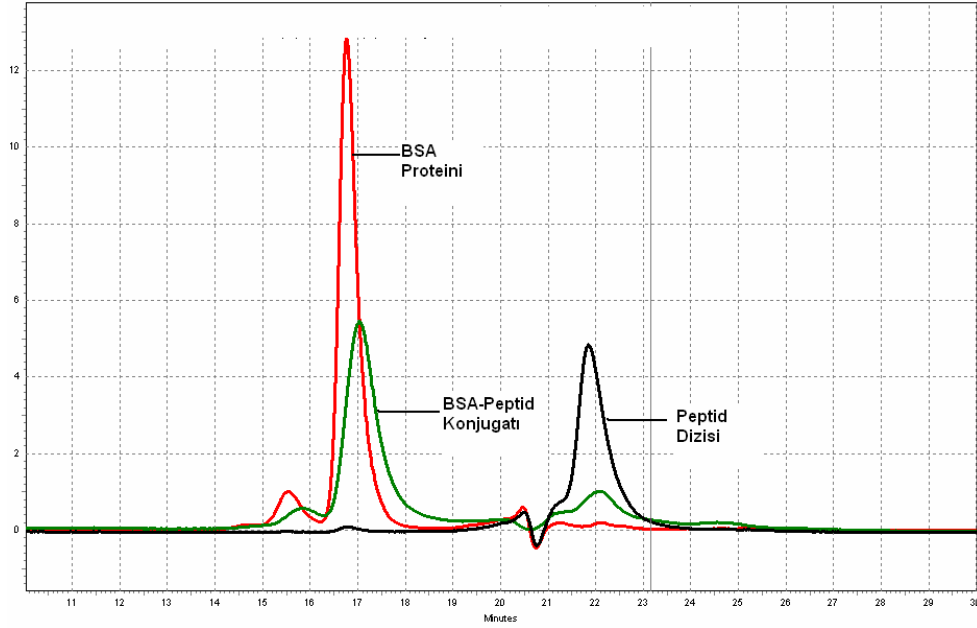
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 5$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltilisi

$c_{\text{Peptid}} = 0.03 \text{ g}/100\text{ml} = 0.3 \text{ mg}/\text{ml} = 1 \text{ mg}/3 \text{ ml}$

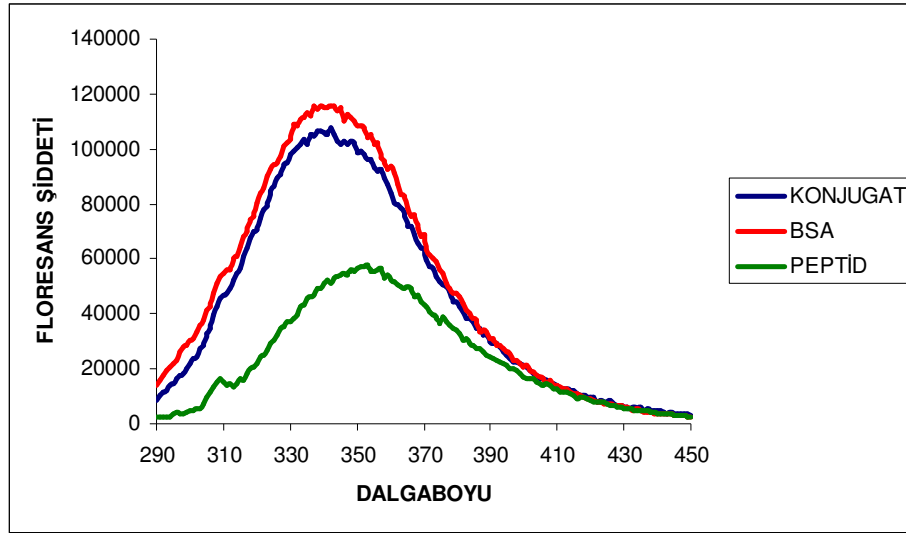
#### **4.6.3.1 BSA proteini – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin 40-60 Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatın Hazırlanması**

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranına ait konjugatın hazırlanması: 5 mg BSA proteini 1.5 ml saf su içerisinde çözüldü. 0.1 N NaOH ile pH 5'e ayarlandı. BSA proteinin karboksil gurupları 12 mg EDC eklenerek aktive edildi ve 1 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra pH değeri 0.1 N NaOH ile 7'ye çekildi. 1 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 peptid dizisi ( $M_w=2553$ ) 125  $\mu\text{L}$  DMF(Dimetil Formamid) içerisinde çözüldükten sonra üzerine 1375  $\mu\text{L}$  0.1 M PBS (pH 7) eklendi ve 30 dakika +4 °C'de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışan BSA protein çözeltisi üzerine peptid çözeltisi eklendi ve gece boyunca +4 °C'de karıştırılmaya devam edildi. İşlem sonunda konjugatın pH'sı 7'ye ayarlandı. Sentezlenen biyokonjugatın yapı ve karakterizasyonu HPLC, ve florimetrik yöntemlerle incelendi.

#### 4.6.3.2 BSA proteini – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin 40-60 Peptid Dizisini İçeren Konjugata HPLC ve Floresans Analiz Sonuçları



Şekil 4.19 0.0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranında sentezlenen BSA-Peptid konjugatının HPLC Spektrumu.



Şekil 4.20 0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranında sentezlenen BSA-Peptid konjugatının floresans Spektrumu.

