

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

**INFLUENZA A VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİELEKTROLİTLERLE KONJUGASYON REAKSİYONUNUN FLORESANS
REZONANS ENERJİ TRANSFERİ ve DİĞER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YASEMİN BUDAMA KILINÇ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ**

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

İSTANBUL, 2013

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

**INFLUENZA A VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİELEKTROLİTLERLE KONJUGASYON REAKSİYONUNUN FLORESANS
REZONANS ENERJİ TRANSFERİ ve DİĞER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YASEMİN BUDAMA KILINÇ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ**

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

İSTANBULⁱⁱ, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

INFLUENZA A VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİELEKTROLİTLERLE KONJUGASYON REAKSİYONUNUN FLORESANS
REZONANS ENERJİ TRANSFERİ ve DİĞER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Yasemin BUDAMA KILINÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 15 Mart 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTARA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ

İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mesut KARAHAN

Üsküdar Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 29-07-04-ODAP numaralı "Sentetik Polimer-Peptid Konjugatlarının Üretimi" isimli projesi ve Devlet Planlama Teşkilatı'nın 25-DPT-07-04-01 numaralı "Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular" isimli şemsiye Projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez konumu belirleyen, çalışmalarımın şekillenmesinde büyük emeği bulunan, benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, kıymetli tez hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE'ye,

2003-2007 yılları arasında hem yüksek lisans hem de doktora tez çalışmam süresinde engin bilgisi ile çalışmalarımızın ilerlemesinde yardımcı olan, bizlerin her yönde önünü açan ve bu gelişmiş teknoloji ile çalışmamıza olanak sağlayan Biyomühendislik Kurucu Bölüm Başkanı, merhum Prof. Dr. Mehmet MUSTAFAEV AKDESTE'ye,

Tez çalışmam boyunca yapmış oldukları değerlendirmeler ile doktora çalışmama verdikleri destekten ötürü doktora tez izleme jüri üyeleri değerli hocalarım, Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ'ye ve Prof. Dr. Işıl ALBENİZ'e,

Çalışmalarımın yerine getirilmesine imkân sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığı'na, Biyomühendislik Bölümü'ne, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a ve Biyomühendislik Bölümündeki değerli hocalarıma,

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, tez çalışmamda kullanmış olduğum tüm cihazları bölümümüze Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular isimli şemsiye proje çerçevesinde temin edilmesini sağlayan Devlet Planlama Teşkilatına,

Hücre deneylerimin gerçekleştirilmesini sağlayan Prof. Dr. Adil Allahverdiyev ve Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a, GPC-Viscotek analizlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na, HPLC analizlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Dr. Kadriye KIZILBEY'e ve Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Influenza A Hemagglutinin H3N2 91-108 ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizilerinin sentezinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Zafer ÖZDEMİR'e ve özellikle Erdem KARABULUT'a, polimer sentezi çalışmalarında destek olan Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU'na ve Arş. Gör. Yeliz Başaran ELALMIŞ'a, laboratuvar içinde ve dışındaki desteklerinden dolayı yüksek lisans öğrencilerimiz Pelin PELİT ve Tayfun ACAR'a, Floresans Enerji Transferi yöntemi ile ilgili bilgisiyle beni yönlendiren desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şule ÖNCÜL'e, modelleme konusunda bilgi ve desteğiyle yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Serda KEÇEL GÜNDÜZ'e,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim boyunca manevi destekleri ve dostlukları ile hep yanımda olan değerli dostlarım Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a, Bilge Sema ODUNCU TEKEREK'e ve canım dostum Başak İŞCANI EROĞLU'na,

Hayatım boyunca kayıtsız şartsız sevgi ve destekleri ile beni ben yapan, sayelerinde bugünlere geldiğim canım Annem Cihan BUDAMA'ya ve canım Babam Halil İbrahim BUDAMA'ya, biricik kardeşlerim Murat Yasin ve Kübra BUDAMA'ya,

Tez sürecimde her konuda desteği ile bana güç veren, hayat ışığım, sevgili eşim Işık KILINÇ'a ve onun bana en büyük hediyesi olan prensesim Elif KILINÇ'a,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese sonsuz teşekkürler.

Mart, 2013

Yasemin BUDAMA KILINÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	xiii
KISALTMA LİSTESİ	xiv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ	xxiv
ÖZET	xxv
ABSTRACT	xxvii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2.....	5
GENEL BİLGİLER	5
2.1 Influenza Virüsü	5
2.1.1 Viral Genler ve Proteinler	7
2.1.2 Ekoloji.....	9
2.1.3 Epidemiyoloji	10
2.1.3.1 Zamana Ait Özellikler.....	10
2.1.3.2 Yer özellikleri.....	10
2.1.3.3 Kişi özellikleri.....	11
2.1.3.4 Konakçı Seçimi	11
2.1.3.5 Bulaşma özellikleri	12
2.1.4 Antijenik “Drift”	13
2.1.5 Antijenik “Shift”	13

2.1.6	Hastalık Tanısı	15
2.1.6.1	Klinik Belirti Ve Bulgular.....	15
2.1.6.2	Tanı.....	15
2.2	Aşılar	16
2.2.1	Aşı Türleri	17
2.2.1.1	Cansız (Ölü) Mikrop Aşıları.....	17
2.2.1.2	Canlı (Atenuue) Mikrop Aşıları.....	18
2.2.1.3	Mikrop Ürünlerinden Hazırlanan Aşılar	18
2.2.1.4	Biyoteknolojik Aşılar	18
2.3	Polielektrolit Komplekslerin İmmünolojik Uygulamalarda Kullanılması.....	20
2.4	İmmünojen Özellikteki Polielektrolit Komplekslerin Çalışma Prensipleri.....	21
2.5	Peptid Polielektrolit Kompleksleri	23
2.6	Polimerler.....	25
2.6.1	Nötral Polimerler	26
2.6.2	Polielektrolitler	26
2.6.2.1	Katyonik Polielektrolitler	27
2.6.2.2	Anyonik Polielektrolitler	27
2.6.2.3	Poliamfolitler.....	28
2.7	Amino Asitler ve Peptidler	29
2.7.1	Amino Asitler	29
2.7.2	Sınıflandırılması.....	30
2.7.2.1	Aromatik Amino Asitler.....	30
2.7.2.2	Polar Olmayan Alifatik Amino Asitler	31
2.7.2.3	Polar Yüksüz Amino Asitler	31
2.7.2.4	Bazik Amino Asitler	31
2.7.2.5	Asidik Amino Asitler	32
2.7.3	Peptidler ve Peptid Bağı.....	32
2.7.4	Proteinlerin Yapısındaki Kovalent Olmayan Etkileşimler.....	33
2.7.4.1	Van der Waals Etkileşimleri	34
2.7.4.2	Hidrojen Bağları	35
2.7.4.3	Hidrofobik Etkileşimler	36
2.7.4.4	Elektrostatik (İyonik) Etkileşimler	37
2.7.4.5	Disülfid Bağları	38
2.8	Çapraz Bağlama Reaktifleri	39
2.8.1	Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	40
2.8.2	Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar	41
2.8.3	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar	42
2.8.4	Karbodiimidler	42
2.8.4.1	EDC.....	43
2.8.4.2	EDC Plus Sülfö-NHS	43
2.8.4.3	CMC.....	44
2.8.4.4	DCC.....	44
2.8.4.5	DIC.....	44
2.8.4.6	N,N-Karbonildiimidazol	45
2.9	Floresans Enerji Transferi Yöntemi ile Biyokonjugasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	45
2.9.1	Heterotransfer	47

2.9.2	Homotransfer.....	47
2.9.3	Förster Mesafesi	47
2.9.4	Donörden Akseptöre Enerji Transferinin Hızı	47
2.9.5	Enerji Transferinin Hızı	47
2.9.6	Enerji Transferi Verimi	48
2.9.7	Biyokimyada Floresans Rezonans Enerji Transferinin Kullanımı	48
2.9.8	Enerji Transferinin Protein Katlanması Ölçümlerinde Kullanılması	49
BÖLÜM 3.....		52
DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ		52
3.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	52
3.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
	Asetonitril anhydrous, 99.8%.....	54
3.3	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	57
3.3.1	Asetat Tamponu.....	57
3.3.2	0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7)	57
3.3.3	100mM Sodyum Borat Tamponu (pH=9,2).....	57
3.3.4	100mM'lık NaHCO ₃ Tamponunun Hazırlanması.....	57
3.3.5	PAA Ara Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	58
3.4	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	59
3.4.1	UV-Görünür Bölge Spektroskopisi	59
3.4.2	Jel Filtrasyon (HPLC) Kromatografisi	60
3.4.3	Dört Detektörlü Boyut-Element (SEC) Kromatografisi	61
3.4.4	LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)	61
3.4.5	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	62
3.4.6	Floresans Spektroskopisi.....	63
3.5	Konjugatların Saflaştırılması	66
3.5.1	Diyaliz	66
3.5.2	Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri).....	67
3.6	Peptidlerin Sentezi	68
3.6.1	Katı Faz Peptid Sentezi	70
3.7	Floresans Enerji Transferi Yöntemi İle Mesafe Hesabı	71
3.8	Modelleme Çalışmaları	71
BÖLÜM 4.....		73
DENEYSEL KISIM.....		73
4.1	Kullanılan Peptid Dizileri	73
4.1.1	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptid Dizisi	73
4.1.2	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 Peptid Dizisi.....	79
4.1.3	Influenza A Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisi.....	82
4.1.4	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine Ait 98–106 Peptid Dizisi	85
4.2	Kullanılan Taşıyıcılar	89
4.2.1	Poliakrilik Asit.....	89
4.2.2	N-Vinil-2-pirolidon Akrilik Asit (2:1) Kopolimerinin Sentezi	89

4.2.3	Dekstran Aldehit'in Sentezi.....	90
4.2.3.1	Dekstran.....	90
4.2.3.2	Dekstran-Aldehit Türevinin Eldesi	91
4.2.3.3	Dekstran-Aldehit Türevinin FT-IR ile Karakterizasyonu	92
4.2.4	Bovine Serum Albumin	93
4.3	Konjugasyon Yöntemleri.....	93
4.3.1	EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Sonuçlar	95
4.3.1.1	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonu.....	95
4.3.1.2	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Bovine Serum Albumin ile Biyokonjugasyonu.....	101
4.3.1.3	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) Kopolimeri ile Biyokonjugasyonu	105
4.3.1.4	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu.....	109
4.3.1.5	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu	116
4.3.1.6	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu	124
4.3.2	Dekstran Aldehit ile Konjugasyon Yöntemi	127
4.3.2.1	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Dekstran Aldehit ile Konjugasyonu.....	127
4.3.3	Kompleks Oluşumu Yöntemi.....	130
4.3.3.1	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Kompleksleri	130
4.3.3.2	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin VP-co-AA ($M_w=250.000$ Da) Kopolimeri ile Kompleksleri.....	131
4.3.3.3	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri.....	133
4.3.3.4	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri.....	135
4.3.3.5	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri.....	136
4.4	Hücre Deneyleri	138
4.4.1	MCF 7 Hücrelerinin Kültürünün Yapılması.....	138
4.4.2	Hücrelerin Sayılması.....	138
4.4.3	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugatının Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi.....	139
4.4.4	Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugatının Flow Sitometrik Yöntem ile İncelenmesi (7-AAD boyama) ..	139
4.4.5	Sonuçlar	140
4.5	Floresans Enerji Transferi Deneyleri Ve Hesaplamaları.....	143
4.5.1	Floresans Enerji Transferi Deneyi	143
4.5.2	Saf Peptid ve Biyokonjugatların Kuantum Verimlerinin Hesaplanması	148
4.5.2.1	Peptidin Kuantum Veriminin Hesaplanması	148
4.5.2.2	Biyokonjugatın Kuantum Veriminin Hesaplanması	148

4.5.3 Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi ile İntermoleküler Mesafe Hesabı	149
4.6 Modelleme Sonuçları	152
BÖLÜM 5	155
SONUÇ VE ÖNERİLER	155
5.1 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Tartışmalar	158
5.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteininin Biyokonjugatları.....	158
5.1.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	158
5.1.1.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Bovine Serum Albumin ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	161
5.1.1.3 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) ($M_w=250000$ Da) ile Biyokonjugasyonu	163
5.1.2 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu	165
5.1.2.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	165
5.1.3 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu	168
5.1.3.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma.....	168
5.1.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu	171
5.1.4.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma	171
5.2 Dekstran Aldehit ile Konjugasyon Yöntemi	173
5.2.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Dekstran Aldehit ile Konjugasyonu.....	173
5.3 Kompleks Oluşumu Yöntemi.....	175
5.3.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidi Kompleksleri.....	175
5.3.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Komplekslerine Ait Tartışma	175
5.3.1.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin [P(VP-co-AA)] ($M_w=250.000$ Da) Kopolimeri ile Komplekslerine Ait Tartışma	177
5.3.2 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptidi Kompleksleri	178
5.3.2.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptidinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma	178
5.3.3 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptidi Kompleksleri	180
5.3.3.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma	180
5.3.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptidi Kompleksleri	181
5.3.4.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma	181

5.4	Hücre Deneylerine Ait Tartışma.....	182
5.4.1	Hücre Sonuçları.....	182
5.5	Floresans Rezonans Enerji Transferi Deneylerine ve İntermoleküler Mesafe Hesabına Ait Tartışma.....	186
5.6	Modelleme Sonuçları ve Tartışması.....	188
5.6.1	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisi İçin Modelleme Çalışmaları	189
KAYNAKLAR.....		195
ÖZGEÇMİŞ.....		204

SİMGE LİSTESİ

λ_{max}	Maksimum floresans şiddetinin görüldüğü dalgaboyu
I_{max}	Maksimum floresans şiddeti
Å	Amström
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
M	Molar
n	Mol
°C	Derece santigrat

KISALTMA LİSTESİ

HA	Hemagglutinin
NA	Nöraminidaz
SEC	Moleküler eleme kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
UV	Ultra Violet
RALS	Işık Saçılması
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
FT-IR	Furier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Furier Transform Infrared Spectroscopy)
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy)
PAA	Poliakrilikasit
(VP-ko-AA)	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid)
EDC	Karbodiimid
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
HCl	Hidroklorik Asit
PBS	Fosfat Tamponu
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
pI	İzoelektrik nokta
BSA	Bovine serum albumin
DNC	Dansyl Chloride
PE	Polielektrolit
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
D	Donör
A	Akseptör

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Influenza virüsünün şematik görüntüsü [32]. 6
Şekil 2.2	Influenza virüsünün proteinlerinin şematik görüntüsü [33]..... 6
Şekil 2.3	(a) Influenza virüsünün yapısal şekli, (b)Influenza virüsünün elektron mikroskopundaki görüntüsü [2], [5]. 7
Şekil 2.4	Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 2010 yılı Influenza Virüsü gözlemlenen bölgeler..... 11
Şekil 2.5	Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerin modellerinin yapısı..... 22
Şekil 2.6	Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi [60]. 24
Şekil 2.7	Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [15], [16]..... 25
Şekil 2.8	Polimer molekülünün monomer birimlerinin kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşumu..... 25
Şekil 2.9	Poliakrilik asit. 26
Şekil 2.10	Polivinil alkol 26
Şekil 2.11	(a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c)poli(dialildimetilamonyum klorür)[61]. 26
Şekil 2.12	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler 27
Şekil 2.13	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler 28
Şekil 2.14	Poliamfolit..... 28
Şekil 2.15	Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları [62]. 29
Şekil 2.16	Bir amino asidin kimyasal formül ile gösterimi..... 29
Şekil 2.17	Proteinlerde birincil yapıyı oluşturan peptidlerin, amino asit diziliminin şematik gösterimi [63]. 30
Şekil 2.18	Aromatik amino asitler. 31
Şekil 2.19	Peptid bağının oluşumunun şematik gösterimi [66]..... 32
Şekil 2.20	Peptidin amino asit şematik gösterimi 33
Şekil 2.21	Kovalent olmayan bağlar [71]. 34
Şekil 2.22	İki atom arasında Van der Waals kuvvetlerinin oluşumu [72]..... 34
Şekil 2.23	Su molekülleri arasında oluşan hidrojen bağı [75]. 35
Şekil 2.24	Protein zincirindeki hidrojen bağı oluşumu [76]..... 35
Şekil 2.25	Yüksüz moleküller arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimler [79]... 36
Şekil 2.26	Hidrofobik kısımlar içeren bir peptidde hidrofobik kısımların bir araya gelmesi [80]..... 37

Şekil 2.27	Zıt yüklü iki peptid zinciri arasında oluşan iyonik etkileşimler [80].	37
Şekil 2.28	Bir peptid zincirinin farklı iki Sistein bölgesi arasında meydana gelen disülfid bağı [80].	38
Şekil 2.29	Biyomakromoleküllerin intermoleküler etkileşim ile bağlanması.	39
Şekil 2.30	Biyomakromoleküllerin intramoleküler etkileşim ile bağlanması.	39
Şekil 2.31	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar.	40
Şekil 2.32	Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar.	41
Şekil 2.33	EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür] $M_W=191,7$	43
Şekil 2.34	1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid. $M_W=423,58$	44
Şekil 2.35	N,N'-Disiklohegzil karbodiimid $M_W=206,32$	44
Şekil 2.36	Diizopropil karbodiimid $M_W=126,2$	44
Şekil 2.37	N,N'-Karbonildiimidazol $M_W=162$	45
Şekil 2.38	(A) Donör ve akseptör moleküllerinin tipik FRET spektrumları. Bu örnekte, Cy3'ün emisyon spektrumunun Cy5'in absorpsiyon spektrumuyla üst üste bindiği gösterilmiştir, böylece iki boya arasında FRET meydana gelebilmektedir. (B) Çift sarmallı DNA'da yerleşmiş işaretli iki nükleotid bir FRET çifti oluşturmaktadır. (C) İki donör boya ve iki akseptör boya arasındaki FRET örneği. U-Cy5 ve C-Cy3 DNA dizisinde A ve G'ye karşı birleştirilir, donör emisyonu, akseptörler emisyon yaparken kısmen sönmülmektedir [97].	46
Şekil 2.39	Protein, donör ve alıcı ile kovalent olarak işaretlenmiştir. Donör genellikle Trp kalıntısıdır [94].	48
Şekil 2.40	α -helikal durumdaki melittinin yapısı. Donör triptofan-19 ve akseptör bir N-terminal dansyl grubudur [94], [101].	49
Şekil 2.41	Melittin donörünün (D) ve alıcı-işaretlenmiş melittinin emisyon spektrumları (D-A). uyarı dalgaboyu 282 nm'dir [94], [101].	49
Şekil 2.42	Serin Hidroksimetil Transferaz [94], [102].	50
Şekil 2.43	Refolding esnasında PyP-5'-serin hidroksimetiltransferazda Trp-183'ün emisyon spektrumları. 290 nm'de uyarılmıştır [94], [102].	50
Şekil 2.44	Single-triptofan mutantlarının refolding esnasında serin hidroksimetiltransferazda 380 nm'de PyP'nin zamana bağlı yoğunluğu [94], [102].	51
Şekil 3.1	Bouguer-Lambert-Beer Yasası'nın şematik gösterimi.	59
Şekil 3.2	Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram [104].	60
Şekil 3.3	Doğadaki floresans özellikli aromatik amino asitler: Triptofan, Tirozin ve Fenilalanin.	64
Şekil 3.4	Diyaliz yönteminin şematik görünümü	67
Şekil 3.5	Konjugatların PES membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi [117].	68
Şekil 3.6	(A)Theodor Curtius'un çalışması, (B)Emil Fischer'in çalışması [122].	69
Şekil 3.7	Fmoc N α koruma grubu	70
Şekil 4.1	Influenza A Virüsü M2 proteini peptidine ait hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.	75
Şekil 4.2	Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait MALDI-TOF sonucu. Operasyon modu: Lineer, Polarite: Pozitif, Kalibrasyon Matrisi: a-Cyano-4-hidroksicinnamic asit	76

Şekil 4.3	Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait LC-MS sonucu. Solvent A: %0,05 TFA in H ₂ O. Solvent B: %0,05 TFA in ACN. Dalga boyu: 280 nm Kolon: C18, 10µm, 4.6x250MM.	77
Şekil 4.4	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidine ait FTIR grafiği.....	78
Şekil 4.5	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin UV kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 4.6	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 peptid dizisine ait hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.	82
Şekil 4.7	Ticari olarak alınan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–106 peptid dizisine ait hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.	84
Şekil 4.8	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait MALDI-TOF sonucu. Operasyon modu: Lineer, Polarite: Negatif, Kalibrasyon Matrisi: a-Cyano-4-hidroksicinnamic asit.	84
Şekil 4.9	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait LC-MS sonucu. Solvent A: %0,05 TFA in H ₂ O. Solvent B: %0,05 TFA in ACN. Dalga boyu: 220 nm Kolon: C18, 10µm, 4.6x250mm.....	85
Şekil 4.10	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisine ait hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.	86
Şekil 4.11	Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin UV Kromatogramı.	87
Şekil 4.12	Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin toplam iyon kromatogramı	88
Şekil 4.13	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin alıkonma zamanı 12,7 dakikadaki kütle spektrumu.	88
Şekil 4.14	Poli(N-vinil-2-pirolidon’un akrilik asit ile kopolimerinin sentez reaksiyonunun (a) şematik gösterimi, (b) deney düzeneği.....	90
Şekil 4.15	Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi [139].....	91
Şekil 4.16	Dekstran yapısı [140]	92
Şekil 4.17	Dekstran aldehit türevinin oluşumu.	92
Şekil 4.18	Dekstran ve sentezlenen dekstran aldehit türevine ait FT-IR spektrumları.	92
Şekil 4.19	EDC varlığında peptid/polimer konjugasyonunun mekanizması [117]	94
Şekil 4.20	Peptid/DA konjugasyonunun şematik gösterimi [143].....	94
Şekil 4.21	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.	96
Şekil 4.22	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği. (♦) A koşulları, (♦) B koşulları,(♦) C koşulları.....	97
Şekil 4.23	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı floresans grafiği. Saf Peptid (353 nm.) (♦) A koşulları (351 nm.), (♦) B koşulları (350 nm.),(♦) C koşulları (347 nm.)	97

Şekil 4.24	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı SEC grafiği: (a) UV, (b) Işık saçılması dedektörü. . 98
Şekil 4.25	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği. (Serbest peptid n=7 mol oranındaki biyokonjugat ile eşit miktarda peptid içermektedir.) 99
Şekil 4.26	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı SEC grafiği: (a) UV, (b) Işık saçılması dedektörü. 100
Şekil 4.27	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1♦), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (2♦)($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 3(3♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 5(4♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 7(5♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 9 (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 11 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): Serbest peptid (8♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$). 101
Şekil 4.28	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf BSA ve peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği. 102
Şekil 4.29	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları. (♦)n=1 ($\lambda_{\text{max}}=331\text{nm}$), (♦)n=3 ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$), (♦)n=5 ($\lambda_{\text{max}}=336\text{nm}$), (♦)n=7 ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$), (♦)n=9 ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), (♦)n=11 ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), (♦)Saf peptid n=5 ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$) 103
Şekil 4.30	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının BSA ve saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları. (♦)n=1 ($\lambda_{\text{max}}=331\text{nm}$), (♦)n=3 ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$), (♦)n=5 ($\lambda_{\text{max}}=336\text{nm}$), (♦)n=7 ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$), (♦)n=9 ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), (♦)n=11 ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), (♦)Saf peptid n=5 ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$), (♦)BSA ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$). 103
Şekil 4.31	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının SEC grafikleri: (a) UV ve (b) Işık Saçılması dedektörlerine ait kromatogramlar. 104
Şekil 4.32	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının absorbens grafiği. 106
Şekil 4.33	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği. 106
Şekil 4.34	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: [P(VP-co-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri (1♦), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=1$ (2♦)($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 3(3♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 5(4♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 7(5♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): Serbest peptid (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$): 9 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 11 (8♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$). 107
Şekil 4.35	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının (a) saf peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait (b)

	kopolimer ile kıyaslamalı Işık saçılması dedektörüne ait SEC kromatogramları.	108
Şekil 4.36	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramları.	111
Şekil 4.37	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait Floresans spektrumları; (C♦) C Koşulları ($\lambda_{\max}=341\text{nm}$), (D ♦) D Koşulları ($\lambda_{\max}=341\text{nm}$), (♦) Saf Peptid ($\lambda_{\max}=350\text{nm}$), (A♦) A Koşulları ($\lambda_{\max}=343\text{nm}$), (B♦) B Koşulları ($\lambda_{\max}=343\text{nm}$).	111
Şekil 4.38	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	112
Şekil 4.39	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 dizili peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının konsantrasyona bağlı absorbens değişimi grafiği.	113
Şekil 4.40	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.	114
Şekil 4.41	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan konjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	115
Şekil 4.42	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait Floresans spektrumları; $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(1♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}): 3(2♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}): 5(3♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}): 7(4♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}): 9(5♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}): 11(6♦) (\lambda_{\max}=341\text{nm}):$ Serbest peptid $(7♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm})$.	116
Şekil 4.43	(a) Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisine ait HPLC kromatogramı. (b) EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.	118
Şekil 4.44	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği. (♦) A koşulları, (♦) B koşulları, (♦) C koşulları, (♦) D koşulları, (♦) PAA	119
Şekil 4.45	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	120
Şekil 4.46	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.	121
Şekil 4.47	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptidi ile PAA'nın biyokonjugatlarının floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1),	