Şekil 4.20 deki floresans spektrumunda görüldüğü üzere Serbest BSA için  $\lambda_{\max}$  değeri 339 nm. Olarak saptanmıştır. Şap hastalığı virüsüne ait 40-60 sentetik peptid dizisi ise 352 nm'de  $\lambda_{\max}$  göstermektedir. Karbodiimid yöntemi uygulanarak Peptid-BSA konjugatı sentezlendiğinde ise konjugata ait  $\lambda_{\max}$  değerinin 342 nm'ye kaydığı yani peptide göre blue shift verdiği gösterilmiştir. Bu kayma bize BSA-peptid konjugatı oluşturduğunu peptiddeki ve BSA molekülündeki Trp aminoasidlerinin konjugasyon ile birlikte sulu ortamdan uzaklaştığını göstermekte ve molekülün yapısı hakkında ayrıntılı bilgi vermektedir.

Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) aktivatörü varlığında  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  ve  $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 4,5$  oranlarında sentezlenen konjugatlar sentezlendi. Sentezlenen konjugatlar dolgu maddesi toyoparl olan kolondan geçirildi. 10.000 Mw ayırma gücüne sahip polietersülfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 °C'de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Biyokonjugatlar liyofilizatör aletinde -80 °C'de kurutuldu.

#### **4.7 BSA ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 40-60 Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatların Balb/c farelere enjekte edilmesi**

*Biyomühendislik Bölümünde Araş.Gör.Dr. Banu Mansuroğlu tarafından deneysel hayvan çalışmaları yapılmıştır.*

Çalışmamızda TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deneysel Hayvanları laboratuvarında temin edilen 10 adet 8 haftalık ortalama 31 gr ağırlığında erkek Balb/c soyu fare kullanıldı.

Enjeksiyon işlemi, eter anestezisi altında kuyruk veninde 0.2 mL örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.





Şekil 4.21 Kuyruk veninden madde enjeksiyonu

#### 4.8 Fare Serumlarının alınması

Eter anestezisi altında kuyruk ucu kesilerek 7 günde bir 8 hafta boyunca kan alındı. 20  $\mu$ L sodyum sitrat içeren eppendorflara alınan kan örnekleri 2500 rpm devirde 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrasında üst fazdan 20  $\mu$ L serum dikkatlice alınarak 0.5 M 500 mL PBS (pH 7.2) içeren tüplere konuldu ve vorteksle karıştırıldı. Örnekler antikor miktar tayin işlemi yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

#### 4.9 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde BSA-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 40-60 Peptid Dizisi içeren Biyokonjugatlara karşı oluşan Antikor Miktar Tayini

Bu test; enjekte edilen biyokonjugatlara karşı oluşan konjugata-spesifik antikor miktarını tayini etmek amacıyla kullanıldı (Dilgimen vd., 2001; Yücel vd., 2001, 1999; Başalp vd., 2000, 1996; Mustafev vd., 1998, 1996b; Engvall vd., 1980; Sauer vd., 1986). Antikorlar ELISA plaka kuyucuklarına kaplanmış antijenlerle tanımlandı. Özgün antikorları ihtiva eden serum çözeltisi ile antijen kaplı kuyucuklar inkübe edildi ve fare serum çözeltisindeki antikorlara (türe özgü) karşı geliştirilmiş (anti-fare) ve alkalen fosfataz ile konjuge polyvalent antikorlara bağlandı. Ortama substrat ilave edilmesi ve substratın enzim tarafından hidroliz edilmesi sonucu oluşan ürün miktarı spektroskopik olarak belirlendi.

#### 4.9.1 Kullanılan Çözeltiler

##### ○ Sodyum Sitrat Çözeltisi

0.22 g D-(+) Glukoz ( $C_6H_{12}O_6$ ;  $M_w=180.16$  g/mol) tartılarak 3 mL saf suda çözündü. 0.32 g  $Na_3O_4 \cdot 12H_2O$  ( $M_w=380.12$ g/mol) tartılarak 3 mL saf suda çözündü. 0.1 g sodyum sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5 H_2O$ ;  $M_w=357,16$  g/mol) 3 mL saf suda çözünür. Bu üç çözelti birbine eklenir ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.

##### ○ 0.5 M PBS Tamponu (pH=7,2)

87 g potasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ;  $M_w=174$  g/mol) tartılarak 500 mL saf suda çözünür. 68 g potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ;  $M_w=136$  g/mol) tartılarak çözünür.  $K_2HPO_4$  baz çözeltisi üzerine  $KH_2PO_4$  asid çözeltisi eklenerek pH 7,2' ye ayarlanır.

##### ○ Yıkama Tamponu

0.5 M 20 mL PBS (pH 7,2) den alınır üzerine 980 mL saf su eklenir. 8,4 g sodyum klorür ( $NaCl$ ) tartılarak bu karışıma eklenir, karıştırılır ve 1 L 'ye saf su ile tamamlanır. 0.45  $\mu$ L filtreden geçilerek süzülür. 0.5 mL Tween 20 ( $C_{58}H_{114}O_{26}$ ;  $M_w=1227,72$  g/mol) eklenir.

##### ○ Substrat Tamponu

0.02 g glisin ( $C_2H_5NO_2$ ;  $M_w=75,07$  g/mol) 50 mL saf su içerisinde çözündükten sonra pH 10.4' e ayarlanır. Daha sonra 0.02 g çinko klorür ( $ZnCl_2$ ;  $M_w= 136,29$  g/mol) tartılarak 50 mL saf su içerisinde çözünür. 0.04 g magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ;  $M_w=95,3$  g/mol) tartılarak 50 mL saf su içerisinde çözünür. Bu üç çözelti karıştırılır ve saf su kullanılarak çözelti hacmi 200 mL olacak şekilde hacim tamamlanır.

##### ○ %0.2 Süt Tozu Çözeltisi

60 mg süt tozu tartılarak 30 mL 0.5 M PBS (pH 7.2) tamponu içerisinde çözünür.

##### ○ Polivalent İmmüoglobulin, Alkalın fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu





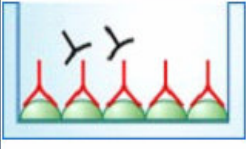
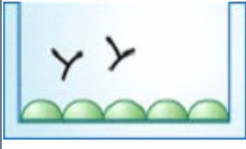
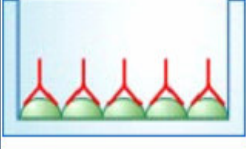
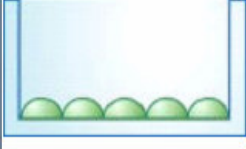
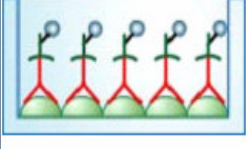
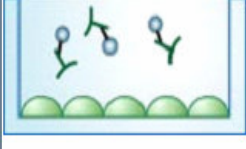
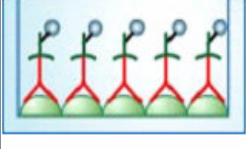

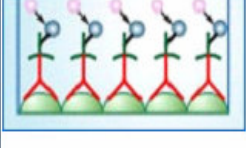



0.5 M 750  $\mu$ L PBS (pH 7) çözeltisi üzerine 1  $\mu$ L Polivalent İmmüoglobulin, Alkalın fosfataz eklenir ve vortekle karıştırılır.

##### ○ 4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

4-nitrofenil fosfattan ( $C_6H_6NO_6P \cdot 2C_4H_{11}NO_3$ ;  $M_w 461.4$  g/mol) 2,5 mg alınıp 25 mL substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