	$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(2\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}): 3(3\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}): 5(4\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}): 7(5\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}): 9(6\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}): \text{Serbest peptid} (7\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=300\text{nm})$	122
Şekil 4.48	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	123
Şekil 4.49	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramları.	124
Şekil 4.50	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptidi ile PAA'nın biyokonjugatlarının floresans spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=334\text{nm}): 3(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}): 5(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}): 7(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}): 9(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}): 11(\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}): \text{Serbest peptid} (\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm})$...	125
Şekil 4.51	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	126
Şekil 4.52	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyon reaksiyonu aşamaları.	127
Şekil 4.53	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit biyokonjugatlarının konsantrasyona bağlı absorpsiyon değişimi grafiği.	128
Şekil 4.54	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile konjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.	129
Şekil 4.55	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: $(\blacklozenge)\text{Dekstran Aldehit} (1), n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=3 (2\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}): 5(3\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}): 7(4\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}): 9(5\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}): \text{Serbest peptid} (6\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}): 11 (7\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm})$. 129	129
Şekil 4.56	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.....	130
Şekil 4.57	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1$\blacklozenge$), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(2\blacklozenge)(\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}): 3(3\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}): 5(4\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}): 7(5\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=349\text{nm}): 9 (7\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=351\text{nm}): 11 (8\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}): \text{Serbest peptid} (6\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=353\text{nm})$	131
Şekil 4.58	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.....	132
Şekil 4.59	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: VP/AA ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri (1$\blacklozenge$), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=1(2\blacklozenge)(\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}): 3(3\blacklozenge) (\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}):$	

	5(4♦) ($\lambda_{\max}=348\text{nm}$): 7(5♦) ($\lambda_{\max}=348\text{nm}$): Serbest peptid (6♦) ($\lambda_{\max}=353\text{nm}$): 9 (7♦) ($\lambda_{\max}=348\text{nm}$): 11 (8♦) ($\lambda_{\max}=348\text{nm}$). 132
Şekil 4.60	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan komplekslerine ait HPLC kromatogramları..... 133
Şekil 4.61	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan komplekslerine ait Floresans spektrumları; $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(1♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}): 3(2♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}): 5(3♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}): 7(5♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}): 9(6♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}): 11(7♦) (\lambda_{\max}=350\text{nm}):$ Serbest peptid (4♦) ($\lambda_{\max}=350\text{nm}$). 134
Şekil 4.62	Farklı mol oranlarında sentezlenen 98-106 peptid dizisi PAA komplekslerine ait HPLC kromatogramları. 135
Şekil 4.63	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptidi ile PAA'nın komplekslerinin floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(2♦) (\lambda_{\max}=300\text{nm}): 3(3♦) (\lambda_{\max}=300\text{nm}): 5(4♦) (\lambda_{\max}=300\text{nm}): 7(5♦) (\lambda_{\max}=300\text{nm}): 9(5♦) (\lambda_{\max}=300\text{nm}):$ Serbest peptid (7♦) ($\lambda_{\max}=300\text{nm}$). 136
Şekil 4.64	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile komplekslerine ait HPLC kromatogramları..... 137
Şekil 4.65	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile komplekslerine ait floresns spektrumlar.: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1(♦) (\lambda_{\max}=347\text{nm}): 3(♦) (\lambda_{\max}=347\text{nm}): 5(♦) (\lambda_{\max}=347\text{nm}): 7(♦) (\lambda_{\max}=345\text{nm}): 9(♦) (\lambda_{\max}=345\text{nm}): 11(♦) (\lambda_{\max}=335\text{nm}):$ Serbest peptid (5♦) ($\lambda_{\max}=348\text{nm}$). 137
Şekil 4.66	Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü 140
Şekil 4.67	1 mg/ml Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatının MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi..... 140
Şekil 4.68	5 mg/ml Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatının MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi..... 141
Şekil 4.69	Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu..... 141
Şekil 4.70	1 mg/ml Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatına maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu 142
Şekil 4.71	5 mg/ml Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatına maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu 142
Şekil 4.72	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidnin amino asit rezidüleri 143
Şekil 4.73	Dansyl Chloride (5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride)..... 144
Şekil 4.74	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisine ait absorpsiyon spektrumu. 144
Şekil 4.75	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisine ait emisyon spektrumu. 145
Şekil 4.76	DNC ye ait absorpsiyon spektrumu. 145
Şekil 4.77	DNC ye ait emisyon spektrumu. 146

Şekil 4.78	(◆)Donörün emisyon spektrumu ile (◆)akseptörün absorpsiyon spektrumlarının overlap grafiği.	146
Şekil 4.79	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC ile titrasyon spektrumu.	147
Şekil 4.80	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatının DNC ile titrasyon spektrumu.	147
Şekil 4.81	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.	152
Şekil 4.82	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	152
Şekil 4.83	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	153
Şekil 4.84	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.	153
Şekil 4.85	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	154
Şekil 4.86	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	154
Şekil 5.1	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (◆) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	160
Şekil 5.2	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile (■)biyokonjugatlarının HPLC cihazından elde edilen kromatogramlarının pik alanları.	162
Şekil 5.3	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP/AA (Mw=250.000 Da) kopolimeri ile (◆)biyokonjugatlarının ve her bir biyokonjugat oranındaki polimer ile bağlanmamış (◆) serbest peptidlerin pik alanlarının kıyaslamalı grafiği.	164
Şekil 5.4	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■)biyokonjugatlara ait pik alanı değişimi, (◆) serbest peptid moleküllerine ait pik alanı değişimi.	167
Şekil 5.5	Farklı yöntemlere göre sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan konjugatlarına ait HPLC kromatogramlarındaki 10-14. dakikalar arasındaki pik alanları.	169
Şekil 5.6	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■)biyokonjugatlara ait pik alanı değişimi.	172
Şekil 5.7	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugatlarının HPLC cihazından elde edilen kromatogramlarının pik alanları.	174

Şekil 5.8	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile kompleks oluşumunda (■) komplekslere ve (●) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.....	176
Şekil 5.9	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP-co-AA kopolimeri ile komplekslerinin HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■) bağlanmış (Pik I bölgesi) , (●) serbest peptidlerin (Pik II bölgesi) pik alanlarının kıyaslamalı grafiği.	177
Şekil 5.10	Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■) komplekslere ait pik alanı değişimi , (●) serbest peptid moleküllerine ait pik alanı değişimi	179
Şekil 5.11	Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile konjugatının hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi.....	183
Şekil 5.12	Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatının hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile kontrole göre % canlılık olarak ifade edilmesi.	183
Şekil 5.13	Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile konjugatının hücre canlılığına etkisinin Flow Sitometrik olarak analizi. (Konsantrasyon : %Canlılık = 0:100 – 0.05:80.91 – 0.5:76.83 – 1:77.28 – 2:77.69 - 3,5:78.11 – 5:55.88)	184
Şekil 5.14	Poliakrilik asitin 0.1-5-10-15 mg/ml konsantrasyonlarında toksisitesi [148].	185
Şekil 5.15	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.	189
Şekil 5.16	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	190
Şekil 5.17	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.....	191
Şekil 5.18	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.....	192
Şekil 5.19	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.....	192
Şekil 5.20	Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	193

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Influenza virüs proteinleri ve işlevleri [33].....	8
Çizelge 2.2	Influenza A Virüsünün Hemagglutinin ve Nöraminidaz alttıpleri [33]	10
Çizelge 2.3	Dünya Sağlık Örgütü Pandemi Alarm Düzeyleri.....	14
Çizelge 2.4	Influenza Tanı Testleri [36].....	16
Çizelge 3.1	Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri.....	54
Çizelge 3.1	Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri.....	55
Çizelge 3.1	Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri.....	56
Çizelge 3.2	Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninin soğurma ve floresans dalgaboyu değerleri.	64
Çizelge 4.1	Tez çalışmasında kullanılan peptid dizileri.	73
Çizelge 4.2	Influenza A Virüsü M2 proteini peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı	74
Çizelge 4.3	Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait pik değerleri tablosu.....	77
Çizelge 4.4	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı	80
Çizelge 4.5	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–106 peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı.	83
Çizelge 4.6	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait pik değerleri tablosu.	85
Çizelge 4.7	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	99
Çizelge 4.8	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	102
Çizelge 4.9	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	105
Çizelge 4.10	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	113
Çizelge 4.11	Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları..	121
Çizelge 4.12	Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	124
Çizelge 4.13	Influenza A Virüsü M2e Proteini peptid dizisinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.	128

**INFLUENZA A VİRÜSÜNE AİT SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİELEKTROLİTLERLE KONJUGASYON REAKSİYONUNUN FLORESANS
REZONANS ENERJİ TRANSFERİ ve DİĞER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Yasemin BUDAMA KILINÇ

Biyomühendislik Bölümü
Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd.Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Influenza A Virüsü farklı zaman ve yerlerde epidemilere ve dünya çapında pandemilere neden olmuştur ve gelecekte de olması yüksek ihtimal olan bir hastalıktır. En son 2009 yılında halk arasında Domuz Gribi adı ile bilinen Influenza A Virüsü'nün neden olduğu pandemi nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü alarm seviyesini 5'den en üst düzey olan 6 dereceye çıkartmıştır.

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsüne ait dört farklı peptid dizisi kullanılmıştır. Bunlardan iki peptid dizisi tarafımızdan sentezlenmiş diğer iki dizi ise ticari olarak satın alınmıştır. Bu peptid dizilerinin karakterizasyonları yapılmıştır. Peptid polielektrolit biyokonjugatlarının ve komplekslerinin oluşturulması için dört farklı taşıyıcı kullanılmıştır; poliakrilik asid, poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilikasid), dekstran aldehit ve bovin serum albumin. Taşıyıcılardan poliakrilik asit ve bovin serum albumin ticari olarak alınmıştır. Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilikasid) ve dekstran aldehit tarafımızca sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Influenza A Virüsüne ait farklı peptid epitopları kullanılarak değişik yöntemlerle adı geçen taşıyıcılar ile biyokonjugatları ve kompleksleri sentezlenmiştir. Bu biyokonjugat ve komplekslerin fizikokimyasal yapıları incelenmiş, peptid antijenlerinin immünojenliğinin yükseltilmesi amacıyla peptid biyokonjugatlarının gerekli üç boyutlu yapıları oluşturulmuş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Biyokonjugatların ve komplekslerin oluşumu farklı spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle

aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında karbodiimid varlığında kovalent bağlar ile oluşan biyokonjugatların daha verimli bağlandığı görülmüştür.

Sentetik aşı modeli olarak tasarladığımız Influenza A Virüsü M2 peptidi-polielektrolit biyokonjugatları için; in vivo uygulamalarda kullanılan düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde kayda değer bir toksik etki göstermediği; hem MTT deneyleri ile, hem de Flow Cytometry yöntemi ile hücre canlılığı kontrol edilerek birbirini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir ve biyokonjugatların deney hayvanları üzerinde kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

Konjugasyon reaksiyonunun oluşumu floresans boya kullanılarak Floresans Rezonans Enerji Transferi yöntemi yardımı ile araştırılmıştır. İntermoleküler mesafe hesabı yapıp, saf peptid ve biyokonjugat oluşumunda konformasyondaki değişimler hesaplanmış ve sayısal değerlerle de ifade edilmiştir. Literatürde ilk kez Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi modellenmiş, moleküler mekanik yöntem ile minimum enerjiye sahip olduğu optimize geometrisi belirlenmiştir. FRET yöntemi ile deneysel verilere dayalı elde edilen sayısal değerlerin, teorik olarak hesaplanan değerler ile örtüştüğü ispatlanmıştır.

Bu tez kapsamında Floresans Enerji Transferi Yöntemi ile biyokonjugattaki donör ve akseptör arasındaki intermoleküler mesafe hesabı ile elde edilen bilgiler, Influenza A Virüsü'nün neden olduğu epidemilere ve pandemilere neden olan salgın hastalığa karşı spesifik antikorların elde edilmesi, nanobiyosensörlerin oluşturulması, tanı kitlerinin ve en önemlisi günümüzde popüler çalışmalar arasında yer alan merhum Hocamız değerli bilim insanı Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'nin hedefi olan aynı polimer matriksine birden fazla hastalığın antijeninin bağlanarak multifonksiyonel biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesine ışık tutacak bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Influenza A Virüsü, Floresans Rezonans Enerji Transferi, kovalent konjugasyon, optimize geometri, üç boyutlu konformasyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CONJUGATION REACTION SYNTHETIC PEPTIDES OF INFLUENZA A VIRUS WITH POLYELECTROLYTES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER and THE OTHER METHODS

Yasemin BUDAMA KILINÇ

Department of Bioengineering
PhD. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Influenza A virus had caused epidemics and pandemics all over the world at different times and probably will cause in the future, too. Lastly in 2009, WHO raised the level of pandemic alert from phase 5 to 6 because of colloquially known as Swine Flu caused by Influenza A Virus.

In this PhD. thesis, four different peptide sequences of the influenza A virus was used. Two of them were synthesized in our laboratory and the other two sequences were purchased commercially. These peptide sequences were characterized. Four different carriers (polyacrylic acid, poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid), dextran aldehyde, and bovine serum albumin) were used for the synthesis of the peptide polyelectrolyte bioconjugates and formation of the complexes. Polyacrylic acid and bovine serum albumin were purchased commercially. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) and dextran aldehyde were synthesized and characterized in our laboratory.

Bioconjugates and complexes of different peptide epitopes of Influenza A Virus were synthesized through the mentioned carriers with various methods. Physicochemical structures of these bioconjugates and complexes were investigated, in order to increase immunogenicity of the peptide antigens, the necessary three-dimensional structures of peptide bioconjugates were formed and characterized. The formation of bioconjugates and complexes were clarified by various spectroscopic and chromatographic methods. When results were compared, bioconjugates formed with

covalent bonds which were obtained in the presence of carbodiimide was found to be more efficient.

For the Influenza A virus M2 peptide polyelectrolyte bioconjugates designed as a synthetic vaccine model; it didn't show significant toxic effect on the MCF-7 cells using low concentrations in vivo applications; by controlling cell viability with Flow Cytometry method and MTT experiments, results that supporting each other have been obtained and the usability of bioconjugates upon the experimental animals have been presented.

The formation of conjugation reaction was investigated by Fluorescence Resonance Energy Transfer method with using Fluorescence dye. By calculating intermolecular distance, conformation changes in the pure peptide and the formation of bioconjugate were calculated and expressed with numerical values. In the literature, the peptide sequence of Influenza A virus Hemagglutinin H3N2 91-106 was modeled for the first time, the optimized geometry with minimum energy were determined by molecular mechanics method. The numerical values obtained that are based on experimental data proved to overlap the theoretically calculated values by FRET method.

In this PhD. thesis, with the information obtained from intermolecular distance calculations between donor and acceptor in bioconjugate by Fluorescence Energy Transfer Method clearly showed to obtaining of specific antibodies against the disease because of the epidemics and pandemics caused by Influenza A viruses, the creation of nanobiosensors and diagnostic kits and the most important; target of our teacher, precious scientist, decedent Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste, the development of multifunctional biotechnology vaccines with binding of more than one disease's antigen on the same polymer matrix.

Keywords: Influenza A virus, Fluorescence Resonance Energy Transfer, Covalent Conjugation, Optimized geometry, 3-dimensional conformation.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Oldukça bulaşıcı bir akut solunum yolu hastalığı olarak bilinen grip, eski çağlardan beri insanları etkilemektedir. Son olarak, 11 Haziran 2009 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü'nün en yüksek uyarı seviyesi olan 6. evre pandemi uyarısında bulunduğu domuz gribidir. İlk kaydı ise M.Ö. 412'lere dayanan epidemi sonrasında, orta çağda birçok salgın tarif edilmiştir. 1500 yılından 1800 yılına kadar olan döneme ait verilerde, epidemilerin göreceli olarak sıklıkla ama düzenli olmayan aralıklarla görüldüğü ve hastalığın düzensiz zaman dilimleriyle kaybolduğu belirlenmiştir. Ayrıca Asya'dan başlayıp bütün Rusya'ya yayılan 1781 ve 1830 epidemilerinde olduğu gibi epidemilerin şiddetinde farklılıklar olduğu saptanmıştır. Genellikle yaşlılarda ölümcül seyrettiği ve bazı epidemilerin süratle yayıldığı bilinmektedir. Geçmiş salgınlarla ait bu bilgiler, günümüzdeki grip salgınlarıyla benzerlikler göstermektedir. Günümüzdeki epidemiler de, genel olarak öncelikle Uzak Doğu Asya'da görülmekte ve duyarlı kişilerde yüksek morbidite oranına neden olmaktadır [1] [2].

Influenza virüsü geçmişten günümüze büyük kayıplara yol açmakla beraber, neden olduğu epidemilerden en önemlisi, 1918-1919'da meydana gelen ve İspanya gribi olarak adlandırılmasına rağmen sadece İspanya'da değil, bütün dünyada 20-40 milyon kadar insanın ölümüne yol açan grip pandemisidir. Amerika Birleşik Devletleri ordusunun yaklaşık %80'i bu grip salgınında kaybedilmiş, Avrupa'da askeri birliklerin

çoğu bu salgından ciddi biçimde zarar görmüştür. 1918-1919 pandemisinin neden olduğu zarar ve kayıplar, grip etkenine yönelik araştırmaların hızlandırılmasına neden olmuştur [2].

1920'li yılların sonlarında Richard E.Shope, olası grip etkeni olarak filtre edilmiş mukus salgısından elde ettiği domuz Influenza virüsünün insana geçebileceğini göstermiş, 1933'de ise Londra'daki Ulusal Tıp Araştırma Enstitüsü'nden Wilson Smith ve Sir Patrick Laidlaw Influenza virüsünü izole etmeyi başarmışlardır [2], [3], [4], [5].

Sentetik peptid aşıları ile yapılan araştırmalarının çoğu Şap Hastalığı Virüsü [6], [7] Hepatit B, Grip Virüsü [8], Polio Virüs ve İnsan İmmün Yetersizliği virüsü (HIV) [9] gibi antiviral hastalıklar konusunda yapılmıştır. Difteri ve kolera toksinlerinin [10], [11] yanı sıra Malaria'dan korunmak için antiparazitik immünojenler [12] gibi antibakteriyel peptid aşıları da önem verilen araştırmalar arasında yer almaktadır.

Son yıllarda yapılmış araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin yüksek immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir. Örnek olarak tüberkülozun protein antijeni (PPD), H-antijeni, Salmonella, grip antijeni, menenjit mikrobunun B-polisakkariti, α -fetoprotein ile (kanser antijeni) polikasyonların komplekslerinin, serbest antijenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek immünolojik aktiviteye sahip oldukları ispatlanmıştır [13], [14], [15], [16].

Sentetik aşı tasarımı, bir protein veya polipeptid makromoleküler taşıyıcı ile bağlanmış sentetik antijenik determinant içermelidir. Adjuvant olarak hem immün sistemi stimule edebilmeli, hem de zararsız olan antijenik determinantı taklit edebilmelidir. Zayıf antijenik özellikli sentetik peptidler, molekül içi antijenik yarışı elimine edip immün cevabın genetik kontrolünü düzenleyebilen ve genetik olarak zayıf uyarıcılara karşı etkili cevap oluşturabilen moleküllerdir. Bu zayıf antijenik özellikli sentetik peptidlerin toksik olmayan sentetik polielektrolitlerle konjugasyonu immünoestimülasyon oluşturmaktadır. Adjuvantite ile oluşturulan biyokonjugatlar yüksek özgüllükte timustan bağımsız immün cevap oluştururlar [14], [15], [16], [17], [18]. Influenza virüsünden izole edilen antijenlerin polielektrolitler ile kovalent konjugasyonu ile oluşturulan Influenza virogatlarının farelerde tek bir enjeksiyon sonucunda antijenik ve immünojenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [19].

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü'ne ait antijenik özellikli dört farklı peptid dizisi; Influenza A Virüsü M2e Proteini peptid dizisi, Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisi, Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi ve dört farklı taşıyıcı (PAA, [P(VP-co-AA)], Dekstran Aldehit ve BSA) ile çalışılmıştır.

Birinci aşamada sırası ile Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizilerinin sentezi ve sonrasında bu dizilerin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca ticari olarak satın alınan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 ve M2e Proteini peptid dizilerinin karakterizasyonları yapılmıştır. Bu peptid dizilerinin farklı taşıyıcılar ile (Poliakrilik asit (PAA), Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] kopolimerleri, Dekstran Aldehit ve Bovin Serum Albumin ile) biyokonjugatlarının ve komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Biyokonjugatların ve komplekslerin oluşturulması farklı yöntemlerle; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) varlığında kovalent bağlanma ile biyokonjugatların oluşturulması, dekstran aldehit ile biyokonjugatların oluşturulması ve üçüncü olarak elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının biyoyumluluğunun incelenmesi amacıyla da MTT analizi ve Flow Sitometri yöntemi ile sitotoksik özellikleri incelenmiştir.

Floresans Rezonans Enerji Transferi yöntemi ile de intermoleküler etkileşimin sayısal verileri elde edilmiş ve teorik olarak modelleme çalışmaları ile de deneysel olarak elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, halk arasında domuz gribi olarak bilinen Influenza A Virüsü'ne ait; Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptid Dizisi : **Trp**-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg-Gly-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg
Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisi : **Trp**-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisi : **Trp**-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA 98-106 Peptid Dizisi : Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

dizili farklı peptid epitoplarını kullanarak yüksek immünojeniteye sahip sentetik aşı prototiplerinin geliştirilmesine öncülük edecek Influenza A Virüsü halk arasında da Domuz Gribi olarak bilinen hastalık için sentetik peptid polimer biyokonjugatlarının ve komplekslerinin geliştirilmesi, fizikokimyasal yapılarının incelenmesi, yapı işlev analizlerinin yapılması ve biyokonjugat oluşum mekanizmasının Floresans Enerji Transferi Yöntemiyle intermoleküler mesafe hesabı ile ispatlanması, peptid ve peptid-polimer biyokonjugatlarının minimum enerjiye sahip oldukları geometrilerini bulunması, üç boyutlu konformasyonlarını modelleme ile aydınlatılmasıdır.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında, Influenza A Virüsü'ne ait farklı peptid epitoplarının polimerlerle biyokonjugatlarının ve komplekslerinin sentezlenmesi ile elde edilen preparatlar kullanılarak, değişik zaman ve bölgelerde epidemilere ve pandemilere neden olan Influenza A Virüsü'nün neden olduğu Grip hastalığına karşı spesifik antikorların elde edilmesi, ilerleyen çalışmalarımızda gerçekleştireceğimiz hayvan deneylerinde, yüksek immün yanıtların oluşumunu sağlaması beklenmektedir.

Floresans Rezonans Enerji Transferi yöntemi ile biyokonjugat oluşumunda peptid ile polimer zinciri arasındaki mesafe hesabı ve bağlanma noktasının tespitinin yapılması, aynı polimer matriksine birden fazla hastalığın antijeninin bağlanarak multifonksiyonel biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesi için protokol oluşturacaktır.

Bu tez çalışması, tüm dünya ve ülkemiz için çok önemli olan biyonanoteknolojik malzemelerin üretilmesi, Influenza A virüsüne karşı polimerik aşılarda geliştirilmesi, tanı kitlerinin ve nanobiyosensörlerin oluşturulması için yol gösterici olacaktır. Bu nedenle sunulan bu tez çalışması, temel bilimler başta olmak üzere biyomühendislik, biyonanoteknoloji ve sağlık bilimlerini de kapsayan multidisipliner nitelikte kapsamlı bir çalışmadır.

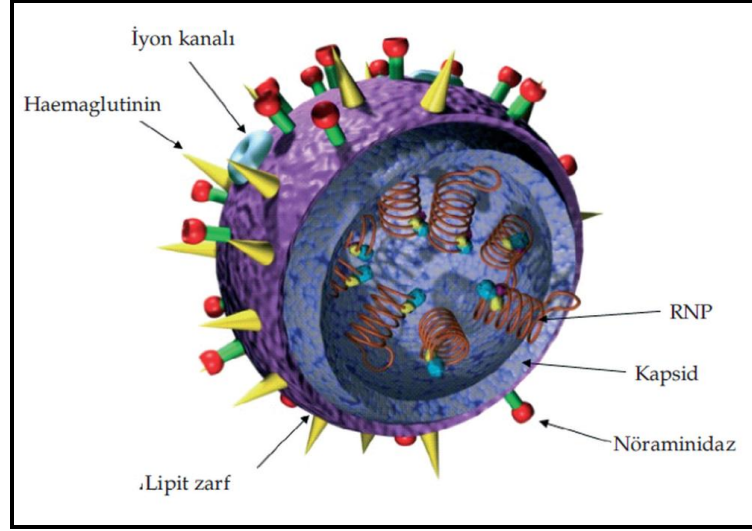
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Influenza Virüsü

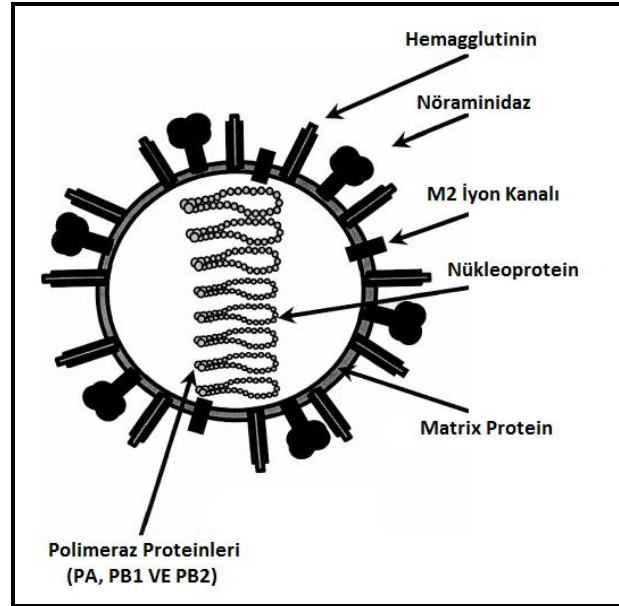
Influenza virüsleri, insanlarda tekrarlanan salgın hastalıklar ve pandemilere neden olan tek zincirli RNA virüsleridir. Bu virüsler influenza A, B, C ve Thogoto-Dhori virüs tiplerini içeren taksanmik bir grup olan Ortomiksoviridae (Orthomyxoviridae) ailesine aittir. Bu tipler genomik segmentlerinin sayısına, kodladıkları proteinlere ve insan ve hayvan patojenleri olarak önemlerine göre farklılık gösterir. Bununla birlikte, içinde viral genomik segmentlerin yer aldığı bir protein matriksi çevreleyen glikoproteinle kaplı lipid zarf gibi birçok ortak yapısal özellikler içermektedir [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31].