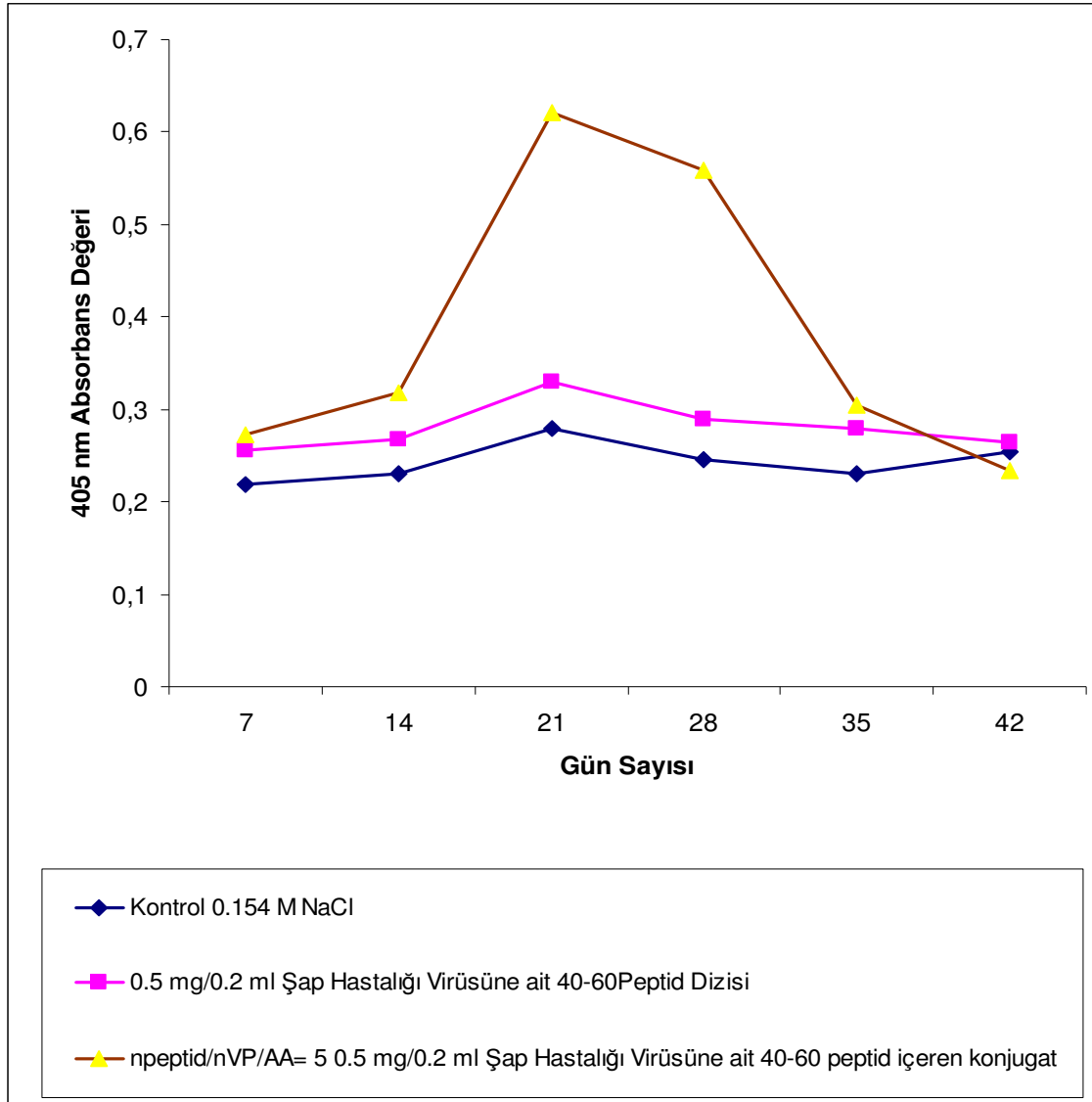
#### 4.9.2 ELISA Deneyinin Yapılışı

- 96 kuyu içeren ELISA plağı (Greiner) 0.5 µg antijen ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=5$  oranında sentezlenen 0.5 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizisine ait peptid dizisi içeren BSA-Peptid biyokonjugatı) 100 µL kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELISA plakaları gece boyu +4 °C'de bekletildi.
- Kuyular 0.05 Tween20 ihtiva eden 0.5 M PBS pH 7 yıkama tamponu ile 2 defa yıkandı.
- ELISA plaklarındaki her bir kuyuya 12 yollu otomatik pipet yardımıyla % 0.2'lik 200 µL süt tozu çözeltisi eklendi.
- ELISA plakası 37 °C sıcaklığında etüvde 1 saat bekledi ve sonrasında 0.05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Farelerden alınan serumlar 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapıldı. Her bir kuyuya 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapılan serum örnekleri 100 µL olarak eklendi. ELISA plakası +4 °C'de 2 saat bekledi.
- ELISA plakası 0.05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Antimouse Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz 1:750 oranında sulandırılarak 100 µL her bir kuyuya eklendi. ELISA plakası 1 saat 37 °C'de etüvde bekletildi.
- ELISA plakası 0.05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- % 0.1 Paranitrofenil fostat (PNFP) substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dakika bekletildikten sonra ELISA plak okuyucu aletinde  $A_{405}$  nm dalga boyunda okundu.

	Serum Pozitif	Serum Negatif
		
Kuyucuklar antijenle kaplıdır.		
Örnek eklenir ve inkübasyon gerçekleştirilir.		
Yıkama ile bağlanmayanlar uzaklaştırılır.		
Enzim bağlı ikinci antikorlar ilave edilirler.		
Yıkama ile bağlanmayanlar uzaklaştırılır.		
Substrat eklenir ve enzimatik reaksiyon gerçekleşir.		
Antikor bulunan örnekte renk geçişimi gözlenir.		

Şekil 4.22 Indirek ELISA'nın şematik gösterimi

**4.10 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde PAA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 40-60 Sentetik Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayin Sonuçları**



Şekil 4.23 0.5mg/0.2 ml Şap Hastalığı Virüsünün 40-60 dizisini içeren biyokonjugatlar ile immünize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) PAA-Peptid'e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği.

## 5 TARTIŞMA ve SONUÇ

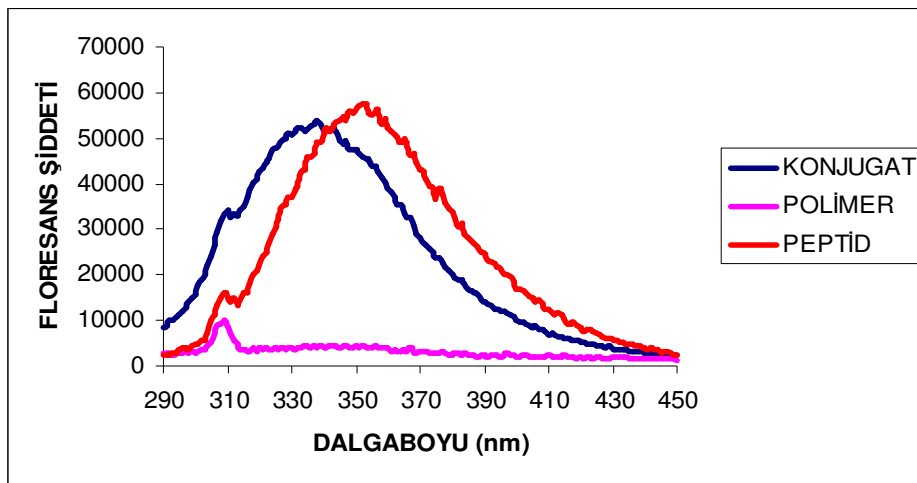
### 5.1 Biyokonjugatlar ve Yapı Analizleri; Elisa Test Sonuçları

Yüksek immünojenliğe sahip peptid konjugatlarını elde etmek için yeni bir yaklaşım olarak; antijenik peptid molekülünün konjugasyonunda taşıyıcı olarak kendiliğinden adjuvant etkisine sahip olan sentetik polianyon kullanılmıştır(PAA). Peptidin biyopolimerle oluşturduğu biyokonjugat karbodiimid aktivatörü kullanılarak sentezlenmiştir.