Influenza virüsü ortalama 100 nm çapında, sferik, filamentöz formda (-), tek sarmallı, segmentli RNA virüsüdür (Şekil 2.1). Nükleoproteinlerindeki antijenlere göre A, B ve C tiplerine ayrılır. Influenza A, B ve C virüslerinin hepsi insanlarda hastalığa sebep olabilir fakat Influenza A klinikte en önemli tiptir. Influenza B hafif klinikle seyreder. Influenza C ise daha çok afebril (ateşsiz) soğuk algınlığına benzer bulgularla seyreder [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31].



Şekil 2.1 Influenza virüsünün şematik görüntüsü [32].

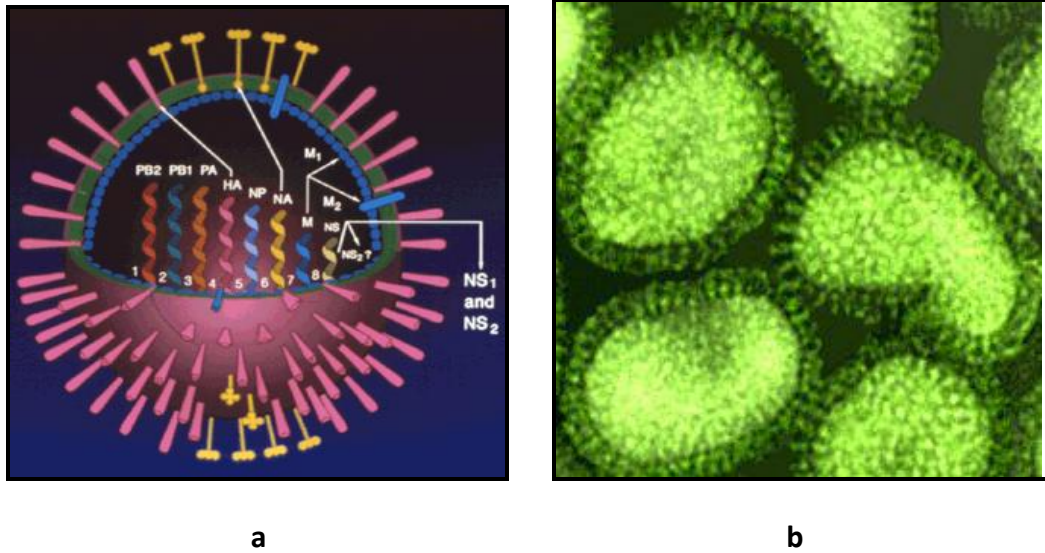
Influenza virüsünün embriyonlu yumurta veya hücre kültüründe üretilmesi ile edilen ve negatif boyayla boyanmış preparatları elektron mikroskopuyla incelendiği zaman, yaklaşık 120 nm çapında ve yuvarlak partiküller olarak görüldükleri bildirilmiştir [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31].



Şekil 2.2 Influenza virüsünün proteinlerinin şematik görüntüsü [33]

Influenza virüsünün en göze çarpan özelliği, yüzeyinden dışarıya doğru ışınal olarak dizilmiş uzantılardır (Şekil 2.2). Influenza tip A ve B virüslerinin yapısının benzer olmasına rağmen, Influenza C virüsünün yüzey glikoprotein modeli farklılık gösterir. Influenza C virüsleri, hem Hemagglutinin (HA) hem de esteraz aktivitesine sahip sadece

tek bir yüzey uzantısına (HEF) sahiptir [34]. Influenza A ve B virüslerinin yüzeyinde yer alan HA uzantısı elektron mikroskobunda yuvarlak biçimde, Nöraminidaz (NA) uzantısı ise mantar biçiminde görülür. HA ve NA glikoproteinleri konak hücre plazma membranından oluşmuş lipid bir zarfa, hidrofobik aminoasitlerin kısa dizileri ile bağlıdır. Lipid zarf içinde, yapısal fonksiyonda rol oynadığı düşünülen M proteini bulunmaktadır. M2 proteini Influenza A ve C viruslarında az miktarda bulunur, Influenza B virusunda ise hiç bulunmaz. Matriks iskeleti içinde RNA replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumlu üç büyük polimeraz proteini [bazik protein 1 (PB1), bazik protein 2 (PB2) ve asidik protein (PA)] ve nükleokapsid protein ile ilişkili olan sekiz tek zincirli, negatif polariteli RNA molekülü bulunmaktadır. Virüs tarafından sentezlenen yapısal olmayan 1 ve 2 proteinleri (*non-structural, NS1 ve NS2*), virüsle infekte hücrelerde bulunur [2], [5], [35].



Şekil 2.3(a) Influenza virüsünün yapısal şekli, (b) Influenza virüsünün elektron mikroskobundaki görüntüsü [2], [5].

2.1.1 Viral Genler ve Proteinler

Influenza A virüsünün viral genleri vRNA'lar olarak bilinen sekiz tek zincirli RNA'lar yoluyla şifrelenir. vRNA'lar her zaman proteinle kaplı RNA'da başlıca viral nükleoproteinde (NP) ribonükleoprotein kompleksleri (RNP) olarak bulunur. Influenza virüsünün her segmenti bir ya da birden fazla proteini kodlar (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Influenza virüs proteinleri ve işlevleri [33].

Segment	Kodlanan Proteinler	İşlev	Medikal Önem
1	PB2	Polimeraz altbirimi, konak hücre mRNA kapsülünü bağlar, endonükleaz	
2	PB1	Polimeraz altbirimi, RNA uzaması	
3	PA	Polimeraz altbirimi	
4	HA	Hücre-yüzey proteinini bağlar, füzyon proteini	Nötralize edici epitoplara sahip olma
5	NP	RNA bağlama proteini, replikasyonda görevli	
6	NA	Nöraminidaz, virüs salınımını teşvik eder	Nöraminidaz inhibitörlerinin hedefi
7	M1 M2	Viral matriksi oluşturur, çekirdeğin içinde ve dışında RNP trafiğini düzenler İyon kanalı	Amantadin ve rimantadinin hedefi
8	NS1 NEP(NS2)	İnterferon antagonisti, viral gen ekspresyonunda muhtemel rol Çekirdek export faktörü	Virüsü interferonların etkisinden korur

Proteinlerin varyasyonu ve korunumun rölatif derecesi A, B veya C virüs tipleri içerisinde farklı viral suşlarının tanımlanmasında ve reseptörü A, B ve C tiplerini birinden diğerine farklılaştırmak için kullanılmaktadır. A, B ya da C tipleri içerisinde, ayrı suşlar yüzey glikoproteinlerinin antijenik karakteristikleri yoluyla farklılaştırılmaktadır. A, B ya da C tiplerine ayrılma, viral internal antijenler için serumun çapraz

reaktivitesine dayanmaktadır. Influenza A virüsü için serolojik çalışmalardan hemagglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) olarak adlandırılan zarf glikoproteinleri olduğu bilinmektedir. 16 belirgin HA antijenik tipi ve 9 belirgin NA antijenik tipi tanımlanmıştır. HA, virüsün hücreye bağlanmasında rol alırken, NA ise mûsin tabakayı uzaklaştırarak bu bağlanmayı kolaylaştırır. Bunların sadece H1, H2 ve H3 HA tipleri ve sadece N1 ve N2 NA tipleri yirminci yüzyılda insanlarda dolaşım göstermiştir. Kalan HA ve NA tipleri hayvan virüslerinde, başlıca kuş virüslerinde bulunmuştur. Influenza A ve C virüslerinin her biri yüzey glikoproteinleri için sadece bir antijenik tip sergilemesine karşın farklı suşlar antijenik varyasyon sergiler [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31], [36].

Influenza virüsü birçok canlı çeşitlerinde hastalık yapabilmektedir. Influenza A virüsünün önemli bir özelliği de farklı türlere özgü alt grupların, birbirinden genetik materyal alışverişine açık ve farklı bir virüsün oluşmasına son derece elverişli olmasıdır. Oluşan yeni virüs, insana özgü bir Influenza virüsünden gen alırsa, insandan insana bulaşma özelliği de kazanabilir.

Memeli ve kuş virüsleri için özgül hücre reseptörlerinin bir arada olduğu gösterilmiş olan domuzlar ve insanlar, kuş virüslerine maruz kalmakla yepyeni bir alt tipin ortaya çıkmasına yol açabilirler. Bu şekilde değişime uğrayan virüs yeni pandemi ve epidemilere yol açabilmektedir. Antijenik değişim en sık Influenza A, az miktarda Influenza B’de olur. Influenza C’de ise değişim olmaz. Bu değişimler antijenik “drift” (minor değişiklik) ve antijenik shift (major değişiklik) başlıkları ile ele alınır.

2.1.2 Ekoloji

Influenza A virüsü, Hemagglutinin (HA) ve Nöraminidaz (NA) moleküllerinin antijenik özellikleri esas alınarak alttiplere ayrılmış ve sınıflandırılmıştır. Günümüzde 2004 yılında saptanan HA alttipi ile birlikte, toplam 16 HA ve 9 NA alttipi tanımlanmıştır [34], [35].

Çizelge 2.2 Influenza A Virüsünün Hemagglutinin ve Nöraminidaz alttıpleri [33]

Alttip	İlk Bulunduğu Tür			
	İnsan	Domuz	At	Kuş
Hemagglutinin				
H1 ^b	PR/8/34	Sw/la/15/30	—	Dk/Alb/35/76
H2	Sing/1/57	—	—	Dk/Ger/1215/73
H3	HK/1/68	Sw/Taiwan/70	Eq/Miami/1/63	Dk/Ukr/1/63
H4	—	—	—	Dk/Cz/56
H5	—	—	—	Tern/S.A./61
H6	—	—	—	Ty/Mass/3740/65
H7	—	—	Eq/Prague/1/56	FPV/Dutch/27
H8	—	—	—	Ty/Ont/6118/68
H9	—	—	—	Ty/Wis/1/66
H10	—	—	—	Ck/Ger/N/49
H11	—	—	—	Dk/Eng/56
H12	—	—	—	Dk/Alb/60/76
H13	—	—	—	Gull/MD/704/77
H14	—	—	—	Dk/Gurjev/263/82
H15	—	—	—	Dk/Austral/341/83
Nöraminidaz				
N1	PR/8/34	Sw/la/15/30	—	Ck/Scot/59
N2	Sing/1/57	Sw/Taiwan/70	—	Ty/Mass/3740/65
N3	—	—	—	Tern/S.A./61
N4	—	—	—	Ty/Ont/6118/68
N5	—	—	—	Sh/Austral/1/72
N6	—	—	—	Dk/Cz/56
N7	—	—	Eq/Prague/1/56	FPV/Dutch/27
N8	—	—	Eq/Miami/1/63	Dk/Ukr/1/63
N9	—	—	—	Dk/Mem/546/74

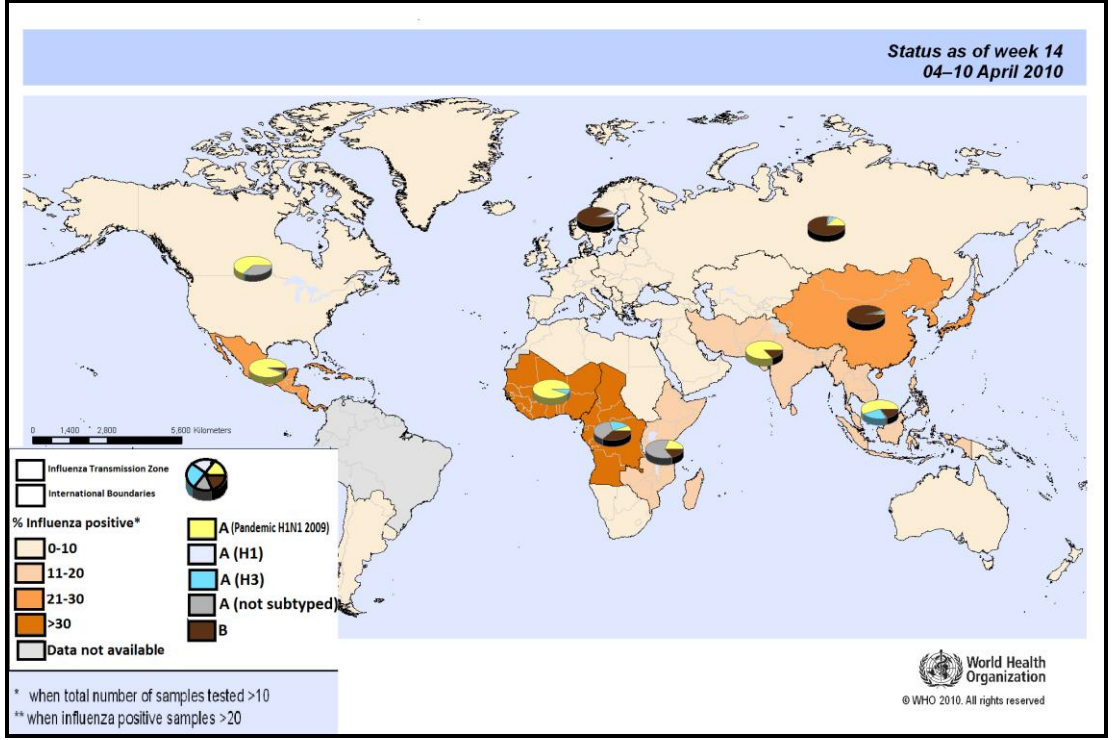
2.1.3 Epidemiyoloji

2.1.3.1 Zamana Ait Özellikler

Bazı bölgelerde her mevsim görülmekle beraber, genellikle mevsimsel değişim söz konusudur. Hava­ların soğuduğu ve nem miktarının düştüğü dönemlerde hastalık görülmeye sıklığı artmaktadır. Hastalık toplumda genellikle sonbahar mevsiminin sonlarında başlayıp ilkbahar aylarına kadar sık olarak görülmektedir. Hastalığın zamana göre değişim göstermesinde çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Kalabalık ve havalandırmanın iyi olmadığı kapalı alanların kullanımının daha çok hava­ların soğuduğu dönemlerde olması, hastalığın mevsimsel olma özelliğine etki yapan önemli çevresel etkenlerdendir.

2.1.3.2 Yer özellikleri

Düzensiz aralıklarla meydana gelen ve özellikle duyarlı kişilerin ölümüne yol açan epidemilerin, öncelikli olarak Asya'dan yayıldığı düşünülmektedir. Tüm dünyada görülmektedir.



Şekil 2.4Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 2010 yılı Influenza Virüsü gözlemlenen bölgeler

Şekil 2.4'den de görüldüğü üzere, Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 2010 yılında ülkemiz tüm dünyada % 0-10'luk dilime girmektedir.

2.1.3.3 Kişi özellikleri

Her yaşta görülebilen Influenza enfeksiyonları, bebek ve çocuklar ile yaşlılarda daha öldürücü seyretmektedir. Ayrıca kişilerin kronik hastalıklarının olması (kronik akciğer hastalıkları, romatizmal ve koroner kalp hastalıkları, diabetes mellitus, kronik nefrit, Parkinson, multipl skleroz gibi nörolojik hastalıklar, maligniteler, anemi) sigara kullanımı ve gebelik Influenza enfeksiyonu için hastaneye yatış ve ölüm olaylarında risk faktörleri arasındadır.

2.1.3.4 Konakçı Seçimi

Influenza virüsleri çok geniş bir yelpazede birçok canlı türünde hastalık yapabilir. Virüs insanlardan başka domuz, kuş, at ve deniz memelilerinde hastalık yapmaktadır. Aşağıda çeşitli canlılarda görülen virüslerin cinsleri belirtilmektedir.

İnsanlar: H1, H2, H3 ve N1, N2

Domuzlar: H1, H3 ve N1, N2

Atlar: H3, H7

Deniz memelileri: H1, H3, H4, H7, H13

Sansargiller: H10

Kuşlar: H1-H16 ve N1-9.

Görüldüğü gibi kuşlar bütün Influenza tiplerini taşımakta veya bunlarla hasta olmaktadır.

2.1.3.5 Bulaşma özellikleri

Influenza virüsü, en sık öksürme ve hapşırma ile ortama saçılan damlacıklar yoluyla insandan insana bulaşır. Nadiren kontamine el ve diğer nesneler bulaşmada rol alır. Influenza virüsünün enfektivitesi etkenin tipine göre değişmektedir. Buna bağlı olarak da toplumda yayılma hızı farklılık gösterebilmektedir. Hastalığa özel atak hızı erişkin kişilerle karşılaştırıldığında, çocuklarda daha yüksektir. Okul öncesi ve okul çağı çocuklarda atak hızının yüksek olması, hastalığın toplumda yayılmasında önemli faktörlerden biridir [2], [33], [36].

Hastalığın bulaştırıcı olduğu dönem, semptomların başlamasından önceki 24 saat ve sonraki beş günlük dönemdir. Hastalığın kuluçka dönemi 1–4 gündür.

Hastalık sporadik vakalar, bölgesel epidemiler veya pandemiler şeklinde görülmektedir. Bu nedenle hastalığın özelliklerinin ve etkilerinin “pandemi dönemleri” ve “pandemi dönemleri dışında” incelenmesi yarar sağlamaktadır [2], [33], [36].

Bir toplumda lokalize olarak meydana gelen epidemiler birden başlamaları, iki-üç hafta içinde pik yapmaları ve toplam 5-8 hafta sürmeleriyle karakterizedirler [33].

Pandemik grip birkaç kıtada görülür ve yaş gruplarının çoğunu etkiler. Uzmanlar geçen yüzyılda, üç gerçek grip pandemisi olduğu konusunda hem fikirdirler; 1918 İspanya gribi (A/H1N1), 1957 Asya gribi (A/H2N2) ve 1968 Hong Kong gribi (A/H3N2) [33], [37].

Influenza virüsleri solunum yolu virüsleri arasında, önemli derecede antijenik varyasyon gösteren tek virüstür. Bu değişimler epidemi ve pandemilere yol açmaktadır.

Influenza virüsünün her iki yüzey antijeni de, “drift” ve “shift” denilen iki tip antijenik varyasyona uğrar [2], [34], [36].

2.1.4 Antijenik “Drift”

Daha çok Hemagglutinin ve kısmen de Nöraminidazda nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkan minor değişikliklerdir. Yeni suşlar ortaya çıkar ve sonuçta “drift” ile ortalama her üç yılda bir olan yeni epidemilere yol açabilir [32].

2.1.5 Antijenik “Shift”

Bir konağı enfekte eden farklı virüsler arasında bir veya daha fazla yeni RNA segmentinin yeniden yapılanmasıyla oluşur. Rekombinasyon sonucu virüste yeni bir yüzey glikoproteini ortaya çıkmaktadır. Yeni bir H ve N içeren bir virüs alt tipi sentezlenir. “Shift” ile 10-40 yılda bir olabilen pandemilere, insanları etkileyen yeni suşların oluşmasına ve önceki yıla ait suşlarla yapılan aşının etkisiz kalmasına neden olurlar.

Tarihsel olarak incelendiğinde 20. yüzyılda 9-39 yıl arayla antijen kayması sonucu ortaya çıkan yeni virüs alt tiplerine bağlı dört veya beş büyük grip salgını olmuştur.

1918-1919 yıllarındaki H1N1 pandemisinin 20-40 milyon kişinin ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ardından 1957-1958 (H2N2), 1968-1969 (H3N2) pandemileri olmuş ve 1977-1978 döneminde (H1N1) tekrar dolaşıma başlamıştır. Halen dünya üzerinde H3N2 ve H1N1 virüsleri birlikte dolaşmaktadır. Bundan sonra da yeni pandemilerin olması kaçınılmaz gibi görünmektedir [32].

Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirtilen bilgiler doğrultusunda, 1. ve 2. evre pandemiler arası dönem, 3. ve 5. evre arası ise pandemi alarmı dönemi, 6. evre ise pandemi dönemi olarak tanımlanmaktadır.

Çizelge 2.3Dünya Sağlık Örgütü Pandemi Alarm Düzeyleri

1.Evre	İnsanlarda yeni influenza virüs alt tipleri saptanmamış olmakla birlikte, hayvanlarda bir insan enfeksiyonuna neden olmuş bir influenza virüsü alt-tipi olabilir. Enfeksiyon hayvanlarda mevcutsa, insan enfeksiyonu ya da hastalığı riski düşük kabul edilmelidir. ^a
2.Evre	İnsanlarda yeni influenza virüs alt-tipleri saptanmış ve dolaşımda bir hayvan influenza virüsü alttipi de mevcuttur. İnsan hastalığı için önemli bir risk söz konusudur. ^b
3.Evre	İnsanlarda yeni influenza virüs alt-tipi ile enfeksiyon(lar) olmakla birlikte, insandan insana yayılım yok veya ancak yakın temasa bağlı nadir yayılım vakaları söz konusudur. ^b
4.Evre	İnsandan insana kısıtlı bulaşma olan küçük küme(ler) olmakla birlikte, yayılımın oldukça lokalize olması virüsün insanlara tam adapte olamadığını düşündürmektedir. ^b
5.Evre	İnsandan insana bulaşma olan büyük küme(ler) mevcut. Ancak insandan insana yayılım hâlâ lokalize olduğundan, bu durum virüsün insanlara giderek artan ölçüde adapte olduğunu, ancak henüz tam bulaşıcı olmadığını düşündürmektedir. ^b (önemli pandemi riski)
6. Evre - Pandemi Dönemi	Pandemi: Genel toplumda artmış ve devam eden bulaşma. vardır. ^b

^aEvre 1 ile Evre 2 arasındaki ayırım, hayvanlar arasında görülen suşlardan kaynaklanan insan enfeksiyonu ya da hastalığı riskine dayanmaktadır. Bu etkenlerin arasında hayvan ve insanlarda patojenite, evcil hayvanlarda ve çiftlik hayvanlarında ya da sadece vahşi hayatta görülmesi, virüsün enzootik ya da epizootik olması, coğrafi olarak lokalize ya da yaygın olması ve/veya diğer bilimsel parametreler yer almaktadır.

^bEvre 3, Evre 4 ve Evre 5 arasındaki ayırım, bir pandemi riskinin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Çeşitli etkenler ve bunların güncel bilimsel bilgiler uyarınca göreceli olarak önemleri dikkate alınmaktadır. Bu etkenler arasında bulaşma oranı, coğrafi konum ve yayılım, hastalığın şiddeti, insan suşlarından gelen genlerin varlığı (bir hayvan suşundan türemişse) ve/veya diğer bilimsel parametreler yer almaktadır.

2.1.6 Hastalık Tanısı

2.1.6.1 Klinik Belirti Ve Bulgular

Üşüme, titreme ile yükselen ateş, öksürük, boğazda yanma ve ağrı, halsizlik, iştahsızlık, burun tıkanıklığı ve akıntısı, baş ağrısı ve kas ağrısı hastaların çoğunda görülen semptomlardır. Ateş genellikle 3 gün sürer. Genel grip bulguları 3-7 günde düzeldikten sonra öksürük ve kas ağrısı 2 hafta sürebilir.

En sık görülen komplikasyonlar akciğerle ilgili olanlardır;

- Primer viral pnömoni
- Sekonder bakteriyel pnömoni görülebilir.

Akciğer dışı komplikasyonları ise;

- Miyozit
- Miyokardit
- Perikardit
- Ensefalit
- Nadiren Guillain-Barre sendromudur.

2.1.6.2 Tanı

Influenza testleri için uygun örnekler nazofarengiyal veya boğaz sürüntüsü, burun yıkama suyu, burun veya bronş aspiratı ve balgamdır. Örnekler hastalığın ilk dört gününde alınmalıdır.

- Virüs izolasyonu

Salgın dönemlerinde etken suşun izolasyonu ve subtip tayini için kültür gereklidir.

Zaman ve emek gerektiren bir yöntemdir. Örnekler transport besisi yerinde hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

- Viral antijenlerin tayini

Antijen tayini hızlı tanı testleriyle yapılabilmektedir. Bu testlerin duyarlılığı %70'in üzerindedir. Özellikle salgın dönemlerinde hızlı tanı amacıyla kullanılan testlerdir.

Nazofarengiyal yıkama ve sürüntü örneklerinde yöntemin duyarlılığı diğer örneklerden daha yüksektir.