Tez çalışmamızda, Şap Hastalığı Virüsü VP1 kapsid proteininin antijenik özellikli 40-60 dizili peptidinin poliakrilik asid (PAA) ile karbodiimid varlığında konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sentezlenmiş olan konjugatın yapısı incelenmiştir. Konjugat Toyopearl dolgu maddesi içeren. Biyo-Rad kolonundan geçirilerek saflaştırılmış; yapı-işlev analizleri kromatografik (HPLC), ultraviole (UV) ve flourimetrik analizlerle fiziko-kimyasal özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca PAA-BSA, BSA-Peptid konjugatları da sentezlenmiş ve oluşan konjugatların yapı-işlev analizleri incelenmiştir. Polimer-Peptid konjugatlarına karşı fare serumlarında spesifik olarak oluşan antikor miktarı ELISA yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

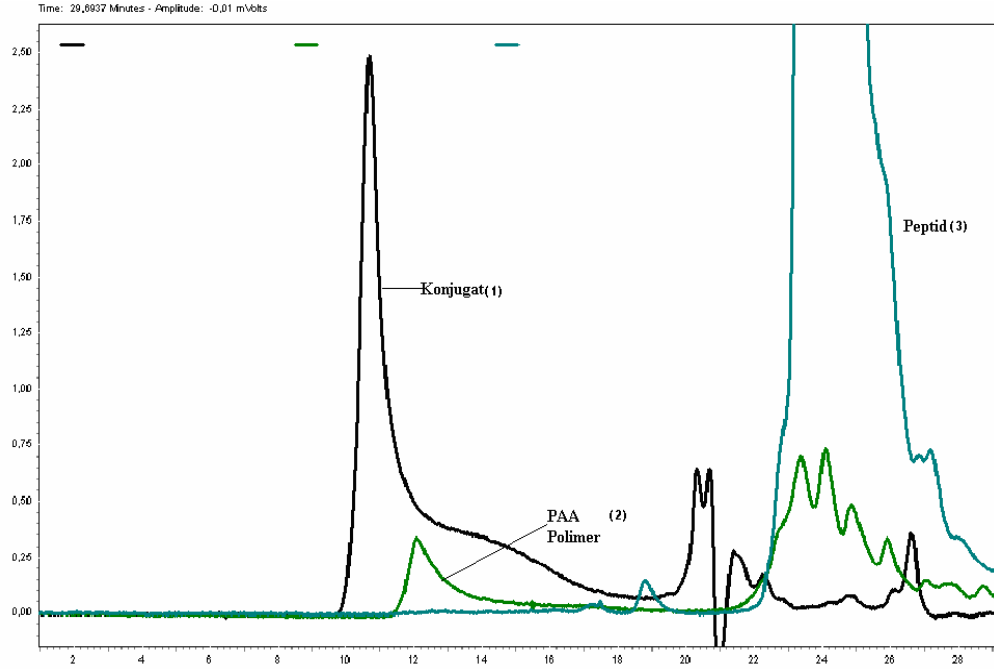
Sentezlenen Peptid-Polimer , BSA-Polimer ve Peptid-BSA biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyonu HPLC, FTIR , spektroskopik ve flourimetrik (Floresans Spektrofotometre cihazı) yöntemlerle incelenmiştir.

Çalışmamızda Genel olarak bütün konjugasyon reaksiyonlarında, polimer molekülünü aktive etmek için karbodiimidlerden yararlanılmıştır. Sentezlenen Polimer-peptid konjugatı, şekil 5.1 de floresans deneylerinden de görülmektedir.



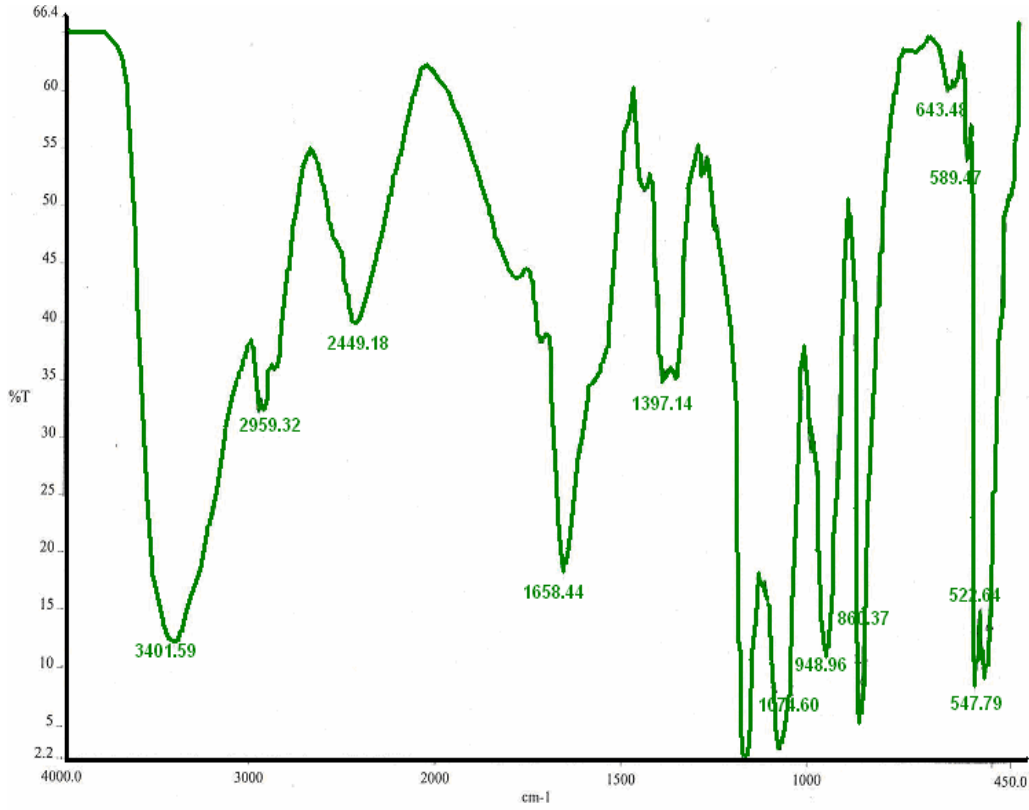
Şekil 5.1 0.1 M PBS pH7’de hazırlanmış  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranında sentelenen Polimer-Peptid konjugatlarının floresans spektrumu