- Moleküler tanı

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile örneklerde viral RNA aranabilir. Tanı testleri hakkında diğer bilgiler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Çizelge 2.4 İnfluenza Tanı Testleri [36]

Yöntem	Saptanabilen influenza tipleri	Uygun örnekler	Tanı koymak için geçen süre
Viral kültür	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu, burun aspiratı, balgam	5-10 gün
Hızlı testler	A ve B ^a	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun yıkama suyu, burun aspiratı, balgam ^b	<30 dakika
EIA	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu	2 saat
PCR	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu, burun aspiratı, balgam	1-2 gün

2.2 Aşılar

Organizmaya uygun yolla verildiğinde hümmoral veya hüccresel immün yanıt (veya her ikisini de birden) oluşturarak, canlının enfeksiyon hastalıklarından korunmasını sağlayan antijenik yapıllı maddelere aşı denir.

^a Bazı testlerde tip tayini yapılamaz.

^b Kullanılan teste göre alınacak örnekler değışebilir.

Aşı ile enfeksiyonlardan korunma hem kişi, hem de toplum açısından en kolay, en basit ve de en ucuz yöntemdir.

Aşılar, insanları hastalıklardan ve onun kötü sonuçlarından koruyabilmesi için sağlam ve risk altındakilere uygulanmaktadır. Aşıların tedavi edici özelliği yoktur. Yani herhangi bir hastalık oluştuktan sonra hasta kişiye aşı yapmanın yararı olmamaktadır. Aşılar, ağız yoluyla, adale içerisine, cilt altına veya cilt içine verilmek suretiyle uygulanabilirler. Uygulama yöntemi farketmeksizin, aşılar vücudumuzu hastalıklara karşı koruyan antikorları oluştururlar.

Aşılar cinsine göre ağız yoluyla alınır yada enjekte edilirler. Hangi yoldan yapılırsa yapılsın, aşı vücudun savunma mekanizmasını harekete geçirerek vücudu hastalıktan karşı korur [38].

2.2.1 Aşı Türleri

2.2.1.1 Cansız (Ölü) Mikrop Aşıları

Çesitli yöntemlerle öldürülmüş bakteriler ile inaktive edilmiş virüs aşılarıdır. Bakteri veya virüsler laboratuvarlarda üretildikten sonra 1 cm³ sıvıda belirli sayıda mikrop olacak şekilde sulandırılarak ısı, formaldehit, fenol, aseton, ultraviyole gibi etki veya maddelerle öldürülürler. Bu öldürülme veya inaktivasyon işleminde genellikle mikrop bütünlüğü ve antijenik yapı bozulmaz.

Cansız mikrop aşıları genel olarak ilk verilişten 4 gün sonra antikor oluşturmaya başlarlar. Ancak ilk uygulamada oluşan antikorlar koruyucu düzeyde değildirler. Bu nedenle 2. kez ve 3. kez, hatta bazen daha çok sayıda aşılama ile bağışıklık düzeyini arttırmak gerekir. Cansız mikrop aşılarının koruyuculuk süresi diğer aşılardan daha kısadır [39].

Aşağıda cansız mikrop aşılarına birkaç örnek verilmiştir.

- Ölü bakteri aşıları : Tifo, paratifo, kolera, boğmaca, veba, salgın tifus aşıları
- İnaktive virüs aşıları : Çocuk felci (Salk tipi), kuduz, influenza (Grip) aşıları gibi [40].

2.2.1.2 Canlı (Atenue) Mikrop Aşıları

Antijenik niteliği bozulmadan, hastalandırıcılık özelliği (virölansı) ortadan kaldırılan veya virölansı yavaşlatılan mikroplardan hazırlanan aşılardır. Atenue aşılar organizmaya çeşitli yollarla verilebilirler. Bu tip aşılar organizmada, sessiz veya çok hafif seyirli bir enfeksiyon oluşturarak doğal enfeksiyona benzer nitelikte bir bağışıklık oluştururlar. Aşı hastalığı da denen bu enfeksiyon bazı aşılar da açıkça görülebildiği halde (BCG aşısında), bazı aşılar da hafif bir hastalık (kızamıkçık aşısında), bazılarında ise tamamen belirtisiz (çocuk felci aşısında) seyir gösterir. Canlı mikrop aşıları daha çok hücresel bağışık yanıt oluştururlar ve koruyuculuk süreleri de daha uzundur. Özellikle bazı atenue virüs aşılarla (örn. kızamık, kızamıkçık, kabakulak gibi) tek bir doz ile ömür boyu bağışıklık sağlayabilirler. Bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

- Canlı (atenue) bakteri aşıları: BCG Verem Aşısı
- Canlı (atenue) virüs aşıları: Sabin tipi çocuk felci aşısı, Sarı ateş, kızamık, kızamıkçık, kabakulak [39], [40], [41].

2.2.1.3 Mikrop Ürünlerinden Hazırlanan Aşılar

Toksoid (Anatoksin) Aşılar: Difteri ve tetanoz gibi bakteri toksinleriyle meydana gelen hastalıklardan korunmada kullanılan aşılardır. Saf olarak elde edilen bakteri toksinin daha sonra ısı veya formol ile muamele edilerek (% 0.3 - 0.4 oranında formol eklenerek 37 °C'de 3-4 hafta bekletilir) zehir etkisi giderilir bu şekilde antijen yapısı bozulmadan hazırlanan toksoid (anatoksin) ler aşı olarak kullanılır. Toksoid aşılar daha çok humoral immün yanıt oluşturarak koruma sağlarlar.

Mikropların Belirli Bir Kısımından Hazırlanan Aşılar: Bazı enfeksiyon hastalıklarında, etken mikrobun belirli bir parçasından (örneğin HBs Ag partikülleri, N. meningitidis'in hücre duvar polisakkariti gibi) hazırlanan aşıların daha iyi koruyucu etki yaptığı araştırmalarla gösterilmektedir [40].

2.2.1.4 Biyoteknolojik Aşılar

Biyoteknolojik aşılar, aşılama esnasında bazı sorunların yaşandığı hastalıklarda, daha etkili ve yan etkilerinin daha az olduğu aşıların elde edilmesi için kullanılan yeni ve

moleküler biyoteknolojik yöntemlerle hazırlanan aşılardır. Bu tekniklerle hazırlanan aşılar aşağıdaki gibidir [40].

Rekombinant DNA Aşıları: Bu teknikle mikropların bağışıklıkta etkili olan proteinlerini kodlayan genleri ayırılır ve bu genler bir taşıyıcı hücreye aktararak, orada bol miktarda sentezlettirilirler. Örneğin Hepatit B virüsünün yüzey antijenini (HBsAg) kodlayan gen bir maya hücresine aktararak çokca elde edilir ve aşı olarak kullanılır (Rekombinant HBV aşısı).

Rekombinant DNA tekniğinin bir başka uygulaması, elde edilen "aşı geni"nin taşıyıcı bir virüse (örneğin herpes virüsüne) rekombine edilmesidir [40].

Mutant Aşılar Canlı mikrop aşıları hazırlanırken uygulanan eski virülans azaltma yöntemleri yerine, biyoteknoloji ile patojen mikroplardaki virülans genleri yok edilerek "avirulan mutant" suşlar ile atenué aşılar hazırlanabilmektedir. Örneğin V.cholerae bakterisinde toksini kodlayan genin yok edilmesi gibi.

Anti İdiotip Aşılar Antikorlar aracılığı ile gerçekleştirilen yeni bir aşı tekniğidir.

Reasortan Aşılar Influenza A ve Rota virüs gibi virüslerin genetik materyallerini komşu virüslerle değiştirerek soğukta üreyip vücut ısısında çoğalamama yeteneği kazandırma esasına dayanır. Bu tür aşılar, hazırlanan suşun tekrar vücut ısısında üreme yeteneği kazanabilme olasılığı en büyük dezavantajdır.

Konjuge Polisakkarid Aşılar Bazı patojenik bakterilerin virülansı hidrofilik polisakkarid kapsüllerinin antifagositik özelliklerine dayanır. Kapsülün antikor ile kaplanması makrofajların ve nötröfillerin o patojeni tanıyıp fagosite etmelerini kolaylaştırır. Polisakkarid aşıların dezavantajı T hücrelerini uyaramamalarıdır. B hücrelerini T-bağımsız olarak uyarırlar ve IgM yapımı gerçekleşir. Hafıza hücresi oluşmaz.

Polisakkarid antijenler zayıf immünojenik özellik gösteren haptentlerdir. Bir protein taşıyıcısı ile bağlanarak haptentin immünojenitesi artırılır. Polisakkarid-protein konjugatının T hücreleri aktive etmesi sonucunda immünoglobulin dönüşümü meydana gelir. Bu aşılar karşı IgG sınıfı antikorlar oluşur. İmmün hafıza oluşur. Yeni doğan süt çocukları dahil olmak üzere hastalığa karşı korunma sağlanır. Pnömonokok ve meningokok konjuge aşılar örnek verilebilir [39], [42], [43], [44], [45].

Sentetik Peptid Aşıları Bağışıklıkta etkili olan proteinlerin aminoasit dizileri laboratuvar koşullarında sentetik olarak sentezlenerek antijen olarak kullanılabilir. Çeşitli peptidler içerisinde belli bir tanesinin seçilmesi avantajdır. Peptidlerin saflaştırılması daha kolaydır. Küçük molekül ağırlıklı olduklarından immünojen özellikleri azdır. Bu nedenle taşıyıcı protein veya adjuvant kullanımına gerek duyulabilir. Günümüzde hayvan deneylerinde başarılı sonuçlara ulaşılmış peptid aşıları vardır.

2.3 Polielektrolit Komplekslerin İmmünolojik Uygulamalarda Kullanılması

Antijenlerin immünojenik özelliklerini arttırmak için adjuvant kullanılması gerekir. Geleneksel Freund's yağ adjuvantlarının kullanılması, yüksek viskoziteleri, enjeksiyon yapıldıkları bölgedeki yerel reaksiyonları ve formülasyonlarındaki düşük stabiliteleri nedeniyle bir takım dezavantajlara sahiptir. Daha yeni lipozom içeren birtakım adjuvantlar, immün-uyarıcı kompleksler ve "lipocore"lardır. Bu adjuvantlar suda çözünmezler ve düşük stabiliteye sahiptirler ve antijenlerin immünojen özelliklerini düzenlemek için yapısal özellik bilgisi kesin ifade edilemez. Sentetik peptidlerden veya haptenlerden immün cevap sağlamak için, onları taşıyıcı proteine bağlamak gerekir.

Sentetik polimerin "immünomodulator" özelliği; yeni nesil bileşiklerinin geliştirilmesi, yapay antijenler ve immün özellikte moleküllerin oluşturulması için yeni prensiplerin geliştirilmesine olanak sağlar. Polielektrolitler, timusa bağımlı antijenlere karşı antikor oluşumunda yardımcı T hücrelerinin çalışmasında görev alır. Polielektrolitlerin mikrobiyal ve virüs antijenleri için taşıyıcı olarak kullanılması, sadece organizmanın immün cevap özelliğini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda immün koruyucu etkinliğini de sağlar [16].

Polielektrolitlerin (PE) biyolojik etkilerinin temeli, hücreler ve proteinler gibi biyosistem bileşenleri ile kooperatif etkileşimde bulunmalarına dayanmaktadır.

Mustafaev ve arkadaşları, 1970'li yılların başlarında kimyacı ve immünologların ortak çalışması olarak, bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlemiştir. PE'lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve hayvanlar bu komplekslerle 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 tasarımı fikrini ortaya çıkartmıştır [15].

Yüksüz ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinil pirilidon, polietilen glikol) eritrositlerin komplekslerinin immün cevapta artış sağlayamadığı yani bu tür yapılı polimerlerin adjuvant (yardımcı) özelliği taşımadığı bilgisinin 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 (immün sistemi uyaran) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır [46], [47], [48], [49], [50], [51], [52], [53] [54] [55], [56], [57].

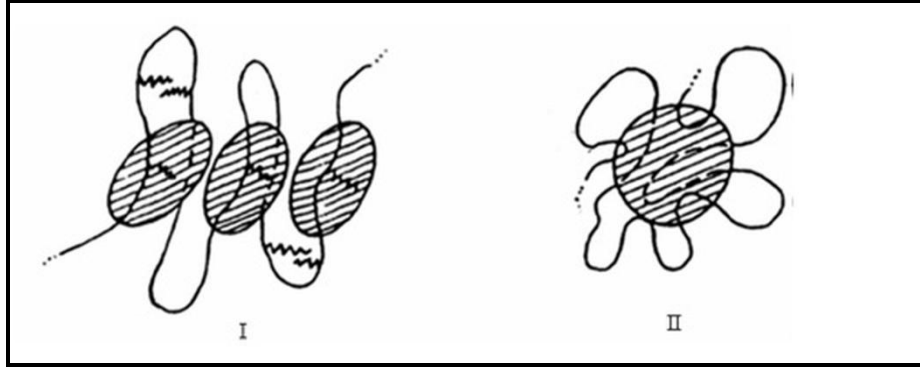
Neden adjuvant olarak polielektrolitler sorusunun cevabını şöyle sıralayabiliriz;

- Sentezlenmesi ve modifikasyonu daha kolaydır,
- İstenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür,
- Suda iyi çözünür ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilir,
- Toksik değildir,
- Biyobozunur özelliktedirler.

Polielektrolitlerin tüm bu özellikleri, geleneksel adjuvantlara kıyasla pratik olarak medikal ve veterinerlikle ilgili uygulamalarda büyük üstünlük sağlamaktadır [15], [16].

2.4 İmmünojen Özellikteki Polielektrolit Komplekslerin Çalışma Prensipi

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdırlar. Şekil 2.5'de immünolojik aktif (veya "pasif") polielektrolit kompleksleri için model görülmektedir.



Şekil 2.5Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı.

Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz;

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktalı elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.
- 2) Stokiyometrik yapılmayan polielektrolit kompleksler antijenin birkaç epitopunu içermelidir.
- 3) Yapısında “ilmik” olan polielektrolit kompleksler (polimerin bükülebilen serbest bölümlerinin olması) hem protein yüzeyine yapışmış hem de serbest “ilmik”te bulunan ilave olarak iyonlanmış grupları, polielektrolit kompleks yüzeyinde kompleks partiküllerinin çözeltide kalmasına yardım eden yayılmış hidrofil bölge yaratır.
- 4) Antijen moleküllerinden toplanmış ve polimer taşıyıcısı ile stabilleşmiş sert silindir (çubuk) tipli yapı; hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de büyük yüzey oluşmasını sağlar.
- 5) Polielektrolit kompleksler biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler v.b.) çok noktalı kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyeti; yapısında olan “ilmik”lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleksler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşturma 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 gereklidir. Bu nedenle polivalent aşilar yapmak için polielektrolit kompleksinin mekanik karışımı daha önemlidir [13], [14], [15], [16].

2.5 Peptid Polielektrolit Kompleksleri

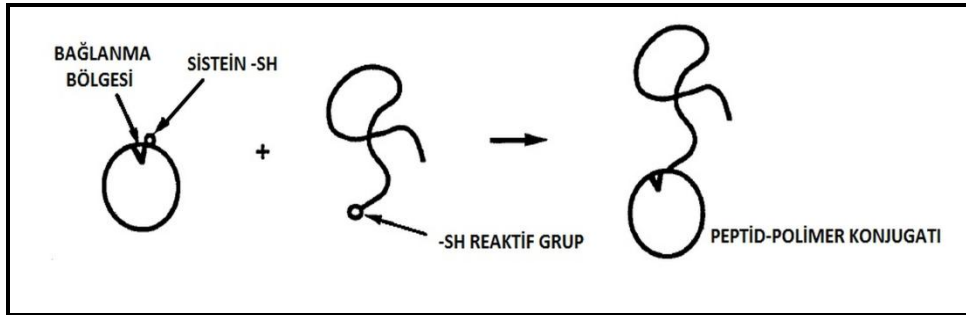
Zayıf immünojenik özellikteki sentetik peptidler, antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip değillerdir. Peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidler, proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilikasid (PAA), Poli-N-isopropilakrilamid (NIPAA), Poli-N-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilikasid (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar [58].

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 (-NH₂) 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, biyoyumlu ve spesifik olmayışı ya da sistemik 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;

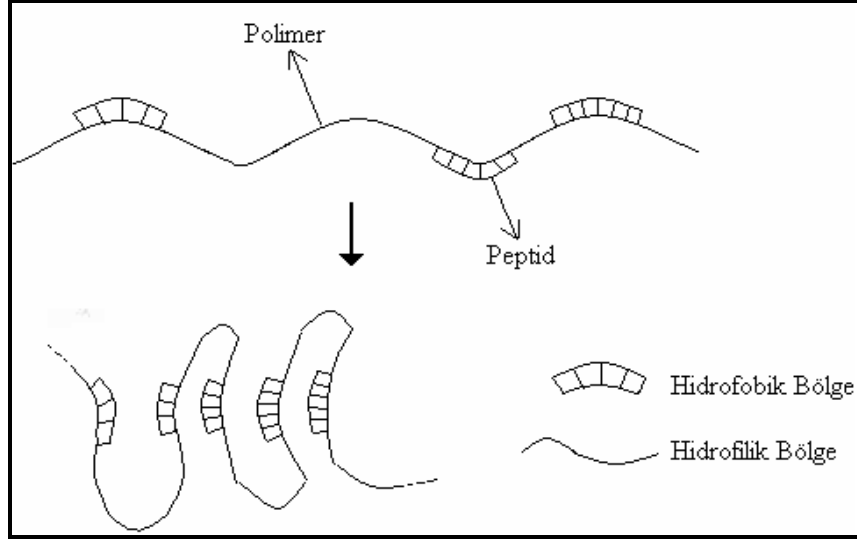
- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte olanların suda çözünebilirliğini arttırmak,
- Bölgesel etkilerini yükseltmek,
- İmmünojenik etkilerini ve immünoreaktivliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır [59].

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, immünojenik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımıdır [15].

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-açilisoüre 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 2.6Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi [60].

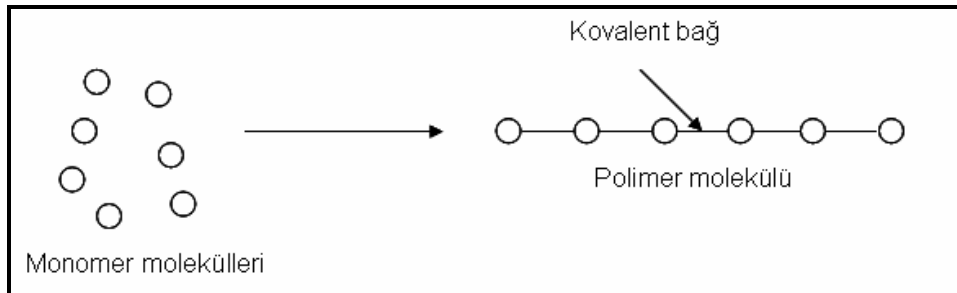


Şekil 2.7 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [15], [16].

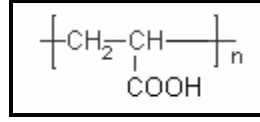
Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla, karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen biyokonjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Biyokonjugatların yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir[16]. Mustafaev ve arkadaşları bu doğrultuda yaptığı bir başka çalışmada, polielektrolitlerin sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yeni nesil aşı bileşenleri olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir [59].

2.6 Polimerler

Polimerler çok sayıda monomerin (alt birimin) kovalent bağlar ile bağlanarak meydana getirdikleri makromoleküllerdir. Özellikleri, kendisini oluşturan monomerlerden farklıdır.



Şekil 2.8 Polimer molekülünün monomer birimlerinin kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşumu.

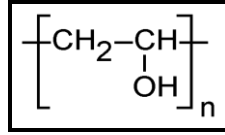


Şekil 2.9Poliakrilik asit.

Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polimerlere homopolielektrolit, hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküllere ise poliamfolit denir. Doğada bol miktarda bulunan protein yapılı poliamfolitlerin yanı sıra sentetik yollarla üretilen poliamfolitler de mevcuttur. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında, molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir.

2.6.1 Nötral Polimerler

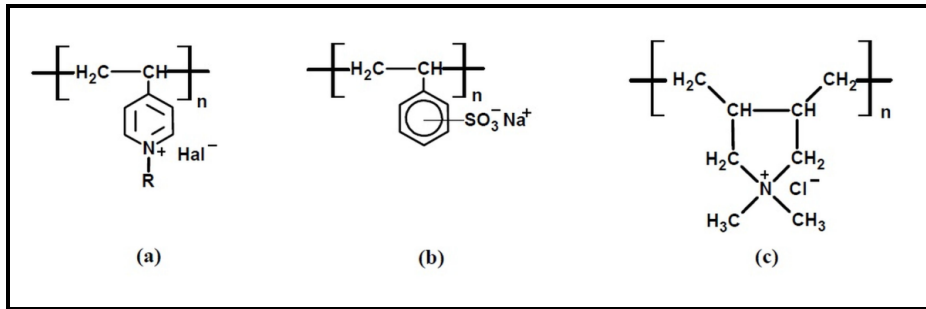
Suda çözünebilen polimerlerdir. Yapılarında (+) veya (-) yük bulundurmazlar.



Şekil 2.10Polivinil alkol

2.6.2 Polielektrolitler

Kovalent bağlı anyonik veya katyonik gruplarla bu gruplara bağlı zıt iyonlar içeren polimer sistemlerine polielektrolit denir (Şekil 2.11)[61]. Polielektrolitler ortamın pH'ına bağlı olarak "artı" veya "eksi" yüklü hale getirilebilir. Ortamın pH'ına göre bu polielektrolitler amaca uygun olarak metal iyonları ile iyon koordinasyon bağıyla yada çeşitli makromoleküllerle elektrostatik etkileşimle bağlanıp suda çözünen yada çözünmeyen polikomplekslerin oluşumunu sağlarlar.



Şekil 2.11(a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c)poli(diallildimetilamonyum klorür)[61].

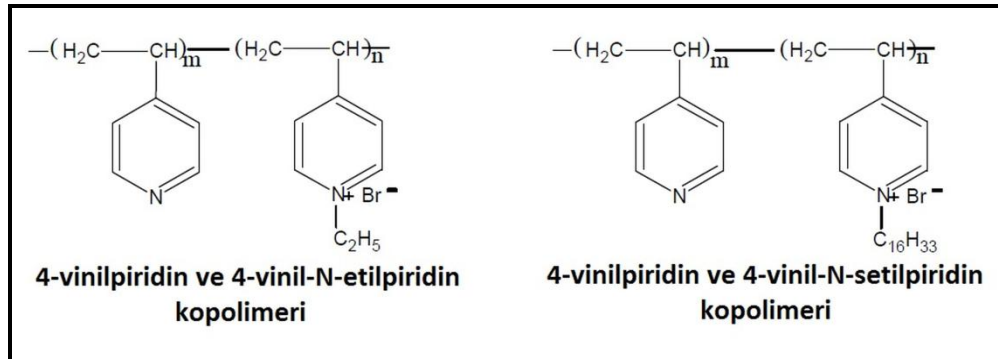
Prensipte, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine uygun sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlayıp yapıyı uygun bir pH'da suda çözünür hale getirerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler ve çok sayıda proteinler doğadan edinilebilir. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir [61].

Polielektrolitler ortamın pH'ına bağlı olarak (+) veya (-) yüklü hale getirilip arzu edilen antijene bağlanabilirler.

Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi aşağıda verilmiştir [59].

2.6.2.1 Katyonik Polielektrolitler

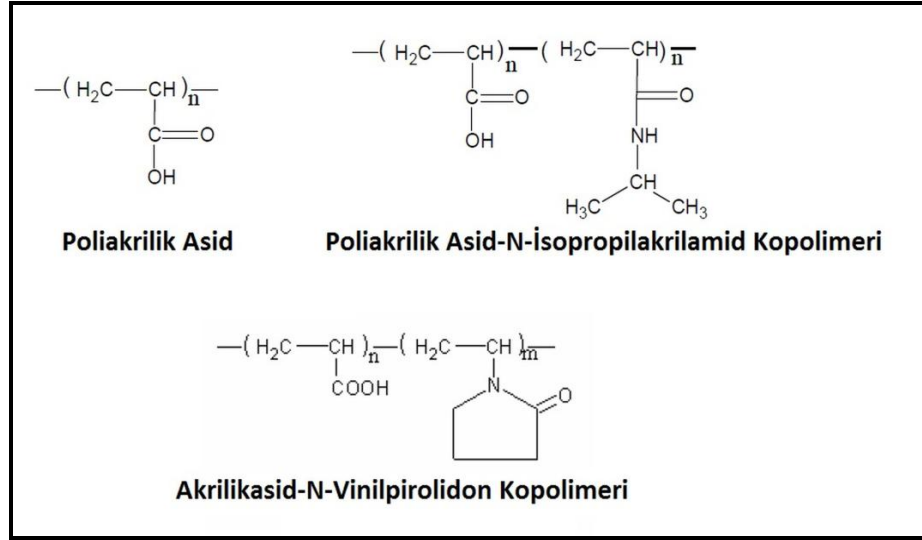
Yapılarında (+) yük taşırlar. Fizyolojik aktiviteleri öncelikle yapılarında taşıdıkları (+) yüklerin yoğunluğuna ve dağılımına, daha sonra da monomerlerin yapısına bağlıdır.



Şekil 2.12Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler

2.6.2.2 Anyonik Polielektrolitler

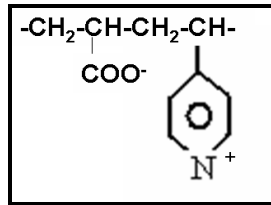
Yapılarında (-) yük taşırlar. Fizyolojik aktiviteleri öncelikle yapılarında taşıdıkları (-) yüklerin yoğunluğuna ve dağılımına, daha sonra da monomerlerin yapısına bağlıdır. Canlı organizmaya verildiğinde hücre duvarı ile etkileşime girmez. Canlı organizmanın bileşenleri ile rekabete girer ve yer değiştirme reaksiyonları gerçekleştirir.