$\lambda_{\max}$  değerinin kayması yani peptide göre blue shift vermesi konjugat oluşturduğunu göstermektedir. Yine şekil 5.2 de HPLC sonuçları da konjugatın oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 5.2 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinleri 40-60 dizilimli peptidi ile PAA'nın Karbodiimid yöntemi ile sentezlenen konjugatının(1), Polimerin(2), Peptidin(3) kromatogramları görülmektedir.

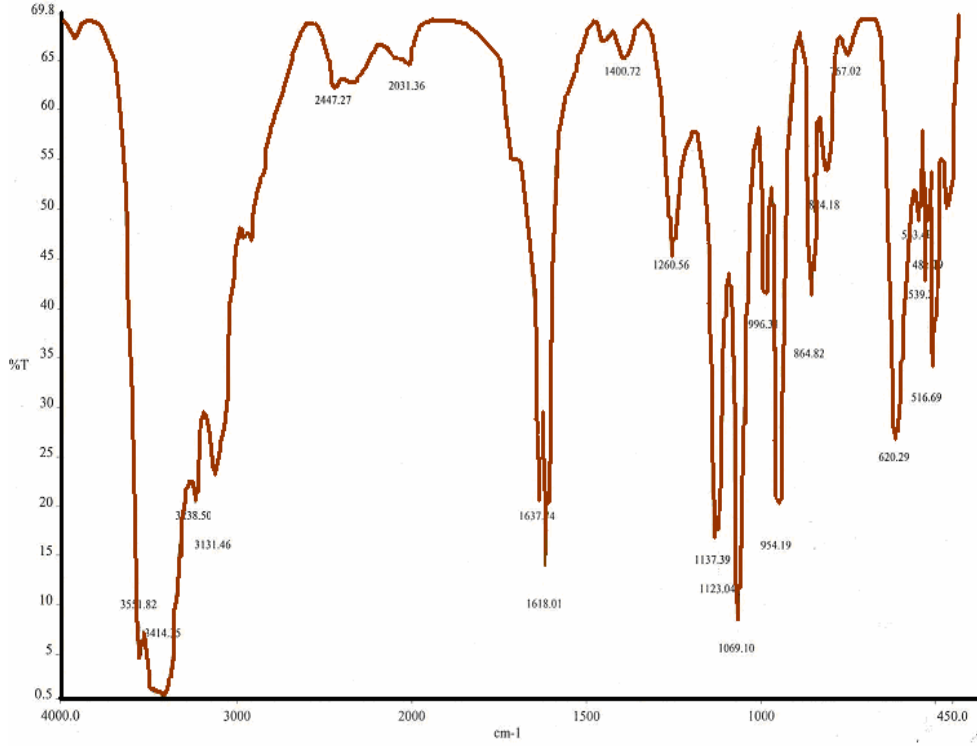
Kolon öncesi ve kolon sonrası FTIR spektrum dalga boyları karşılaştırıldığında, konjugat aynı -CO-NH- bağı oluşturduğundan dolayı genellikle benzer karakter taşımaktadırlar.



Şekil 5.3 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteinin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl doldu maddesi olan ayırma kolonu öncesi FTIR analizi.

Konjugatların FTIR spektrumları karşılaştırıldığında şekil 5.4 teki spektrumun daha belirgin bantlara sahip olduğu görülmektedir. 2449 cm ve 1397 cm bantlarının saflaştırmadan sonra büyük oranda azaldığı ve karbodiimid kalıntısının ve reaksiyonda istenmeyen ürün gibi oluşan üre türevlerinin kaybolduğu görülmektedir.





Şekil 5.4 Şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 40-60 dizili Peptid- PAA Konjugatın Toyopearl dolu maddesi olan Bio-Rad kolonundan geçirildikten sonraki FTIR analizi.

2900-3400 cm arasındaki geniş bant karbonil grubunun varlığını göstermekte ve kongugat spektrumundaki bandın daralması karbonil gruplarının amid gruplarına dönüştüğünü, Bu da konjugasyon reaksiyonunun tamamlandığını göstermektedir.

Kapsid proteininin 40-60 peptid dizisini içeren biyokonjugatlara karşı oluşan antikor miktar tayini sonuçları bu kompleksin organizmaya verildiğinde kontrole nazaran daha yüksek konsantrasyonda peptid spesifik antikor oluşumunu göstermiştir. Yani bu konjugat yüksek immünojen özellik gösteren yapay immünojendir.

Sonuç:

- Polimer-peptid konjugatlarının üretimi için yararlı olabilecek bir çalışmadır.
- Polimerin hem taşıyıcı, hemde adjuvant olarak kullanılmasını bir daha gösteren araştırmadır.

## 6 KAYNAKLAR

Acar, S., (2006), Peptid-Protein Kovalent Konjugasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Barany, G., Kneib-Cordonier, N., Mullen, D. G. (2004), "Polypeptide Synthesis, Solid Phase Method", Encyclopedia of Polymer Science and Technology.