Şekil 2.13 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler

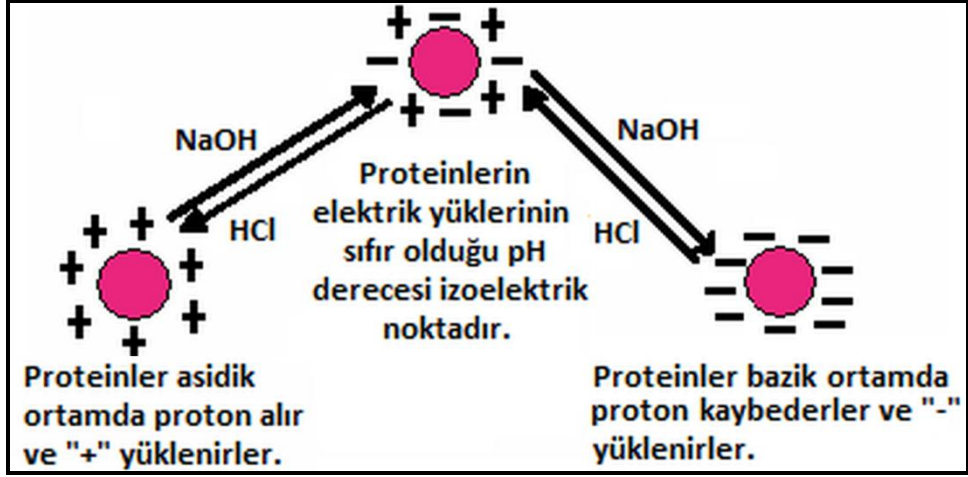
2.6.2.3 Poliamfolitler

Zincir yapısında hem pozitif hem de negatif yükleri aynı anda bulunduran polimerlerdir. Doğada bol miktarda bulunan protein yapılı poliamfolitlerin yanı sıra sentetik yollarla üretilen poliamfolitler de mevcuttur. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında, molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir.



Şekil 2.14 Poliamfolit

Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları [62].

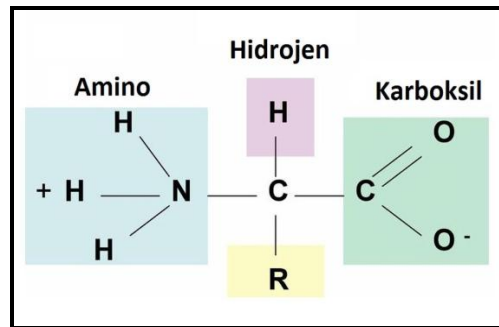
Eğer bir protein izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa en az çözünür haldedir ve en kolay çöktürülebilir durumdadır. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda demektir.

2.7 Amino Asitler ve Peptidler

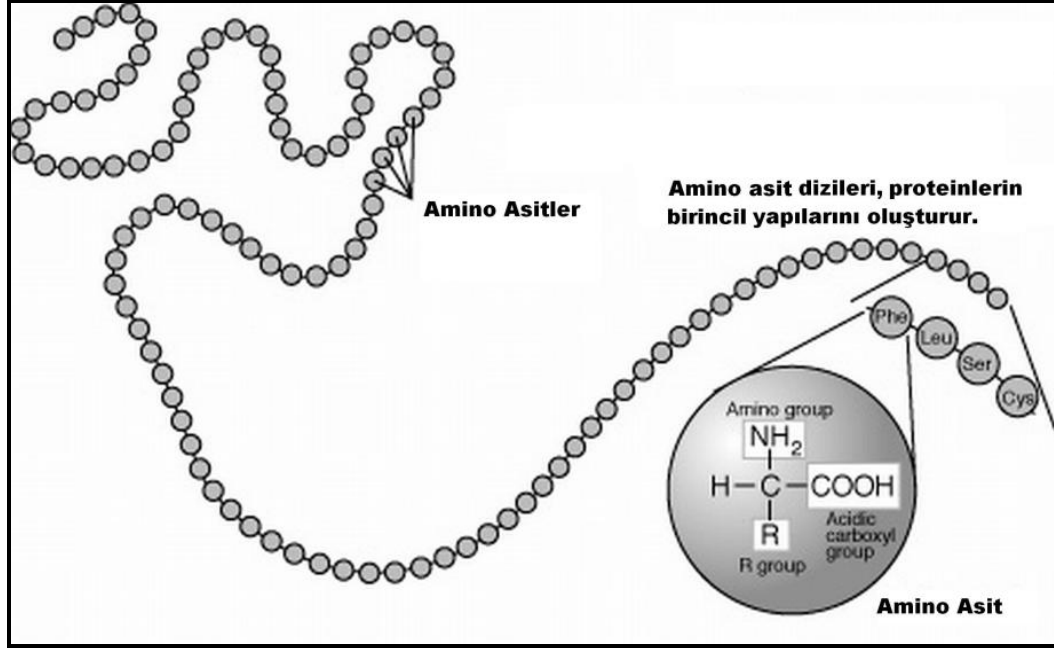
2.7.1 Amino Asitler

Biyolojik makromoleküllerin (proteinler, hormonlar, enzimler v.s.) büyük çoğunluğu amino asitlerden oluşmuştur. Her bir makromolekülün yapısı ise doğrudan doğruya kendisini oluşturan amino asitlerin yapılarına bağlıdır.

Proteinlerin yapıtaşı olan, aynı α -karbon atomuna bağlı $-\text{COOH}$ ve $-\text{NH}_2$ gruplarından oluşan monomerlere amino asit denir. Proteinlerin yapısında toplam 20 tane amino asit vardır. Doğada ise yaklaşık olarak 300 farklı amino asit olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.16 Bir amino asidin kimyasal formül ile gösterimi.



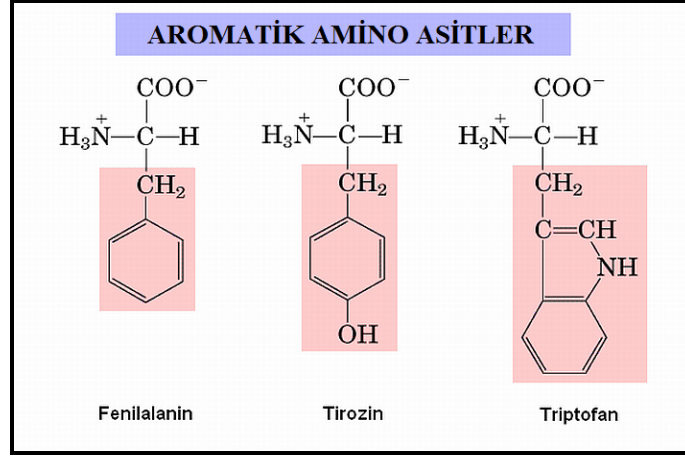
Şekil 2.17 Proteinlerde birincil yapıyı oluşturan peptidlerin, amino asit diziliminin şematik gösterimi [63].

2.7.2 Sınıflandırılması

Amino asitlerin sahip oldukları yan zincirler α -karbonuna bağlıdır ve 20 amino asitin her birinde farklıdır. Bu farklılık, proteinin kendine özgü yapısının ve aktivitesinin olmasını sağlar. Tüm amino asit yan zincirleri bir arada düşünüldüğünde, artı veya eksi yüklüden hidrofobiğe kadar oldukça fazla çeşitli yapısal özellikler gösterirler. Ayrıca bu yan zincirler, oldukça farklı çeşitlilikte kovalent ve nonkovalent bağların yapısına katılabilirler.

2.7.2.1 Aromatik Amino Asitler

Bu amino asitler hidrofobik etkileşimlere katılabilir. Tirozinin hidroksil grubu hidrojen bağı yapabilir. Tirozin hidroksil grubundan, triptofanda indol halkasındaki azottan dolayı, fenil alanine göre daha polardır. Bu amino asitler, 280 nm dalga boyundaki ultraviyole (UV) ışığı absorplamasından dolayı proteinlerin tanımlanmasında önemli rol oynarlar.



Şekil 2.18 Aromatik amino asitler.

2.7.2.2 Polar Olmayan Alifatik Amino Asitler

Bu amino asitler apolardır. Yan zincirlerinde hidrofobik özellik gösteren radikal grup bulundurlar. Proteinlerde Alanin, Valin, Lösin, İzolösinin yan grupları bir araya gelip kümeleşerek, hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitler. Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler sayesinde bir arada tutunurlar [64].

2.7.2.3 Polar Yüksüz Amino Asitler

Sistein ve Tirozin alkali pH'da bir proton kaybedebilse de bu amino asitler nötral pH'da yüksüzdürler. Serin, Treonin ve Tirozin, hidrojen bağı oluşumuna katılabilen polar bir hidroksil grubuna sahiptirler. Asparajin ve Glutamin'in yan zincirleri de hidrojen bağına katılabilen birer karboksil ve amid grubu taşırlar [65].

2.7.2.4 Bazik Amino Asitler

Bu amino asitlerin yan zincirleri proton alıcısıdır. Fizyolojik pH'da Lizin ve Arginin'nin yan zincirleri tamamen iyonize olur ve negatif yüklüdürler. Diğer yandan, Histidin bir proteinin polipeptid zincirlerinin oluşturduğu iyonik çevreye göre pozitif yüklü veya yüksüz olabilir.

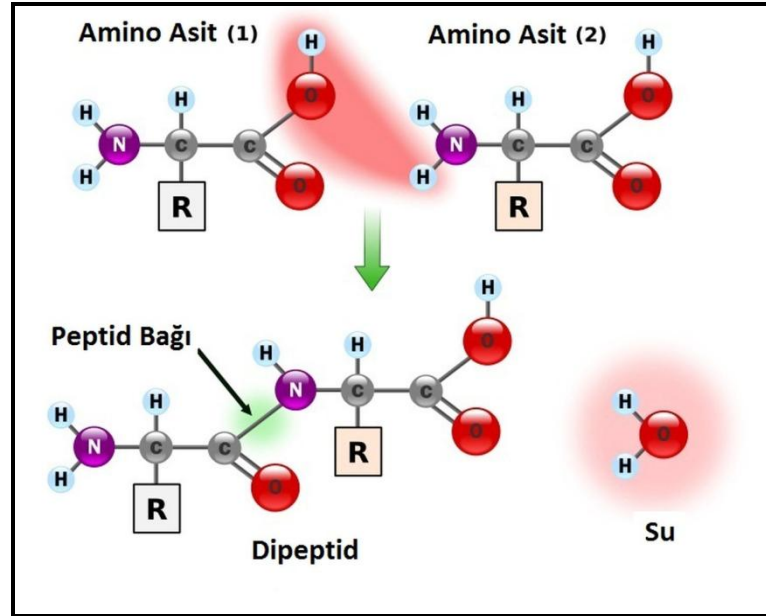
2.7.2.5 Asidik Amino Asitler

Bu amino asitlerin yan zincirleri proton vericidir. Nötral pH'da bu amino asitlerin yan zincirleri tamamen iyonize olarak, negatif yüklü bir karboksil ($-\text{COO}^-$) grubu taşırlar. Bu nedenle, fizyolojik pH'da negatif yüklüdürler.

2.7.3 Peptidler ve Peptid Bağı

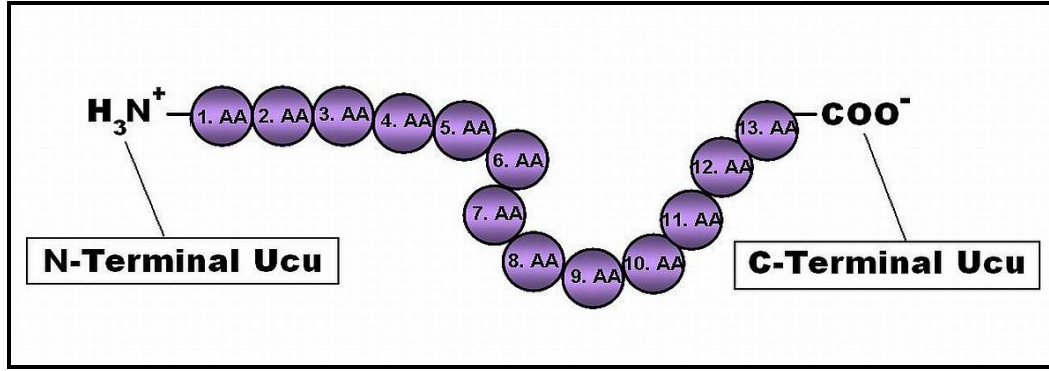
Peptidler, aminoasid monomerlerinin peptid bağları ile bir araya gelmesinden oluşan doğal polimerlerdir.

Kuramsal olarak, bir amino asidin α -karboksil grubunun $-\text{OH}$ 'i ile diğer amino asidin α -amino grubu arasından su ayrılarak peptit bağı oluşur.



Şekil 2.19 Peptid bağının oluşumunun şematik gösterimi [66]

Üç amino asidin iki peptid bağıyla bağlanmasıyla **tripeptid** meydana gelir. Bu şekilde az sayıda amino asidin bağlanmasıyla oluşan yapılar **oligopeptidler**, çok sayıda peptidin bağlanmasıyla oluşan, molekül ağırlıkları 10.000 Daltonun altında olan yapılar ise, polipeptidler olarak adlandırılır [67].



Şekil 2.20 Peptidin amino asit şematik gösterimi

Polipeptidler lineer polimerlerdir. Bir polipeptid zincirinin ucundaki amino asit kalıntısı, serbest -NH_3^+ grubu, amino asit kalıntısının diğer ucu ise serbest -COO^- grubuna sahiptir. Bu iki grup, N-terminal ucu (N-terminus) ve C-terminal ucu (C-terminus) olarak adlandırılırlar [68].

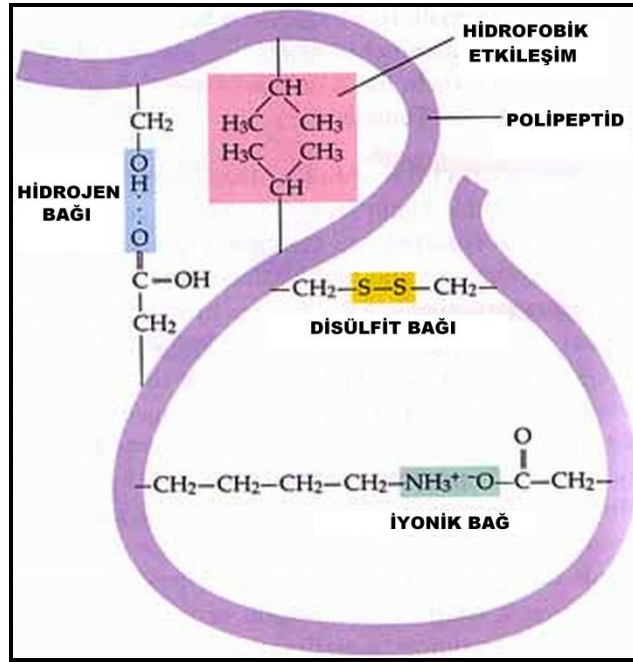
Peptidlerin her zincirinde bir uçta sadece bir serbest α -amino grubu ve diğer uçta bir serbest α -karboksil grubu bulunur. Bu gruplar serbest amino asitlerdeki gibi iyonize olurlar. Uçlar dışındaki tüm amino asitlerin α -amino ve α -karboksil grupları peptid bağı ile kovalent bağlanıp peptidleri oluşturdukları için, iyonize olarak peptidlerin toplam asit-baz davranışlarına katkıda bulunmazlar. Fakat bazı amino asitlerin yan zincirleri iyonize olabilir ve molekülün asit-baz özelliğini etkiler. Serbest amino asitlerinkine benzer şekilde, her bir peptid dizisinin kendine özgü izoelektrik noktası (pI) mevcuttur [67].

2.7.4 Proteinlerin Yapısındaki Kovalent Olmayan Etkileşimler

Doğal proteinlerin yapısının ve kararlılığının belirlenmesinde kovalent olmayan etkileşimler büyük ölçüde etkilidir. Genelde en düşük serbest enerjili protein konformasyonu (yani en kararlı konformasyon) en fazla sayıda zayıf etkileşimi içeren konformasyonlardan biridir [69].

Hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik bağlar ve Van der Waals kuvvetleri protein konformasyonunda önemli bir etkiye sahip olan kovalent olmayan etkileşimlerdir. Bu zayıf bağların herbirinin oluşması, sistemin serbest enerjisinde net bir azalma yaratır. Makromoleküllerin en kararlı (doğal) yapıları, zayıf bağ

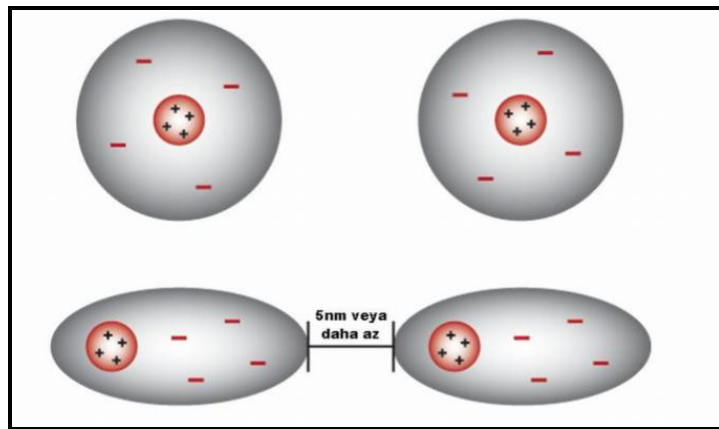
oluşturabilme yetilerinin en yüksek olduğu halleridir. Antijenin özel bir antikora bağlanması bir çok zayıf etkileşimin toplam etkisiyle olur [70].



Şekil 2.21Kovalent olmayan bağlar [71].

2.7.4.1 Van der Waals Etkileşimleri

Yüksüz ve bağlanmamış durumdaki yakın atomlar arasında oluşan yük yoğunluğundaki dalgalanma sonucu meydana gelen kısa süreli kısmi kutuplaşma ile oluşan etkileşime Van der Waals etkileşimi denir. Van der Waals etkileşimleri, protein katlanmaları ve proteinlerin diğer moleküller ile etkileşimlerinde etkilidir.

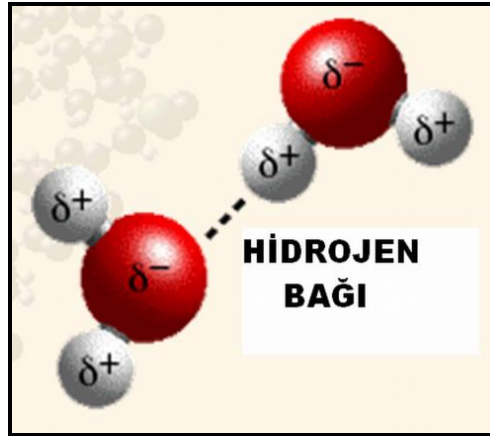


Şekil 2.22İki atom arasında Van der Waals kuvvetlerinin oluşumu [72].

İki çekirdek birbirine daha yakın bir duruma geldiklerinde, elektron bulutları birbirlerini itmeye başlar. Van der Waals çekiminin bu itiş kuvvetiyle dengeye ulaştığı noktada, çekirdeklerinin birbiriyle Van der Waals temasında olduğu söylenir [67].

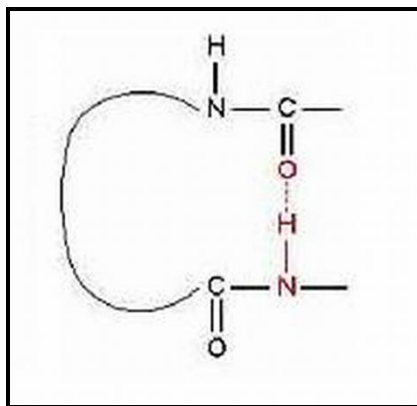
2.7.4.2 Hidrojen Bağları

Azot ve oksijen gibi elektronegatif atomların hidrojenle etkileşime girmesiyle meydana gelen bağa hidrojen bağı denir [73], [74].



Şekil 2.23 Su molekülleri arasında oluşan hidrojen bağı [75].

Hidrojen bağları; hem polipeptid zincirlerinin kendi arasında, hem de sulu çözelti ortamında bulunan elektron alıcı ve vericileri ile polipeptid zinciri arasında oluşmaktadır.



Şekil 2.24 Protein zincirindeki hidrojen bağı oluşumu [76].

Proteinlerin yüzeyindeki polar gruplar ile sulu ortam arasındaki hidrojen bağlarının oluşumu proteinlerin çözünürlüğünü artırır [65].

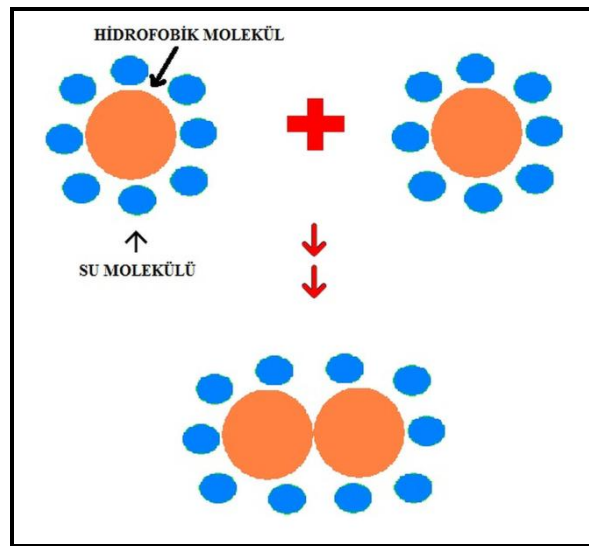
Ayrıca proteinlerin yan zincirleri de, proteinin yüzeyinde hidrojen bağları oluşturabilme özelliğine sahiptir. Bazı amino asitler yan zincirlerinde taşıdıkları fonksiyonel gruplara göre, aralarında hidrojen bağları oluşturabilirler.

Örneğin:

- Serin, Treonin ve Tirozin gibi alkol grubu içeren,
- Tirozin ve Asparajin gibi biri alkol biri asit içeren,
- Asparajin ve Glutamik asit gibi ikisi de asit grubu içeren,
- Serin ve Lizin gibi biri alkol biri amin grubu taşıyan,
- Serin ve Asparajin gibi biri alkol biri amid grubu içeren amino asitler arasında hidrojen bağı oluşabilir [77].

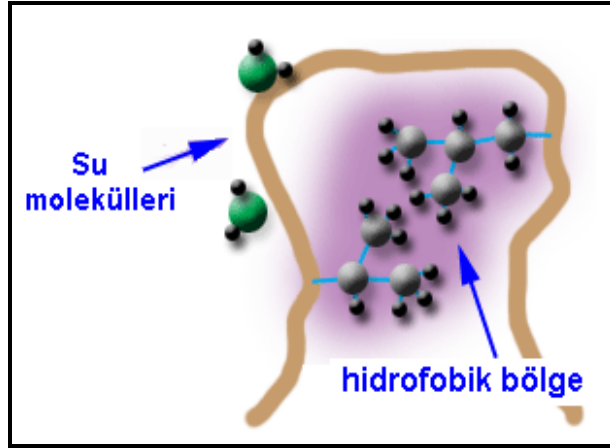
2.7.4.3 Hidrofobik Etkileşimler

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 girme eğiliminden kaynaklanır. Bu tür etkileşime hidrofobik etkileşim denir. Hidrofobik etkileşimler, protein molekülünün sulu ortamdaki kararlı yapısının oluşmasına sebep olan katlanmalarının en önemli sebebidir [78].



Şekil 2.25Yüksüz moleküller arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimler [79].

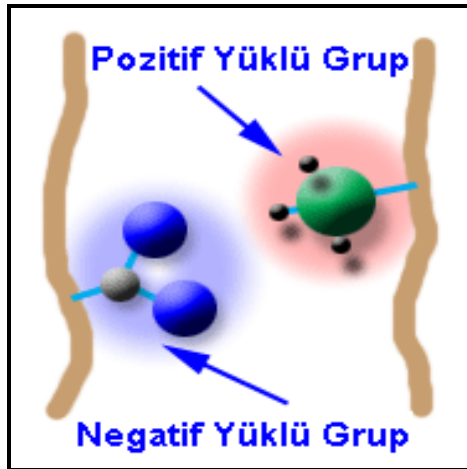
Deneyisel olarak da bilindiği gibi, katlanma eğilimindeki proteinlerin hidrofobik yan zincirleri su moleküllerinden uzaklaşarak, proteinin iç kısımlarına çekilir. Polar olmayan yan zincire sahip amino asitler diğer hidrofobik amino asitlerle birleşerek polipeptid moleküllerinin iç tarafında yer almaya çalışırlar. Bunun aksine, polar veya yüklü yan zinciri olan amino asitler polar çözücüyle temas halinde olacak şekilde molekülün yüzeyinde yer almaya çalışırlar [65].



Şekil 2.26 Hidrofobik kısımlar içeren bir peptidde hidrofobik kısımların bir araya gelmesi [80].

2.7.4.4 Elektrostatik (iyonik) Etkileşimler

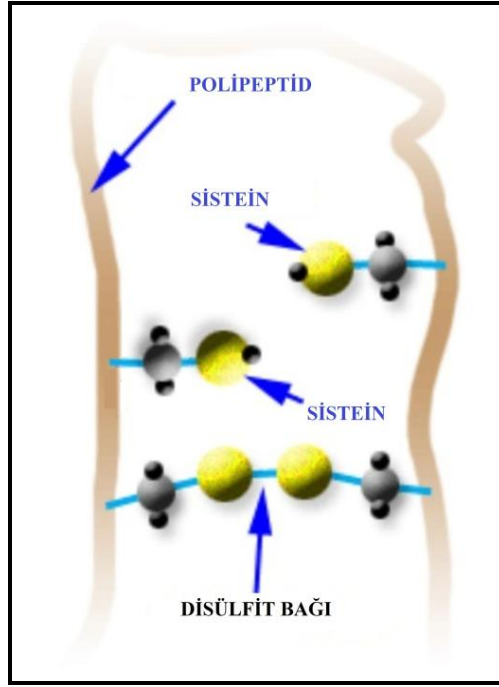
Yüklü gruplar arasında ya da dipol momente sahip gruplar arasında meydana gelen etkileşime elektrostatik etkileşim denir. Yüklü gruplar arasındaki etkileşim tipik olarak pozitif yüklü Aspartik asid ya da Glutamik asid ile Histidin, Lizin ya da Arginin arasında görülmektedir.



Şekil 2.27 İt yüklü iki peptid zinciri arasında oluşan iyonik etkileşimler [80].

2.7.4.5 Disülfid Bağları

Disülfid bağı, iki sülfür atomu arasında meydana gelen kovalent bir bağıdır. Bu kovalent bağlar, birincil dizilimde farklı pozisyonlarda yerleşmiş sistein amino asitlerinin yan zincirleri arasında meydana gelir. Bu bağlar proteinlerin katlanması, yapısı ve fonksiyonu açısından oldukça önemlidir [59].

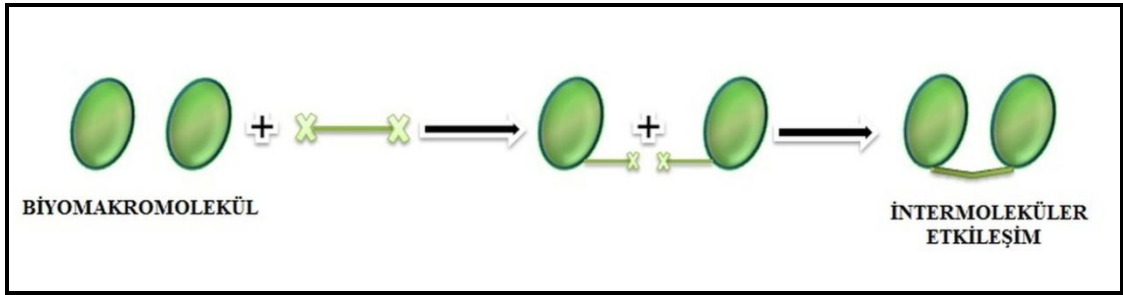


Şekil 2.28 Bir peptid zincirinin farklı iki Sistein bölgesi arasında meydana gelen disülfid bağı [80].

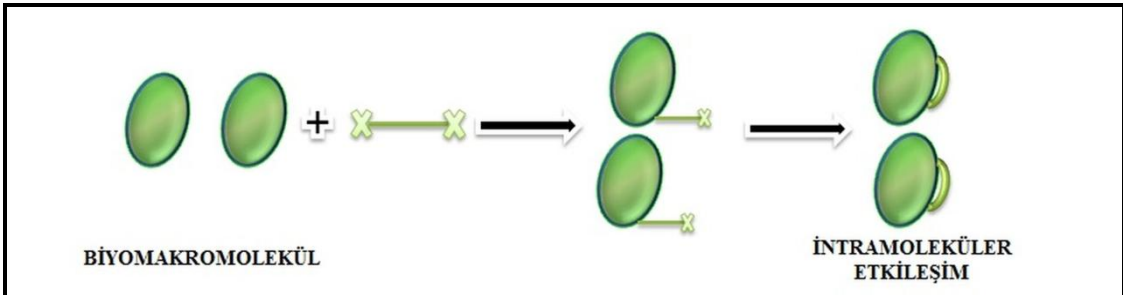
Her sistein amino asiti, yan zincirinde fonksiyonel grup olarak tiyol grubu (-SH) taşır. Amino asitlerden birindeki sülfür atomu ile, amino asit diziliminde farklı bir pozisyondaki sistein amino asitine ait sülfür atomu arasında, tersinir (geri dönüşümlü) bir kovalent bağ meydana gelir. Ve tiyol grupları okside olarak disülfid bağını (S-S) meydana getirirler. Disülfid bağları protein molekülünün dördüncül yapılarının oluşmasında ve korunmasında önemlidir. Disülfid bağları bir polipeptit zinciri içerisinde kurulabildiği gibi polipeptit zincirleri arasında da kurulabilir.

2.8 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlayıcılar, biyokonjugasyon prosedürlerine göre moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan kimyasal reaktiflerdir. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin kromojenik ve floresans olarak işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, iki farklı molekülün intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekülün intramoleküler (molekül içi) olarak bağlanmasında kullanılırlar.



Şekil 2.29Biyomakromoleküllerin intermoleküler etkileşim ile bağlanması.

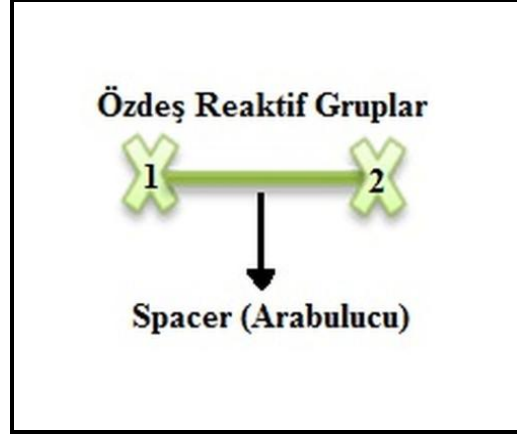


Şekil 2.30Biyomakromoleküllerin intramoleküler etkileşim ile bağlanması.

Çapraz bağlayıcılar; aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının türüne göre iki farklı şekilde sınıflandırılırlar. Eğer aktif bağın her iki tarafındaki R grupları aynı ise Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar), eğer R grupları farklı ise Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) çapraz bağlayıcılar olarak sınıflandırılırlar [81].

2.8.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanmasından meydana gelen çapraz bağlayıcıdır [81].



Şekil 2.31 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar.

Arabulucu moleküler bir ip gibi görev yaparak kovalent olarak bağlanacak olan her iki molekülün ortak reaktif gruplarına saldırır ve bu iki molekülün birbirine kovalent olarak bağlanmasını sağlar.

Ancak homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların;

- Konjugasyon sırasında çapraz bağlayıcı ile aktive edilen ilk protein tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı cins protein ile çapraz bağlanabilmesi,
- Aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler etkileşim ile konjugat oluşturabilmesi,
- Diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), üçlü (trimer) vb. oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi,

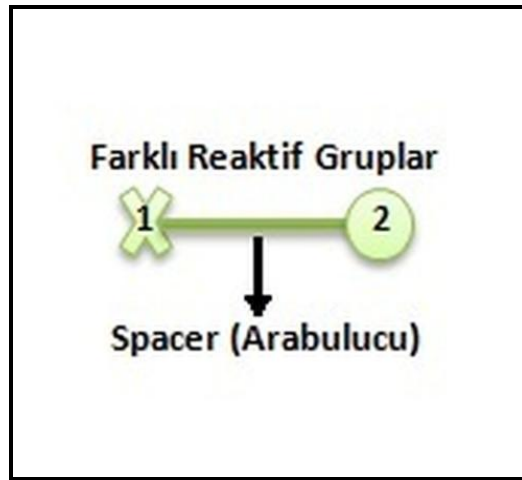
gibi dezavantajları mevcuttur [81].

Tüm bu dezavantajları yok edebilmek için homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir. Prosedüre göre, öncelikle ilk protein molekülü homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler (protein monomeri, dimeri, trimeri, vb.) uzaklaştırılarak aktive edilmiş protein saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci

molekül ya da protein ile konjugat oluşumu için karıştırılır. Ancak burada da aktive edilmiş proteinin saflaştırılması sırasında hidroliz olması ya da ilk molekülün kendi arasında polimerize olması ve reaksiyon veriminin oldukça düşük kalması gibi sorunlar ile karşılaşilmektedir [81].

2.8.2 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun iki ucuna farklı reaktif grupların bağlanması ile oluşturulmuştur [81].



Şekil 2.32 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar.

Şekil 2.32’den görüldüğü gibi heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı reaktif grubun yanı sıra bunları birbirine bağlayan bir adet de arabulucu (spacer) içerirler. Çapraz bağlayıcılar her zaman yalnızca reaktivitelerine göre değil bazen de sahip oldukları arabulucunun boyutuna ve özelliğine göre seçilip kullanılabilirler.

Konjugasyon olayı, iki farklı reaktif grubun kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırmasıyla ve bu molekülleri çapraz bağlamasıyla gerçekleşir. Örneğin, çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon prosesinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır [81].

2.8.3 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

İki molekülü arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlayan çapraz bağlayıcılara direkt çapraz bağlayıcılar denir. İlk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadığından bu çapraz bağlayıcıların bir diğer adı zero-length çapraz bağlayıcılarıdır.

Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine direkt bağladığı için konjugat içerisinde yabancı, istenmeyen bir madde bulunmaz. Dolayısıyla immünizasyon yapıldığında konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifik istenmeyen antikor oluşumuna mahal verecek bir durum oluşmaz [81].

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

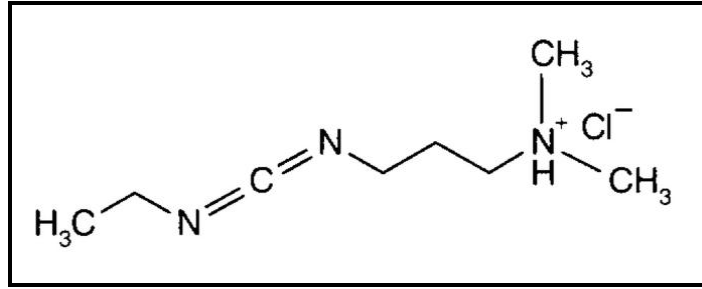
- Primer amino grubu ile karboksilik asit grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,
- Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,
- Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır [81].

2.8.4 Karbodiimidler

Karbodiimidler, karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanma yeteneğine sahip direkt çapraz bağlayıcılar arasında en sık kullanılanıdır. Suda çözünebilir ve çözünemeyen formları mevcuttur. Suda çözünen türdekiler özellikle; peptid, protein ve diğer makromolekülleri içeren biyokimyasal konjugasyonlar için kullanılmaktadır. Çünkü biyolojik kökenli birçok makromolekül sulu tampon çözeltilerde çözünmektedir. Suda çözünmeyenler karbodiimidler ise peptid sentezinde veya diğer organik bileşenlerin sentezinde kullanılmaktadır [81].

2.8.4.1 EDC

EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür, amin ve karboksilat içeren biyolojik moleküllerin konjugasyonunda kullanılan en popüler karbodiimid türevidir. Suda çözünabilir özelliktedir. Bu nedenle de reaksiyona direkt olarak eklenebilir. Reaksiyona girmemiş olan karbodiimidin fazlası ve reaksiyonun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünabilir olduğundan diyaliz veya jel filtrasyon ile kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar bu şekilde saflaştırılabilir [82], [83].



Şekil 2.33 EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür] $M_w=191,7$

EDC -20 °C'de saklanmalıdır çünkü suyun varlığında kararlı değildir. Aktivitesini kaybetmemesi için, kimyasal kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilir ve öyle açılır. Aktivite kaybını önlemek için, oldukça çabuk hazırlanır ve kısa sürede kullanılır [81].

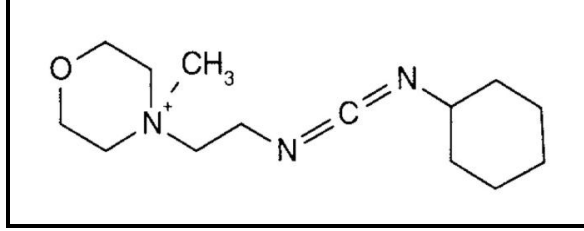
2.8.4.2 EDC Plus Sülfo-NHS

Suda çözünabilir özellikteki karbodiimidler; karboksil grubu ile aktif ester ara ürünü oluşturmak için suda çözünabilen sülfo-NHS ile birlikte kullanılırlar [81]. Sülfo-NHS esterleri hedef moleküldeki aminler ile hızlı bir şekilde bağlanan hidrofilik reaktif gruplardır [84], [85], [86], [87], [88], [89], [90], [91].

Konjugasyon reaksiyonunda, karbodiimid ile karboksil grubunun reaksiyonu meydana gelir ve O-açilisoüre kararsız ara ürünü oluşur sonrasında sülfo-NHS ile bu ara ürünün reaksiyonundan sülfo-NHS ester ara ürünü oluşur ve bu ara ürünün primer amino grubu ile reaksiyona girmesi sonucu amid bağı üzerinden konjugat elde edilir [81].

2.8.4.3 CMC

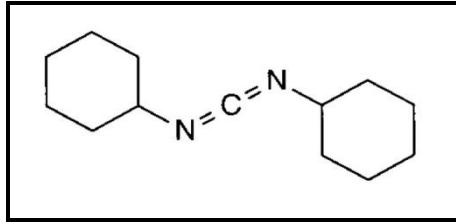
Yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubu sayesinde suda çözünebilen özellikteki CMC, 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin amid bağı oluşturarak konjugasyonunda kullanılmaktadır [81].



Şekil 2.341-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid. $M_w=423,58$

2.8.4.4 DCC

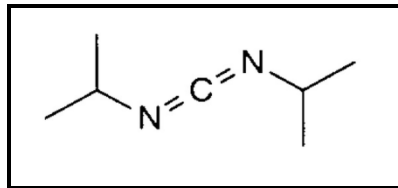
Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta [92] ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC suda çözünmeyen, organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir [81].



Şekil 2.35N,N' Disiklohegzil karbodiimid $M_w=206,32$

2.8.4.5 DIC

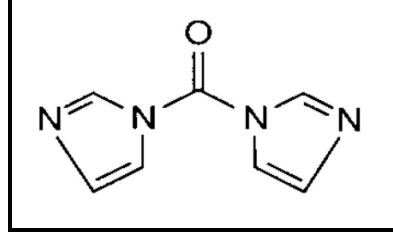
Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir. Hazırlanması DCC'ye göre daha kolaydır. Konjugasyon sırasında oluşan yan ürünü, organik çözücülerde DCC'nin kullanımında oluşan yan üründen daha çözüdür [81].



Şekil 2.36Diizopropil karbodiimid $M_w=126,2$

2.8.4.6 N,N-Karbonildiimidazol

N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diğer bir direkt çapraz bağlama reaktifidir [81].



Şekil 2.37N,N'-Karbonildiimidazol $M_w=162$

2.9 Floresans Enerji Transferi Yöntemi ile Biyokonjugasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi

Floresans rezonans enerji transferinin mekanizması ilk olarak Förster tarafından (1946) açıklığa kavuşturulmuştur. Floresans rezonans enerji transferi (FRET), birinci uyarılmış floresans özellikli molekülün (donör) sahip olduğu uyarılmış durum enerjisini emisyon olarak yaymak yerine başka bir moleküle (akseptör) aktardığı fiziksel bir süreçtir. Donör molekülleri tipik olarak alıcının absorpsiyon spektrumu ile üst üste binen daha kısa dalga boylarında ışınlar yayar. Transfer verimi donör ile akseptör arasındaki mesafeye bağlıdır ve donör akseptör çifti arasında zayıf elektronik bağlanma söz konusu olduğunda mesafeye bağlılık 1-10 nm aralığında gözlenmektedir [93]. Bu mesafe aralığında, moleküller arası ve molekül içi mesafe ilişkilerini araştırmada yararlı bir tekniktir. Bundan yararlanarak makromolekülün yapısı hakkında bilgi edinilir. Membran ve protein asosiyasyonları, ya da açılmış proteinler gibi tek D-A mesafesi mevcut olmayan makromoleküler çalışmalarda da FRET kullanılmaktadır. FRET'in spektroskopik cetvel gibi kullanılması söz konusudur. Örneğin, alıcı ligand ve donör Trp ise, Trp ligantın bağlanma yerine olan mesafeyi verir.

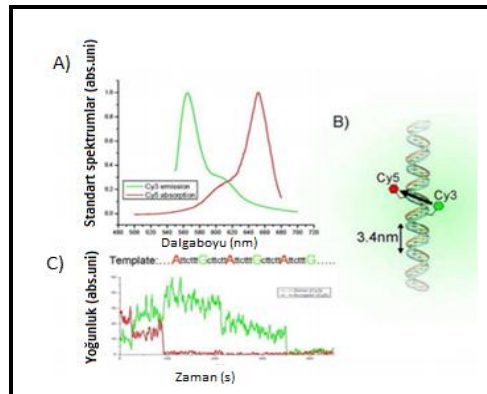
Protein üzerindeki yer ile membran yüzeyi arasındaki mesafe ölçümlerinde, protein alt üniteleri arasındaki asosiyasyon ölçümlerinde de FRET kullanılır [94]. Ayrıca, bağlanma olayındaki bu mesafe değişimleri, moleküler sensörlerin dizaynı için zemin oluşturmaktadır [93].

FRET'in potansiyel kullanımının çok önemli hale gelmesi ancak 1970'lerin ortalarına sonra gerçekleşmiştir. Floresans ömürlerinin doğru saptanması için enstrümantasyonda meydana gelen gelişmeler ve buna ek olarak oryantasyon faktöründeki belirsizliğin minimize edilmesi için yapılmış önermelerden sonra enerji transferi temelli moleküler uzaklıklar üzerine literatür artmaya başlamıştır [95].

Birçok çalışma kompleks intermoleküler yapıların karakteristiklerini incelemek ve proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve hatta virüslü hücreler gibi çeşitli moleküler bileşenlerden oluşan multikomponent yapıların geometrik karakteristiklerini saptamak için bir teknik olarak floresans rezonans enerji transferinin kullanımını göstermiştir. FRET yönteminin yüksek hassaslıkta, spesifiklikte, hızlilikta ve rölatif basitlikte ölçüm imkanı sağlamasından dolayı, araştırmacıların bu yöneme olan ilgisi artmıştır.

Son yıllarda katlanmamış proteinler, polipeptidler ve diğer biyopolimerler içindeki uzaklıkları FRET yöntemiyle inceleyen birçok araştırma görülmüştür. Bu deneylerin sonuçlarını değerlendirmek için yaygın olarak molekül içi difüzyonun uyarılmış hal yarı ömrü esnasında önemsiz olduğu varsayılmaktadır [96].

Hebert ve Braslavsky, DNA sarmalı içerisine iki farklı boya ile işaretlenmiş FRET çifti oluşturup nükleotidler arasında mesafe hesabı yapmışlardır.



Şekil 2.38(A) Donör ve akseptör moleküllerinin tipik FRET spektrumları. Bu örnekte, Cy3'ün emisyon spektrumunun Cy5'in absorpsiyon spektrumuyla üst üste bindiği gösterilmiştir, böylece iki boya arasında FRET meydana gelebilmektedir. (B) Çift sarmallı DNA'da yerleşmiş işaretli iki nükleotid bir FRET çifti oluşturmaktadır. (C) İki donör boya ve iki akseptör boya arasındaki FRET örneği. U-Cy5 ve C-Cy3 DNA dizisinde A ve G'ye karşı birleştirilir, donör emisyonu, akseptörler emisyon yaparken kısmen sönmülmendirilir [97].

2.9.1 Heterotransfer

Kimyasal olarak farklı donörler ve alıcılar arasında meydana gelen enerji transferidir [98].

2.9.2 Homotransfer

Kimyasal olarak benzer moleküller arasında meydana gelen enerji transferidir. Küçük Stokes kaymaları gösteren floroporlar için geçerlidir [98].

2.9.3 Förster Mesafesi

Enerji transferinin %50 verimli olduğu mesafedir. Büyüklüğü donör ve alıcı boya­ların spektral özelliklerine bağlıdır. Förster Mesafesinin 20-90Å aralığındaki bölgesi biyolojik makromoleküler çalışmalar için uygundur. Birçok proteinin yarıçapı, biyolojik membranların kalınlığı, çoklu alt üniteli proteinlerdeki yerler arasındaki mesafe ile karşılaştırılabilir. Örneğin, DNA çift helixin çapı 2,3 nm, F-actin Filamenti ~ 6 nm ve Mikrotübül 25 nm'dir [99].

2.9.4 Donörden Akseptöre Enerji Transferinin Hızı

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad 2.1$$

k_T = Donörden akseptöre enerji transferinin hızı

τ_D = Akseptör yokluğunda donörün bozunma zamanı

R_0 = Förster mesafesi

r = Donör-akseptör uzaklığı

2.9.5 Enerji Transferinin Hızı

Akseptörün absorpsiyon spektrumu ile donörün emisyon spektrumunun üst üste bindiği alanın genişliğine bağlıdır. Donörün kuantum verimine bağlıdır. Donör ve akseptör geçiş dipollerinin birbirine bağlı yönelmesine göre değişmektedir. Donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafeye bağlıdır. Rezonans Enerji Transferinin

mesafeye bağılılığı, donörler ile akseptörler arasındaki mesafelerin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmasını sağlar [94].

2.9.6 Enerji Transferi Verimi

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)}$$

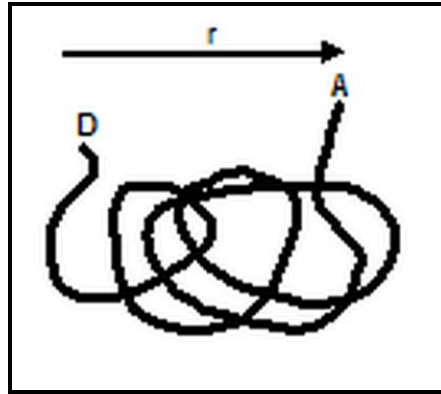
2.2

E =Enerji transferi verimi

R_0 = Verilen donör ve alıcı çifti için karakteristik mesafe (Förster Mesafesi)

R = Donör ve alıcı arasındaki gerçek mesafe

Bu eşitlikten donör ile akseptör arasındaki mesafe hesaplanır.

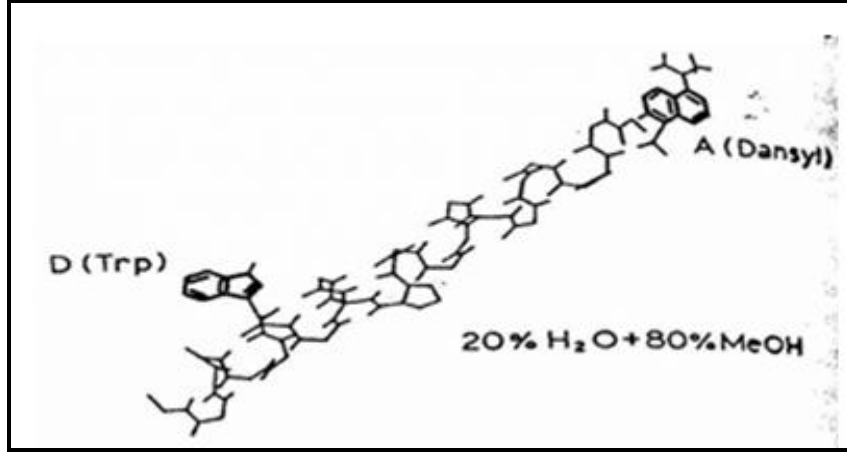


Şekil 2.39 Protein, donör ve alıcı ile kovalent olarak işaretlenmiştir. Donör genellikle Trp kalıntısıdır [94].

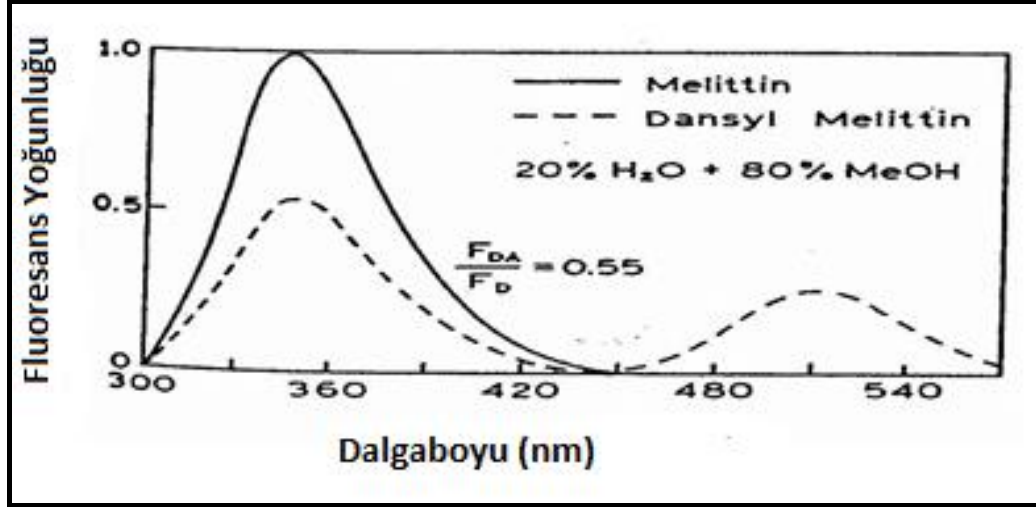
FRET yönteminin diğer kullanım alanları, proteinlerin yapısının ve konformasyonunun incelenmesi, reseptör/ligand etkileşimleri, lipidlerin düzenlenmesi ve transportu, membran füzyon deneyleri, nükleik asitlerin yapısı ve konformasyonunun incelenmesi, membran potansiyel ölçümleri, nükleik asitlerin hibridizasyonu, proteinlerin uzaysal düzenlenmesi ve çoğalması gibi çalışmalardır [100]

2.9.7 Biyokimyada Floresans Rezonans Enerji Transferinin Kullanımı

Biyokimyada FRET'in kullanımına örnek olarak Melittin peptidi verilebilir. Bu peptid 26 tane aminoaside sahiptir. 19. sırada Trp vardır ve donör olarak görev yapar. Tek Dansyl ise alıcı olarak N-terminal amino grubuna bağlanmıştır. Förster mesafesi 23,6Å'dür.