Başalp, A., Bermek, E., Çirakoğlu, B., Coka, V., Mustafaev, M.I., Saraç, A.S., (1996), "Immune Response to 17 beta-estradiol in Polyelectrolyte Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", Hybridoma, 15 (3): 233-238.

Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., Bermek, E., (2000), "Immune Response to 17 beta-estradiol Involved in Polymer Gels: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", Hybridoma, 19 (6): 495-499.

Campbell, K.M., Farrell S.O. (2006), Biochemistry, Thomson Brooks/Cole.

Chang W. C., White P.D. (2000), Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford.

Deen, C., Claasen, E., Gerritse, K., Zegers, D.N., Boersma, J.A.W., (1990), "A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides enhanced anti-peptide antibody responses", J. Immunol. Methods., 129 119-25.

Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., Mustafaev, M., (2001), "Water-soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly(N-isopropyl-Acrylamide) and Their Immunogenicity", Biomaterials, 22 (17): 2383-2392.

Engvall, E., (1980), "Enzyme Immunassay ELISA and EMIT, Methods in Enzymology", Academic Press, New York, Vol 70, p.201-209, p.419-439.

Erganiş, O., İstanbuloğlu, E., (1993), "İmmünoloji", Mimoza Yayınları, İstanbul.

Frahks, H. S. And Evans, M. W. (1945), "Free volume and entropy in condensed systems III. Entropy in binary liquid mixtures", J. Chem. Phys., 13:507-532.

Franks, F. (2002), "Protein Stability: The Value of ' Old Literature ' Biophysical Chemistry", 96:117-127.

Friedli, G.L., (1996), "Interaction Of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other

Food Proteins And Metals”, A Thesis Presented For The Award Of Doctor Of Philosophy To The University Of Surrey.

Gürhan, Deliloğlu S.I., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N., Celik, N., (2002), “Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine”, In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix41, pp.349-357, FAO.

Hermanson, G.T., (1996), “Bioconjugate Techniques”, Academic Pres, California.

Hoffman, A.S., (2000), “Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations”, *Clinical Chemistry*. 46:9 1478–1486

Kauzmann, W. (1959), Some factors in the Interpretation of protein denaturation *Advances in Protein Chem.* (C. B. Anfinsen, M. L. Anson, Bailey K., and Edsall J. T.), Academic Pres Inc. 14:1-63.

McDonald, I. K. And Thornton , J. M. (1994), “Satisfying hydrogen bonding potential in proteins”, *Journal of Molecular Biology*, 238:777-793.

Murray K. R., Mayes P A., Granner D. K., Rodwell V. W. (1993), Harper’ın Biyokimyası (G. Menteş, B. Ersöz), Barış Kitabevi, İstanbul.

Mustafaev M., Mustafaeva Z.(2002),’ Novel polypeptide-comprising biopolimer systems’’, *Technology and Health Care*, 10:217-226.

Mustafaev M., (2004), “Functionally Biopolymer Systems” *Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences* ISSN: 1304–7191, Printed in Yildiz Technical University, 34349, İstanbul.

Mustafaev M., Çırakoglu B., Saraç S., Öztürk S., Yücel F, Bermek E., (1996f), “Soluble and insoluble ternary complexes of serum proteins with polyanions in the presence of Cu<sup>2+</sup> in water”, *Journal of Applied Polymer Science*, 62 (1): 99-109.

Mustafaev M., Osada Y., Matsukata M., Başalp A., Çırakoglu B., Bermek E., (1996d), “New amphiphilic immunogens by poly(N-isopropylacrylamide)-modified bovine serum albumin”, *Polymer Gels and Networks*, 4 (4): 363-372.

Mustafaev M., Yucel F., Çırakoglu B., Bermek E., (1996a), “Immune response to

progesterone involved in  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated polyanion-protein complex-antigen specificity and affinity of hybridoma clones”, *Immunology Letters*, 52 (2-3): 63-68 .

Mustafaev M.I., (1996g), “Polyelectrolytes in immunology: fundamentals and perspectives”, *Turkish Journal of Chemistry*, 20 (2): 126-138.

Mustafaev M.I., Kabanov V.A., (1980), “Mechanism of heparin binding with polycations in the presence of serum-proteins” *Farmakologiya i Toksikologiya*, 43 (4): 395-399.

Mustafaev M.I., Osada Y., Başalp A., Mustafaeva Z., Çirakoğlu B., Bermek E., (1998), “New temperature-responsive immunogens by poly (N-isopropyl-acryamide)-modified bovine serum albumin”, *Recent Advances in Peptide and Protein Delivery*, Editions de Sante, 145-162.

Mustafaev M.I., Romanova R.Y., Norimov A.Sh., Filatova E.D., (1990), “On the role of chemical nature of the polymeric carrier in the immunogenic and protective activities of polyelectrolyte complexes of BGG Mycobacteria cell envelope antigens in a model of tuberculosis infection”. *Immunologiya (Immunology)*, 6, 35-40.

Mustafaev M.I., Saraç A.S., (1996h), “Polyelectrolyte complexes (in immunology)”, In: Solomone J., Editor, *The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Application*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 5771-7.

Mustafaev M.I., Saraç A.S., Erkol A.Y., (1996c), “Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on stability and composition of water soluble ternary polyacrylic acid- $\text{Cu}^{2+}$ -protein complexes against radiation damage” *Polymer Bulletin*, 36 (5): 623-627.