Şekil 2.40 α -helikal durumdaki melittinin yapısı. Donör triptofan-19 ve akseptör bir N-terminal dansyl grubudur [94], [101].



Şekil 2.41 Melittin donörünün (D) ve alıcı-işaretlenmiş melittinin emisyon spektrumları (D-A). uyarma dalgaboyu 282 nm'dir [94], [101].

Burada tek bir D-A mesafesi vardır. D-A mesafesinin 24,4Å olduğu hesaplanır.

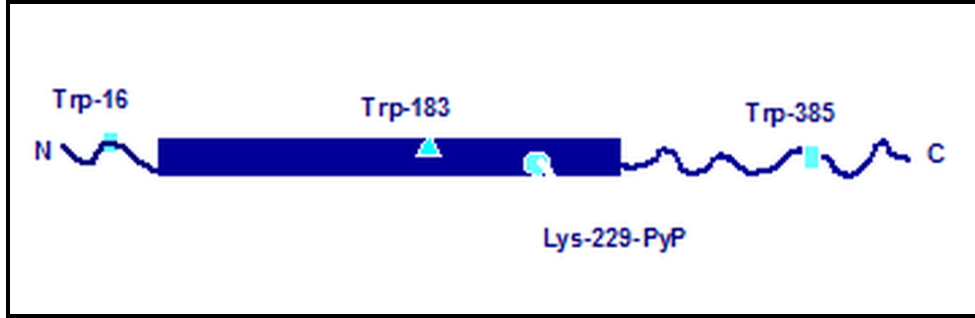
$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)} \quad 2.3$$

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{(1-E)}{E}} \quad 2.4$$

2.9.8 Enerji Transferinin Protein Katlanması Ölçümlerinde Kullanılması

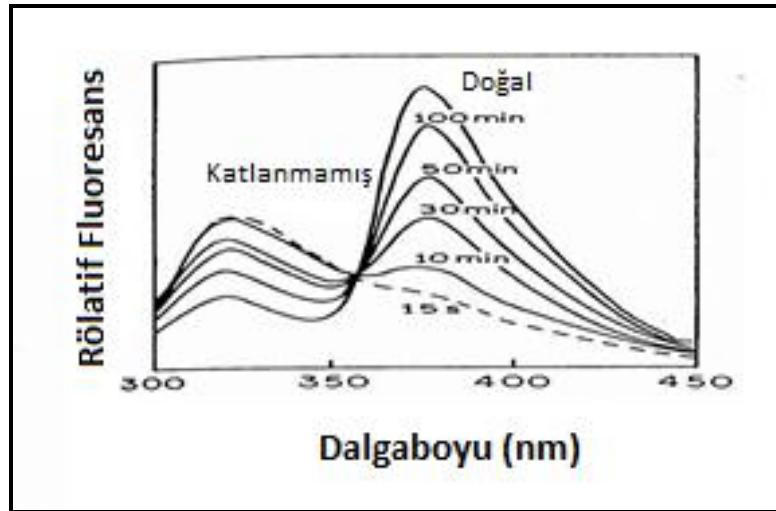
Örnek olarak protein için Serin Hidroksimethyl Transferaz seçilmiştir. Bu proteinin 3 tane Trp'ı vardır. Alıcı olarak da Piridoksil 5'-Fosfat seçilmiştir ve proteinin 229.'u

konumundaki Lizin'e kovalent bağlanır. Proteinin katlanması veya katlanmaması her bir Trp'dan PyP'ye olan mesafeyi etkiler. Doğal ve katlanmış proteinler için RET'in büyüklüğünün farklı olması beklenir. 3 tane Trp, 3 tane donör, 3 tane donör emisyonu demektir. Her biri tek Trp içeren 3 tane protein mutanıtı hazırlanır. Dolayısıyla her bir mutantda tek Trp-PyP çifti söz konusudur [94].



Şekil 2.42Serin Hidroksimetil Transferaz [94], [102].

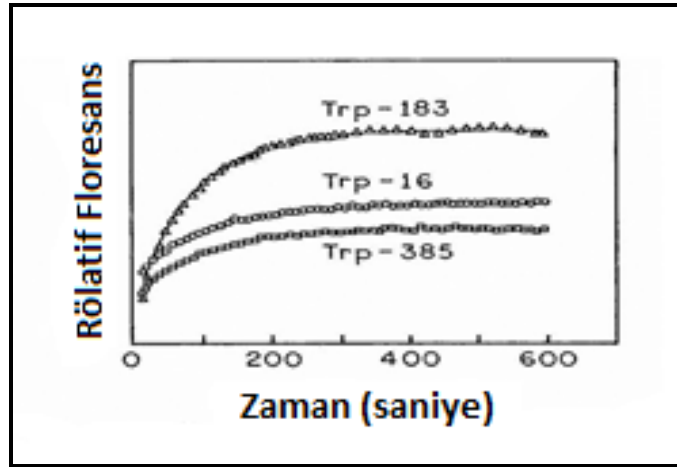
Protein başlangıçta 8 Molar üre içindedir. Rastgele dolanmış durumdadır. Aşağıdaki grafikte kesikli çizgi ile gösterilen eğridir. Üresiz tampon içine seyreltme yapılır yapılmaz, Trp-donör emisyonundaki azalma ve PyP-alıcı emisyonundaki artma ile görüldüğü gibi protein yeniden katlanmaya başlar. PyP emisyonunun şiddeti, Trp-183'den dolayı artan FRET nedeniyle yeniden katlanma üzerine artar.



Şekil 2.43Refolding esnasında PyP-5'-serin hidroksimetiltransferazda Trp-183'ün emisyon spektrumları. 290 nm'de uyarılmıştır [94], [102].

3 tane tek Trp içeren mutantın kullanılabilirliği, protein üzerindeki spesifik yerlerin yeniden katlanmasının incelenmesine izin verir. 380 nm'de PyP alıcı emisyonu, her bir mutant için yeniden katlanma boyunca ölçülür. Katlanma yolu hakkındaki bilgiyi verir.

En büyük alıcı artması Trp-183 mutanđı için görülür.      katlanmış proteinde PyP'ye en yakın olandır. Her bir Trp'nin enerji transferinin miktarı, Trp ile PyP arasındaki mesafelerin belirlenmesine izin verir [94].



şekil 2.44Single-triptofan mutanđlarının refolding esnasında serin hidroksimetiltransferazda 380 nm'de PyP'nin zamana bağlı yoğunluğu [94], [102].

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Finnpiquette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- Precisa XB 220A Terazî
- Sartorius CP 225D Hassas Terazî
- Hanna Instruments pH 211
- WTW pH level 1 pH metre
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Liberty Mikro Dalga destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı
- Milestone Microsynth Mikro Dalga Sentez Cihazı
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Shimadzu LC-MS 2010 EV

- Shimadzu Preparatif HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Shimadzu HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrofluorometre
- Shimadzu IR-Prestige Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
- Telstar Liyofilizatör CRY 000S-80
- Olympus CKX 41 Invert Mikroskop
- Laminar-hava akışlı kabin (Heraeus, KS12)
- CO2 İnkübatörü (New Brunswick Innova CO-150)
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.22 µm
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.45 µm
- 10000 Da luk Millipore membranlı tüp
- Santrifüj (Sigma, Benctop 1-15)
- ELISA okuyucu (ThermoLabssystem, Multiscan Ascent)
- Su saflaştırma sistemi (Millipore MilliQ Elix 5)
- Flow sitometri (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta)

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların isimleri, alındıkları firmalar ve katalog numaraları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Kimyasalın Adı	Marka	Katalog No
Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidi	BioSynthesis	T4913-1
Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptidi	BioSynthesis	T4913-2
Bovin serum albumin, (BSA)	Sigma	A-4503
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430
Dansyl Chloride (5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride)	Aldrich	D143359
Asetonitril anhydrous, 99.8%	Sigma-Aldrich	271004
Borik Asit	Sigma	B6768
Dextran from Leucontoc mesenteroides (Av.mol wt 60,000-90,000)	Sigma	D3759
Sodium (meta) periodate	Fluka	71862
Sodium hydrogen carbonate	Fluka	71627
NaHB ₄	Fluka	71321

Çizelge 3.2 Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

NaHCO ₃	Sigma	S5761
DCM	Riedel-de Hën	24233
DIEA	Perseptive Biosystems	GEN0075000
Dietileter	Riedel-de Hën	24005
DMF	Fluka	40255
EDT	Aldrich	398020
Fmoc-Ala-OH	Fluka	47624
Fmoc-Ala-Wang resin (reçine)	Fluka	47644
Fmoc-Arg-(Pbf)-Wang resin LL (reçine)	Nova Biochem	04-12-2075
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	Fluka	47349
Fmoc-Asn-(Trt)-OH	Fluka	47672
Fmoc-Asp-(OTBu)-OH	Fluka	47618
Fmoc-Cys-(Trt)-OH	Fluka	47695
Fmoc-Glu-(OtBu)-OH	Fluka	47625
Fmoc-Glycine	Fluka	47627
Fmoc-Ile-OH	Fluka	47628
Fmoc-L-Valine	Fluka	47638
Fmoc-Leu-OH	Fluka	47633
Fmoc-Leu-Wang resin (reçine)	Fluka	47662
Fmoc-Lys-(BOC)-OH	Fluka	47624
Fmoc-O-tert-butyl-L-Serine	Fluka	47619
Fmoc-Phe-OH	Fluka	47635

Çizelge 3.3Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Fmoc-Pro-OH	Fluka	47636
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	Fluka	47622
Fmoc-Trp-(BOC)-OH	Fluka	47561
Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	Fluka	47623
HBTU	Fluka	12804
HOBt	Fluka	54804
Metanol	Riedel-de Hæn	24229
NMP	Sigma	M6762
Piperidin	Merck	8.22299.2500
TFA	Fluka	91700
Thioanisole	Fluka	88470
Poliakrilikasit (PAA)	Aldrich	52392-5
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	41640
Annexin V FITC	İnvitrogen	IM3546
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	İnvitrogen	A07704
DMEM-F12	Sigma	D5546
RPMI 1640 with L glutamin	Biochrom AG	F1215
L-glutamin	Biological Industries	03-020-IC
Penisilin streptomisin	Biochrom AG	A2213
Gentamicin	Sigma	G1397
Fetal dana serumu	Biochrom AG	S0113
Tripsin EDTA	Biological Industries	03-051-5B

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Asetat Tamponu

5,72 ml asetik asit, ultra saf su ile 2 lt'ye tamamlandı. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 17,53 g NaCl eklendi ve karıştırmaya devam edildi. 1M NaOH ile pH 4'e ayarlandı.

3.3.2 0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7)

2,6807g Na₂HPO₄.7H₂O (Mw=268,07 g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözünür. Aynı bir erleninde 1,56g NaH₂PO₄.2H₂O (Mw=156,01 g/mol) tartılarak 400 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 ml'lik NaH₂PO₄ çözeltisi 1 lt'lik balon joje içerisindeki Na₂HPO₄ çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8,766 g NaCl eklenir ve karıştırmaya devam edilir. Çözeltinin pH'ı ölçüldü ve pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözeltinin son hacmi 1 lt'ye tamamlanır.

3.3.3 100mM Sodyum Borat Tamponu (pH=9,2)

6.18 g borik asit bir miktar saf su içerisinde çözülür. Üzerine 2.00 gr sodyum hidroksit eklenerek son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

3.3.4 100mM'lık NaHCO₃ Tamponunun Hazırlanması

200ml NaHCO₃ tamponu hazırlamak için;

$$M = \frac{n}{V} \text{ formülünden,}$$

$$0,1 = \frac{n}{0,2} \text{ buradan } n=0,02 \text{ mol bulunur.}$$

$$n = \frac{m}{M_A} \text{ formülünden,}$$

$$0,02 = \frac{m}{84,01} \text{ buradan da } m=1,68 \text{ gr bulunur.}$$

1,68 gr NaHCO₃ tartılıp, 200 ml distile H₂O'da çözülür. pH'ı 8 olacak şekilde pH ayarlaması yapılır.

3.3.5 PAA Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Tüm deneylerde % 35'lik $M_w=100000$ Da olan PAA çözeltisi kullanılır. Bu ana stok çözeltiden her seferinde almak yerine, konsantrasyonu bilinen bir ara stok çözelti hazırlanır.

Öncelikle 1 mg PAA'nın ne kadar hacim içinde olduğu hesaplanır.

$$\begin{array}{ll} 100 \text{ mL'de} & 35 \text{ gr PAA varsa,} \\ \mathbf{X} & 1 \text{ mg PAA} \end{array}$$

$$\mathbf{X} = 2.85 \times 10^{-3} \text{ mL'sinde yani } 2.85 \mu\text{L'sinde } 1 \text{ mg PAA bulunur.}$$

1 mL PAA ana stoktan alırsak;

$$\begin{array}{ll} 2.85 \mu\text{L'sinde} & 1 \text{ mg PAA varsa,} \\ 1000 \mu\text{L'sinde} & \mathbf{X} \end{array}$$

$$\mathbf{X} = 2.85 \text{ mg PAA vardır.}$$

Bu 1 mL (701.75 mg) PAA çözeltisini 2 mL ultra saf su ile dilue edersek ($V_T = 3 \text{ mL}$);

$$\begin{array}{ll} 2.85 \text{ mg PAA} & 3 \text{ mL'deyse} \\ 1 \text{ mg PAA} & \mathbf{X} \end{array}$$

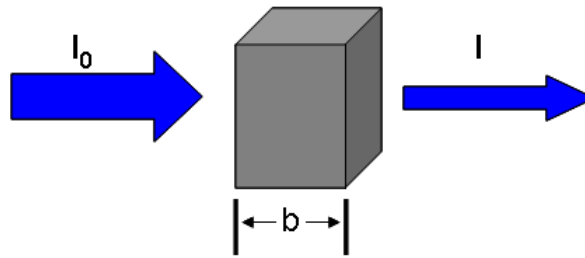
$$\mathbf{X} = 8.55 \mu\text{L'sinde } 1 \text{ mg PAA bulunur.}$$

Böylece, elimizde $8.55 \mu\text{L'sinde } 1 \text{ mg PAA}$ olan 3 mL ara stok çözeltimiz olur. Deneylerimizde kullanılan bütün PAA'ler bu ara stok çözeltiden uygun miktarlar hesaplanarak kullanılmıştır.

3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.4.1 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi

Ultraviyole ve görünür bölge, elektromanyetik spektrumun çok küçük bir bölümünü teşkil etmektedir. Bu bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Önemli birçok biyolojik molekül ultraviyole ışığı absorplamaktadır. Proteinlerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonun ve saflığının tayininde kullanılmaktadır. Proteinler UV bölgede iki absorbans pikine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi 215-230 nm’de (peptid bağının absorpsiyonundan kaynaklanan), diğeri de 280 nm [yapıdaki aromatik aminoasidlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) absorbansından kaynaklanan] gözlenmektedir. Proteinlerin ultraviyole ışığı absorplaması özelliğinden yola çıkılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonlarının saptanmasında, UV-VIS Spektroskopisi oldukça yaygın kullanılmaktadır.



Şekil 3.1Bouguer-Lambert-Beer Yasası’nın şematik gösterimi.

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demetin, şeffaf bir ortamdan geçerken içinden bazı dalga boylarının, ortamdaki atom ve moleküllere aktarılması sonucu, seçimli olarak kaybolmasına absorpsiyon (Soğurma) denir [94].

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon bc$$

3.1

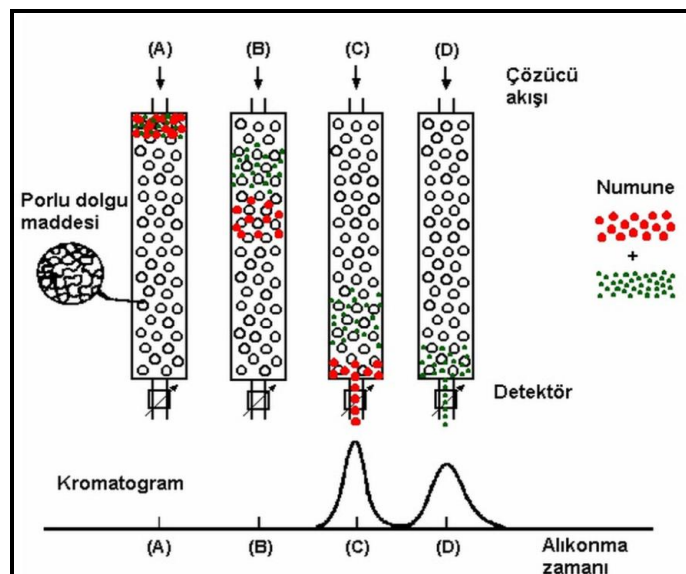
Burada c konsantrasyonu, b optik yolun kalınlığını, ϵ ise absorptiviteyi ifade etmektedir. Eğer c (mol/lt) cinsinden, b’de (cm) cinsinden alınırsa absorbtivite yerine, molar absorbtivite terimi kullanılır.

Absorpsiyonla, ışın enerjisi maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır. Böylece, ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler.

3.4.2 Jel Filtrasyon (HPLC) Kromatografisi

Kromatografi; biyolojik moleküller, enzimler, sentetik polimerler, sentetik peptidler vb. maddeleri incelemek için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak belli büyüklükte gözenekleri olan çapraz bağlı polimerler kullanılır. Metod bileşenlerin, 10 cm'lik kalibre edilmiş tüplerden oluşan kromatografik kolon içerisinden geçerken, mikro gözeneklere sahip jelde moleküler eleme prensibine göre ayrılmasına dayanmaktadır ve kolon silikajel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri ile doldurulur [103].

Proteinler, peptidler, polielektrolitler, bunların biyokonjugatları ve suda çözünür kompleksleri, HPLC'de ayrılmıştır. Sonuçlar Shim-Pack Diol-300 (7,9 mm ID x 50 cm) kolonu kullanılarak oda sıcaklığında belirlenmiştir. Shimadzu Model LC-6AD pompası, 1,0mL/dak. Akış hızıyla uygun tamponlar kullanılarak çalıştırılmıştır. Biyokonjugat ve kompleks çözeltileri santrifuj edildikten sonra 0,22 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek 20µl hacimlik örnek, analiz edilmek üzere cihaza verilmiş ve 280 nm'de Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS Dedektörü ile incelenmiştir. Kolonu kalibre etmek için kullanılan standartlar şunlardır: thyroglobulin (670 kDa), immunoglobulin (155 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (44 kDa) ve myoglobin (16.9 kDa).



Şekil 3.2 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram [104].

3.4.3 Dört Detektörlü Boyut-Elleme (SEC) Kromatografisi

Polimerler farklı boylardaki moleküllerin bir karışımıdır. Polimer karışımı çözelti haline getirildiğinde her bir polimer molekülü boyutuna bağlı olarak farklı hidrodinamik çaplara sahip olacaktır. Ufak moleküller gözeneklerde daha uzun süre kalacakları için kolonu geç terk edeceklerdir. Molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi kısılacak ve sistemden daha çabuk ayrılacaklardır. Detektör de farklı zamanlarda çıkan molekülleri saptayıp kromatograma dönüştürecektir. Bu yöntemin en önemli özelliği ayırmanın tamamen fiziksel olarak yapılmasıdır. Diğer tüm HPLC tekniklerinde ayırma kimyasal etkileşimlere dayanmaktadır.

Bu tez çalışmasında kullandığımız peptid, protein ve polimer gibi moleküllerin molekül boyutları birbirlerinden farklıdır. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan üre türevi yada çapraz bağlayıcının fazlası (EDC) gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan konjugat, peptid, polimer 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. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite, Işık saçılması ya da kırılma indisi detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.

Konjugat çözeltileri direkt olarak 0.22 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek 4 dedektörlü moleküler eleme kromatografisi (GPC) cihazına verilmiştir. 25°C'de, 0.8 mL/dk akış hızında, 100 µl enjeksiyon hacminde ve TSK Gel G3000 SWXL kolonunda UV (280 nm'de), Kırılma İndisi ve Işık Saçılması detektörleri ile çalışılmıştır. pH = 7'de hazırlanan konjugatlar için PBS tamponu hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

3.4.4 LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)

Kütle spektroskopisi günümüzde kullanımda bulunan tüm analitik yöntemlerin en geniş uygulama alanına sahip olanıdır. 1990'dan beri bu yeni iyonlaştırma yöntemlerinin

kullanımı çok fazla artmıştır. Günümüzde kütle spektrometreleri, fizyolojik sıvıların incelenmesinde, çeşitli ilaçların, vitamin ve metabolitlerin serum düzeylerinin belirlenmesinde, polipeptitlerin, proteinlerin ve diğer yüksek molekül ağırlıklı biyopolimerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır [105].

Kütle spektrofotometresi, sıvı kromatografi, gaz kromatografi, kapiler elektroforez gibi ayırma işlemi yapan cihazların devamına eklendiğinde; ilaç etkileşimlerinin incelenmesinden proteinlerin ve peptidlerin yapı analizlerine kadar çalışma alanı genişlemektedir. Sıvı kromatografi cihazının ardına kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir. Bazı durumlarda, eğer ölçümler yeterli doğrulukla yapılırsa, protein veya peptidin hangi protein veya peptid olduğu saptanabilir.

Bu yöntemle, atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturularak, bu iyonlar kütlelerine göre ayrılır ve kaydedilir. Burada molekülün kütlesi değil, kütle/yük (m/z) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise iyonların bağıl miktarlarının (m/z) oranına göre çizilen grafiği ifade etmektedir.

Kütle spektroskopisi ile katı, sıvı ve gaz örnekler incelenebilir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve ardından gaz fazındaki örneğin analizi gerçekleştirilir [106].

HPLC-MS cihazı, HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere 4 temel kısımdan oluşmaktadır.

3.4.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Kızılötesi (IR) ışınların absorpsiyonuna dayanan bir tür titreşim spektroskopisidir. Bu yöntem, analiz edilecek maddenin atomik bağlarının kızılötesi ışığa maruz kaldığında oluşturdukları titreşimler belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmesinin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir.

Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

Ayrıca biyokimyasal olarak; karbonhidrat, fosfolipit, aminoasit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyicidir.

Örneklerin FTIR analizleri, Perkin Emler Spectrum One Universal ATR Sampling Accessory FTIR Spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Dalgaboyu aralığı 4000-450 cm^{-1} arasındadır. Spektrumlar 8 cm^{-1} duyarlılıkla ve spektrofotometrenin her 4 taramasının ortalama sonucu alınarak elde edilmiştir.

3.4.6 Floresans Spektroskopisi

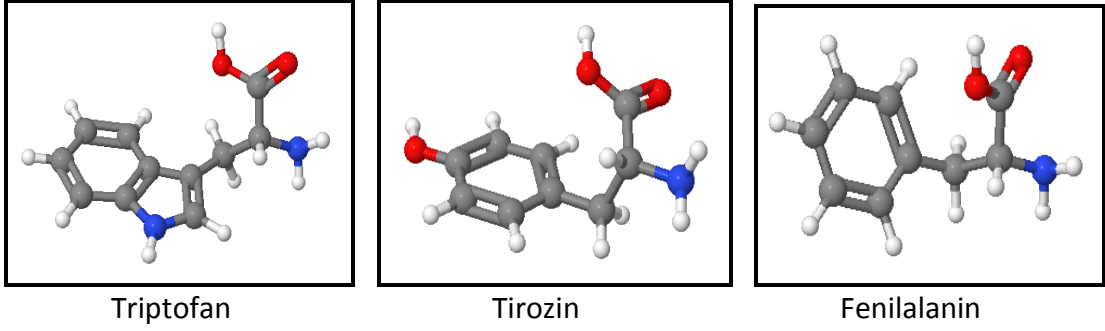
Spektroskopi dallarından olan moleküler floresans spektroskopisinin fizik ve yaşam bilimlerine uygulamaları son yıllarda çok hızlı gelişmiştir. Günümüzde floresans teknikleri, fizik, kimya, biyoloji, eczacılık, tıp, toksikoloji gibi birçok disiplinleri kapsayan alanlarda çalışan araştırmacıların ilgi konusudur. Floresans spektroskopisine karşı olan ilginin artmasının sebebinin, zaman ayırımı hassasiyetindeki gelişim, veri analiz metodları ve enstrümantasyondaki ilerlemeden dolayı olduğu bilinmektedir [107].

Floresans spektroskopisi, uyarılmış bir molekülün temel hale dönerken yaptığı emisyonun incelendiği spektroskopi dalıdır. Hassaslık derecesi olarak diğer spektroskopi dallarının en üstünüdür. Floresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassaslıkla tayin edilebilir. Bu metodun seçiciliği yüksektir. Çalışma aralığı görünür bölgededir [107] [108], [109], [110], [111], [112], [113]

Floresans olayı iki proses içerir: bunlardan birincisi absorpsiyon, bunu izleyen ikinci proses ise emisyondur [113].