Mustafaev M.I., Yucel F., Ozturk S., Çirakoglu B., Bermek E., (1996e), “ $\text{Cu}^{2+}$ -mediated complex formation between polyacrylic acid (PAA) and bovine serum albumin”, *Journal of Immunological Methods*, 197 (1-2): 31-37.

Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Ergen, E., (2002), “Novel-Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 17:251-269.

Mustafaev, M.I., (1996a) “Biyopolimerler” (Biopolymers), TUBİTAK, Gebze/Kocaeli, Türkiye.

Mustafaev, M.I., Norimov; A.Sh., (1990), “Polymer-Metal Complexes of Protein Antigens-A New Highly Effective Immunogens”. *Biomed.Sci.* 1(3), :274-278.

Mustafaev, M.I., Osada, Y., Endo, T., (1998), “Advanced Biopolymer Systems”, First

- Japanese-Turkish Workshop Materials. TUBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, pp: 1-76.
- Nelson, L. N., Cox, M. M. (2005), *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (N. Kılıç), Palme Yayınları, Ankara.
- Nispen, J.w. van (1987), "Synthesis and analysis of (poly)peptides", *Pure&Appl. Chem.*, 59:331-34
- Özbal, Y., (2000), "Temel İmmünoloji", 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Tic. Ltd. Şti.
- Sauer, M.J., Foulkes, J.A., Worsfold, A., Morris, B.A., (1986), "Use of Progesterone 11-glucuronide-alkaline Phosphatase Conjugate in A Sensitive Microtitre-Plate Enzymeimmunoassay of Progesterone in Milk and Its Application to Pregnancy Testing in Dairy Cattle", *J. Reprod. Fert.*, 76, 375-391.
- Patthy L. (1999), *Protein evolution*, Published Blackwell Publishing.
- Siegbahn, R. H., Eisenstein, P.E.M., , O., Rheingold, A.L., Koetzle T.F. (1996), "A New Intermolecular Interaction: Unconventional Hydrogen Bonds with Element-Hydride Bonds as Proton Acceptor Crabtree", *Acc. Chem. Res.*, 29(7):348-354
- Smith, J.A., (1989), "Synthetic peptides: Tools for Elucidating Mechanism of Protein Antigen Processing and Presentation", In *Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems*, J.P. Tom and E.T. Kaiser, eds. Alan R. Liss, Inc., New York, 31-42.
- Smith, J.A., Hunnel J.G.R., Leach, S.J., (1977), "A Novel Method for Delineating Antigenic Determinants: Peptide Synthesis and Radioimmunoassay Using The Same Solid Support", *.Immunochemistry* 14:565-572.
- Solomons G. T. W., Fryhle C. B. (2004), *Organic Chemistry*, John Wiley&Sons, United States of America.
- Williams, A., Ibrahim, I.A., (1981), "A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)", *J. Am. Chem. Soc.* 103,7090-7095
- Wong, S.S., (1993), "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", London:CRC Press Inc.,
- Yücel F., Çirakoğlu, B., Mustafaeva, Z., Mustafaev M., (2001), "Immune Response to Progesterone Immobilized on Cu<sup>2+</sup>- Induced Amphiphilic Polyelectrolyte-Protein Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", *Hybridoma*, 20 (1).

**INTERNET KAYNAKLARI**

- [1] <http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Assets/aminoAcidStruc.jpg>
- [2] [http://www.wvup.edu/ecrisp/amino\\_acid.gif](http://www.wvup.edu/ecrisp/amino_acid.gif)
- [3] [http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/amşno\\_acid.gif](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/amşno_acid.gif)
- [4] [http://www.fef.kafkas.edu.tr/bolum3proteinler1ders\\_dosyalar/frame.htm#slide0230.htm](http://www.fef.kafkas.edu.tr/bolum3proteinler1ders_dosyalar/frame.htm#slide0230.htm)
- [5] [http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/basic\\_amino\\_acids.htm](http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/basic_amino_acids.htm)
- [6] [http://en.wikipedia.org/wiki/Amino\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid)
- [7] [http://www.steve.gb.com/images/science/van\\_der\\_waals\\_forces.png](http://www.steve.gb.com/images/science/van_der_waals_forces.png)
- [8] [http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/basics\\_peptide\\_bond.html](http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/basics_peptide_bond.html)
- [9] <http://www.web.virginia.edu/heidi/chapter6/chp6.htm>
- [10] [http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b\\_weakforces.html](http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b_weakforces.html)
- [11] <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/pag>
- [12] <http://www.lerner.ccf.org/services/molecbiotech/peptide.php>
- [13] [http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060\\_equipment/020\\_chromatography/020\\_sec/index.html](http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060_equipment/020_chromatography/020_sec/index.html)
- [14] [http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec\\_chromatography.jpg](http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec_chromatography.jpg)
- [15] <http://www.hekimce.com/index.php?kiid=606>
- [16] <http://www.sartorius.com/index.php?id=2768>

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	02.06.1974	
Doğum yeri	Erzurum	
Lise	1990-1993	Oltu Lisesi
Lisans	1995-1999	Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2005-....	Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fak. Biyomühendislik Bölümü
Çalıştığı Kurumlar:		
Satış Paz. Mdr.	2002-2006	Gündoğdu Petrol Ürn. İnş. Gıda Nak. San. Tic. Ltd. Şti.
Satış Yönetmeni	2006-2007	Aras Akaryakıt Dağıtım ve Pazarlama A.Ş.
A. İstasyon Müdürü	2007-.....	Gündoğdu Petrol Ürn. İnş. Gıda Nak. San. Tic. Ltd. Şti.