Elektromagnetik dalga katı, sıvı veya gaz tabakasına geçtiğinde, bazı dalga boylarının seçici olarak ortamdan alındığı gözlenir. Bu süreçte elektromagnetik dalga, enerjisinin bir kısmını numuneyi oluşturan atom, iyon veya moleküllere aktarır. Bu olaya absorpsiyon denir. Enerjiyi absorplayan bu parçacıklar temel halden uyarılmış hale geçer. Absorpsiyonun geçiş süresi yaklaşık 10^{-15} saniye civarındadır [114].

Uyarılmış bir atom veya molekül uyarılmış halde yaklaşık olarak 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar temel hale geri döner. Bir molekülün yüksek enerji düzeyinden daha düşük enerji düzeyine geçiş yaparken, sahip olduğu fazla enerjiyi foton olarak yayar. Bu olaya emisyon denir [114].



Şekil 3.3Doğadaki floresans özellikli aromatik amino asitler: Triptofan, Tirozin ve Fenilalanin.

Çizelge 3.4Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninin soğurma ve floresans dalgaboyu değerleri.

Aromatik Aminoasit	Işını en çok soğurduğu dalgaboyu (nm)	Işığın maksimum yaydığı dalgaboyu (nm)
Triptofan	280	348
Tirozin	270	303
Fenilalanin	260	282

Fotonun enerjisinde meydana gelen kayıp nedeniyle, floresansın dalga boyu, uyaran ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Çünkü emisyonu sağlayan geçiş, bir kısım titreşim enerjisinin çevreye atılmasından sonra meydana gelir. Absorpsiyona göre emisyonda daima daha büyük dalga boylarına doğru bir kayma (Stokes Shift) izlenir, buna Stokes Kanunu denir.

Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes kayması nispeten daha uzun dalgaboylarında gözlenebilir.

Elektromagnetik dalgayı temsil eden fiziksel büyüklüklerin birbiri ile ilişkisi şöyledir;

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad 3.2$$

Denklem 3.2, fotonun enerjisi ile dalgaboyu arasındaki bağıntıyı vermektedir. Burada; E, fotonun enerjisini; h, Planck Sabitini ($\cong 6,62 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$); c ise ışık hızını ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$) temsil etmektedir.

Floresans özellik gösteren aromatik amino asitlerin yapı içerisindeki konformasyonel değişiklikleri ve diğer moleküller olan etkileşimleri sonucunda uyarılmaları için gerekli enerji miktarı değişecektir. Denklem 3.2'den de anlaşıldığı gibi, enerjide meydana gelen değişim nedeniyle emisyon dalga boyu yani floresans yaptıkları dalga boyu değişecektir.

Floresans ömrü ve kuantum verimi floroporun en önemli özelliğidir. Kuantum verimi, çözeltideki floresans gösteren moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır. Bir başka deyişle, salınan foton sayısının absorplanan foton sayısına oranıdır [115].

$$Q_f = \frac{\text{yayımlanan foton miktarı; floresans şiddeti } (I_f)}{\text{absorplanan foton miktarı } (I_a)} \quad 3.3$$

Denklem 3.3'deki absorplanan foton miktarı,

$$I_a = I_0 - I_t \quad 3.4$$

Denklem 3.4'de I_0 , örneğin üzerine gelen ışık şiddeti, I_t ise ışının örnekten geçtikten sonraki şiddetidir [115].

Floresans ömrü ise, uyarılmış seviyedeki molekülün temel elektronik seviyeye geçmeden önce geçirdiği zamana denir. Birçok aromatik molekülün floresans ömrü 10 ns. civarındadır.

Floresans ömür maddenin türüne, floresans bozunma süresi ise maddenin hem türüne hem de konsantrasyonuna bağlıdır. Her iki parametre de maddenin içinde bulunduğu ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ve ortamın içerdiği diğer floresans maddelerin varlığından etkilenir. Bu veriler floresans maddenin çevresi ile etkileşimleri hakkında detaylı bilgi sağlar.

Floresans spektroskopisinin diğer spektroskopi dallarına göre hassaslığının yüksek olmasından dolayı, floresans özellikli biyomoleküllerin analizi için kullanılmaktadır. Peptid ve proteinlerin yapı işlev analizlerinde özellikle tercih edilen ve başarıyla kullanılmakta olan bir yöntemdir. Floresans ömrünün (Lifetime) tayini, eksite edilmiş moleküllerin özelliklerinin araştırılması, kompleks oluşum mekanizmasının

tanımlanması, çözücü-çözünen etkileşiminin incelenmesi, izomerizasyon, difüzyon, misel özelliklerinin araştırılması, yüzey özellikleri, polimer yapısı ve dinamiği, enzim yapısı, antijen-antikor etkileşiminin incelenmesi, biyomembran özellikleri, floresans rezonans enerji transferi (FRET) yöntemi yardımı ile donör ile akseptör arasındaki mesafe ilişkisinin açıklanması floresans spektrometrelerin kullanım alanlarına örnek olarak sıralanabilir [94], [116].

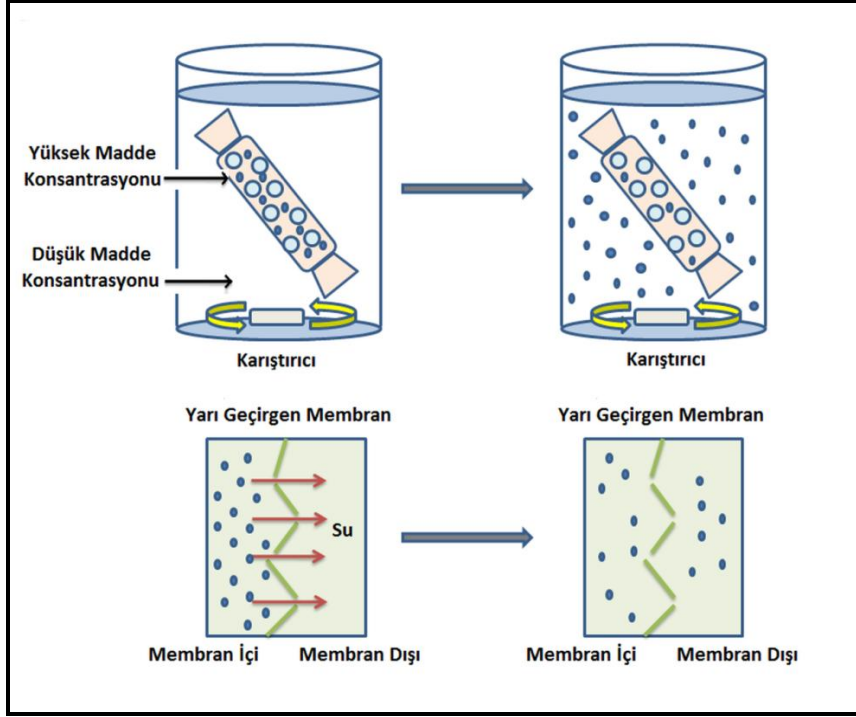
3.5 Konjugatların Saflaştırılması

Sentezlenen konjugatlar, bu tür reaksiyonlarda oluşması kaçınılmaz üre türevi veya reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından diyaliz ve santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri ile) gibi yöntemlerle arındırılır.

3.5.1 Diyaliz

Temel prensibi, tüm maddelerin, kimyasal potansiyellerinin (madde akımının yürütücü kuvveti) büyük olduğu yerden küçük olduğu yere doğru kendiliğinden akmasına dayanan işleme diyaliz denir. Kimyasal potansiyellerin her iki tarafta birbirine eşit olduğu durumda dinamik denge oluşur ve madde geçişi denge durumunda da devam etmesine rağmen konsantrasyon değişimi olmaz. Kullanılan diyaliz torbalarının por çapı 1-20 nm arasında selüloz asetattan yapılmıştır.

Diyaliz yöntemi, protein, peptid ve konjugat çözeltilerinin saflaştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Polimer-peptid, protein-peptid konjugatlarının diyalizindeki amaç, konjugasyon sonucunda oluşan üre türevlerinin, reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlalıklarının veya bağlanmamış serbest peptidin hazırladığımız konjugat çözeltimizden uzaklaştırılmasıdır.

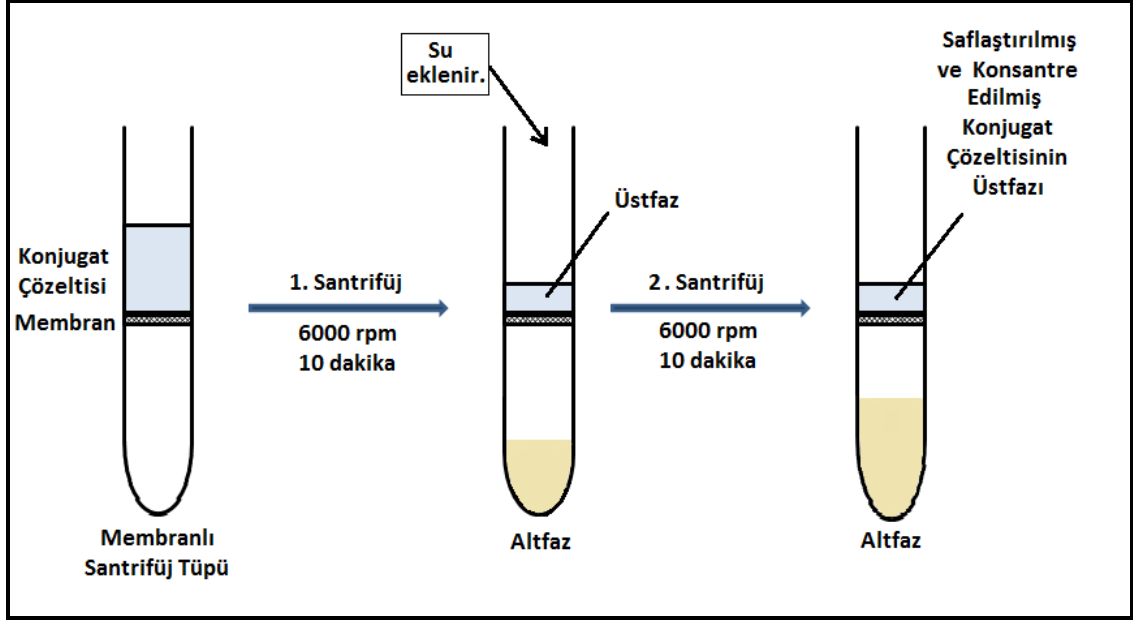


Şekil 3.4Diyaliz yönteminin şematik görünümü

3.5.2 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Değişik boyutlardaki molekülleri ayırmak için dizayn edilmiş membranlı santrifüj tüpleri, konjugatların oluşumu sırasındaki çözeltide kalan istenmeyen moleküllerin uzaklaştırılmasında kullanılır.

Bu tez çalışmasında hazırlanan konjugatlar, 10.000 M_w ayırma gücüne sahip polietersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) $+4^{\circ}C$ 'de 6000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Altfaz ve üstfaz olmak üzere iki faz elde edildi. Altfazda safsızlık dediğimiz istenmeyen moleküller, üstfazda ise saflaştırılmış ve konsantre edilmiş konjugatımız ayrılmıştır.

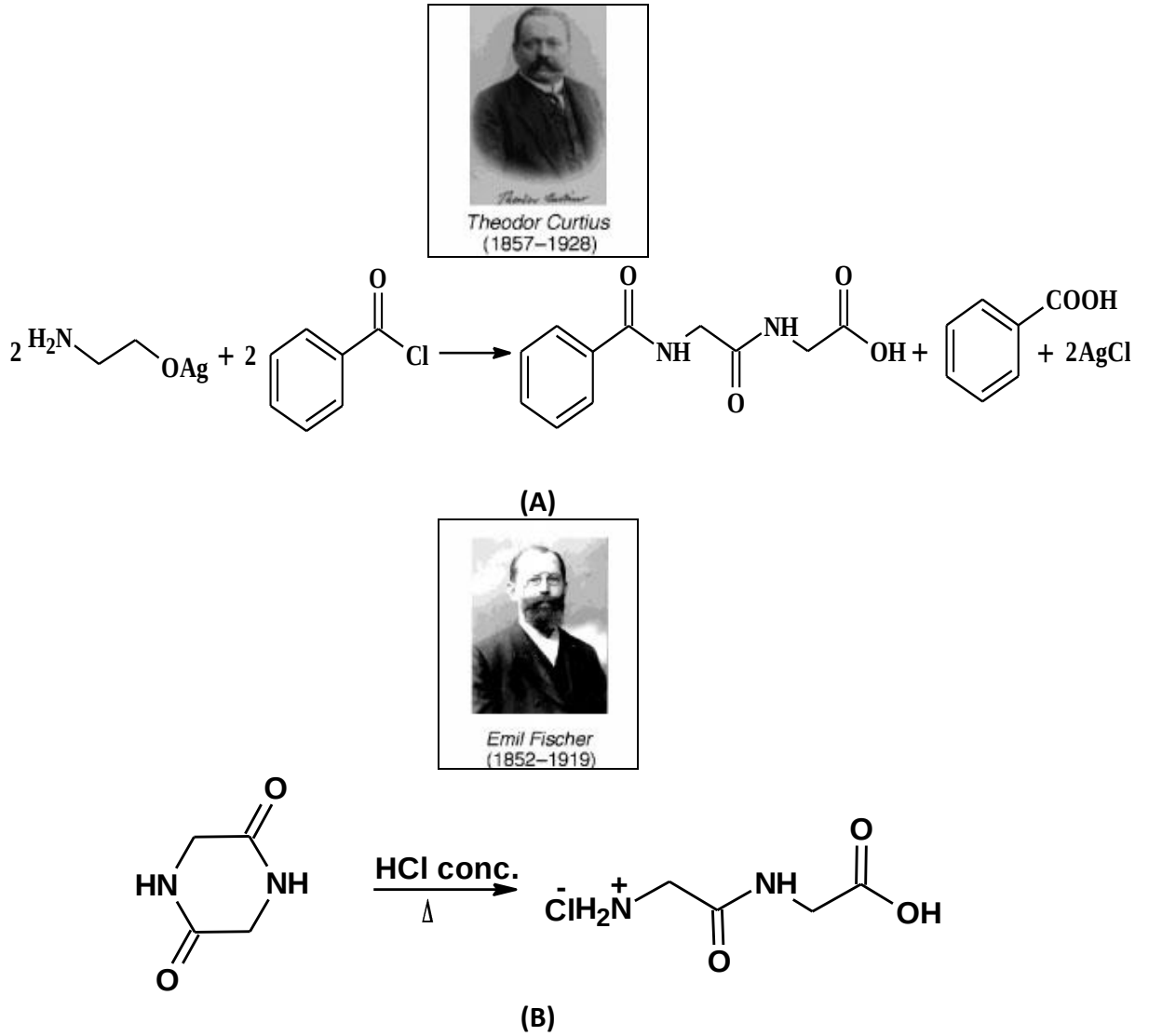


Şekil 3.5 Konjugatların PES membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi [117].
Saflaştırıp, konsantre ettiğimiz konjugatların alt ve üstfazlarının analizleri spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle yapılmıştır.

3.6 Peptidlerin Sentezi

Peptid ve proteinlerin yer aldığı biyolojik işlemlerin ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olmak, bu işlemlerin kontrolü ve sonuçları bakımından büyük önem taşımaktadır. Peptidler hücre-hücre haberleşmesi, metabolizma, immün cevap ve üreme gibi pek çok biyokimyasal işlemde yer almaktadır [118], [119]. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda çok önemli roller üstlenmeleri onların birer potansiyel ilaç adayı olmalarına artırıcı etki göstermektedir [120].

Bilinen ilk peptid türevi sentezini (benzoilglisilglisin) 1882 yılında Theodor Curtius gerçekleştirmiştir. Theodor Curtius doktora tezi sırasında ilk N- ucu korunmuş dipeptid olan benzoilglycylglycine'i, glisinin gümüş tuzu ile benzoil kloridi reaksiyona sokarak elde etmiştir [Curtius, 1882]. Emil Fischer ise 1901 yılında serbest dipeptid olarak glükoglisin'i, glisinin diketopiperazininin hidrolizi ile sentezlemiştir [121].



Şekil 3.6(A)Theodor Curtius'un çalışması, (B)Emil Fischer'in çalışması [122].

Peptid sentezi klasik çözelti yöntemi ve katı faz yöntemleri olmak üzere iki kategoride toplanmaktadır. Son yıllarda klasik çözelti yöntemi ile kısa peptid dizilerinin sentezi ilaç sektöründe devamlılığını korusa da, özellikle uzun peptid dizilerinde katı fazda peptid sentezi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır [123].

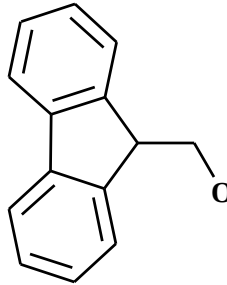
Katı faz tekniğinin çözeltiyle yapılan sentezlere göre oldukça fazla avantajları bulunmaktadır. Katı faz tekniğinde, çözünmeyen reçineye bağlı peptid, reçinenin yıkanması veya filtrasyonu sırasında önemli bir kayba neden olmadan ayrılmaktadır. Tüm reaksiyonların tek bir haznede gerçekleştirilmesi ile, kap değiştirme ve aktarma gibi işlemler sırasında olası kayıplar engellenmiştir [124].

3.6.1 Katı Faz Peptid Sentezi

1962 yılına kadar birçok organik kimyacının üzerinde çalıştığı peptid sentezi, çözelti fazında gerçekleştirilmekteydi. 1962 yılında, Bruce Merrifield, polipeptidlerin çözünmeyen katı bir polimer destek (reçine) üzerine bağlanarak kimyasal olarak sentezlenmesini araştırmış [125] ve geliştirdiği metodla ilgili olarak 1984 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür [126]. Aynı zamanda, ilk yarı otomatik peptid sentez cihazı da Merrifield tarafından geliştirilmiştir [Jakubke ve Sewald, 2008].

SPPS tekniği, büyüyen zincirin (peptid ya da başka tür oligomer) durgun ve katı bir parçacık (katı faz, reçine) üzerine tutturulması ve sentez boyunca bu reçine üzerine bağlı kalmasıdır. Son adımda, istenilen ürün reçineden kırma işlemi ile ayrılır [124].

Katı faz peptid sentezinde kullanılan polimerik destek maddeleri için gerçek katılardan daha çok jeller tercih edilmektedir. Peptid sentezi esnasında gerçekleşen reaksiyonlar polimerin partikülleri arasında olmaktadır. Bu nedenle seçilecek olan reçinelerin, çözücülerde şişmesi ve reaktanların bu polimerin partikülleri ile difüzyon yoluyla etkileşimleri gerekmektedir. Bu yöntemde, amino asitlerin N uçları ve yan zincirleri (R) koruma grupları ile korunmaktadır. Koruma grupları ile hem amino asidin yan zincirlerinin birbirleri ile reaksiyona girmeleri engellenmiş olur hem de diziyeye her amino asitin eklenmesiyle dizinin sadece bir amino asit uzaması sağlanmış olur. Bu amaçla, baza karşı duyarlı ve piperidin, piperazin gibi bazlarla kolayca uzaklaştırılabilen bir N α koruma grubu olan Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) peptid sentezinde kullanılmaktadır [127].



Şekil 3.7 Fmoc N α koruma grubu

3.7 Floresans Enerji Transferi Yöntemi İle Mesafe Hesabı

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisi, peptid/polimer biyokonjugasyonunu sayısal değerler ile aydınlatılmak için model olarak seçilmiştir. Floresans Rezonans Enerji Transferi deneylerinde bu peptid dizisinin poliakrilik asit ile biyokonjugatı kullanılmıştır. Bu peptid dizisinin en önemli özelliği, N-terminal ucunda donör olarak görev yapacak olan **Triptofan** amino asidinin ve üçüncü amino asit rezidüsü olarak akseptör molekülünün bağlanacağı **Lizin** amino asidinin bulunmasıdır.

Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi için seçtiğimiz boya olan, kararlı blue yada blue-green fluorescent sulfonamid boya bileşimi üretmek için alifatik ve aromatik aminlerdeki birincil amino grupları ile reaksiyona giren, Dansyl Chloride kullanılmıştır.

Biyokonjugat oluşumu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile ispatlanan, Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin poliakrilik asit ile sentezlenen biyokonjugatı liyofilizatör ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra pH=9,2 borat tamponunda çözündürülmüştür. Deneyde kullanılacak boya olan DNC ise konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde asetonitrilde çözündürülmüştür.

Hem peptid hem de biyokonjugat için boyanın inkübasyon (karanlık ortamda) süresi optimize edilmiş ve 5 dakika olarak bulunmuştur.

3.8 Modelleme Çalışmaları

Biyolojik moleküllerin yerine getirdikleri fonksiyonlar, doğrudan doğruya moleküllerin uzaysal yapıları ile ilgilidir. Biyolojik reaksiyonların aydınlatılabilmesi için etkileşmekte olan moleküllerin konformasyonlarının belirlenmesi büyük önem taşır. Biyolojik moleküller kendi fonksiyonlarını sahip oldukları enerjinin minimum değerinde yerine getirirler. Molekülleri incelerken, moleküle dahil olan atomlar arasında mevcut olan bütün karşılıklı etkiler göz önüne alınarak, molekülün geometrik yapısını ve mümkün yapılarını ve bunlara karşılık gelen enerjileri belirtmeye imkan veren metoda Teorik Konformasyon Analizi Metodu denir [128], [129].

Moleküller, biyolojik aktivelerini en kararlı durumuna karşılık gelen temel elektronik enerji düzeylerinde gösterirler. Moleküllerin biyolojik aktiviteleri belirlenirken, molekülün serbest halde ve en kararlı konformasyonunun belirlenmesi gerekmektedir.

Moleküler enerji hesaplamalar için üç farklı metod vardır; Moleküler Mekanik Metod, Kuantum Mekanik Metod ve Yarı Deneysel(semiampirik) Metod. Bu tez çalışmasında Moleküler Mekanik Metod kullanılmıştır. Kuvvet alanı yöntemi olarak da bilinen moleküler mekanik yöntemlerde, moleküllerin özelliklerini ve yapılarını tahmin etmede klasik fizik yasaları kullanılır. Moleküler mekanik hesaplamalarda, moleküler sistemlerin elektronları hesaba katılmazken çekirdek etkileşimleri esas alınır. Elektronların etkileri dolaylı olarak kuvvet alanlarında parametre olarak yer alır [129].

Moleküler mekanik hesaplamalar çok büyük ve simetrisi olmayan protein, polimer ve enzimler için de kullanılır. Bu yöntem oldukça hızlıdır ve temel haldeki sistemin enerjisini tam olarak hesaplayabilir [128], [129].

HYPERCHEM, QUANTA, SYBYL, ALCEMY, AMBER, CHARMM, MMx ve OPLS gibi programlarda kullanılır.

BÖLÜM 4

DENEYSEL KISIM

4.1 Kullanılan Peptid Dizileri

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü'ne ait dört farklı peptid dizisi kullanılmıştır. Bunlardan iki tanesi bölümümüz Peptid Sentezi Laboratuvar'ında sentezlenmiştir. Diğer iki peptid dizisi ise ticari olarak alınmıştır. Her bir dizinin fizikokimyasal yapısı ve antijenik özelliği farklılık göstermektedir.

Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan peptid dizileri.

DİZİNİN ADI	PEPTİD DİZİSİ	
Influenza A Hemagglutinin H3N2 91-108	WSKAFSNCYPYDVPDYASL	Sentez
Influenza A Hemagglutinin H3N2 91-106	WSKAFSNCYPYDVPDYA	Ticari
Influenza A Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106	YPYDVPDYA	Sentez
Influenza A M2e Proteini	WETPIRNEWGCRGETPIRNEWGCR	Ticari

4.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptid Dizisi

Influenza A virüsü lipid zarfı içinde, yapısal fonksiyonda rol oynadığı düşünülen M proteini bulunmaktadır. Virüsle infekte hücre yüzeyinde bol miktarda salınan integral homotetramerik M2e proteini, aslında viriyonun en az miktarda bulunan bileşenlerinden biridir. Bu protein virüs replikasyonu için zorunlu değildir; virüsün zarfından arınması esnasında, protonların viriyona girişini sağlayan iyon kanalı olarak

işlev görür. Enfekte hücrelerin salgı yolunda pH'ı ayarlarak yeni sentezlenmiş HA moleküllerini stabilize eder. M2e proteini Influenza A ve C virüslerinde az miktarda bulunur, Influenza B virüsünde ise hiç bulunmaz [2], [34], [35].

Influenza A Virüsü M2e proteini peptid dizisinin diğer peptid dizilerinden en önemli farklarından bir tanesi yüzey proteinine ait bir epitop olması, insanları enfekte eden birçok Influenza Virüsüne karşı antijenik özellik göstermesidir [130], [131].

Influenza A Virüsü M2e proteini peptid dizisi 24 amino asit rezidüsünden oluşmaktadır. Peptid dizisinin –N terminal ucuna Triptofan amino asidi, peptid ile polielektrolitler arasındaki konjugasyon mekanizmasını daha kolay saptayabilmek ve konjugasyon oluşumunu spektroskopik olarak gözlemleyebilmek amacıyla eklenmiştir. Peptid dizisinin amino asit dizilimi aşağıdaki gibidir.

Trp-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg-Gly-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg

Çizelge 4.2 Influenza A Virüsü M2 proteini peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı

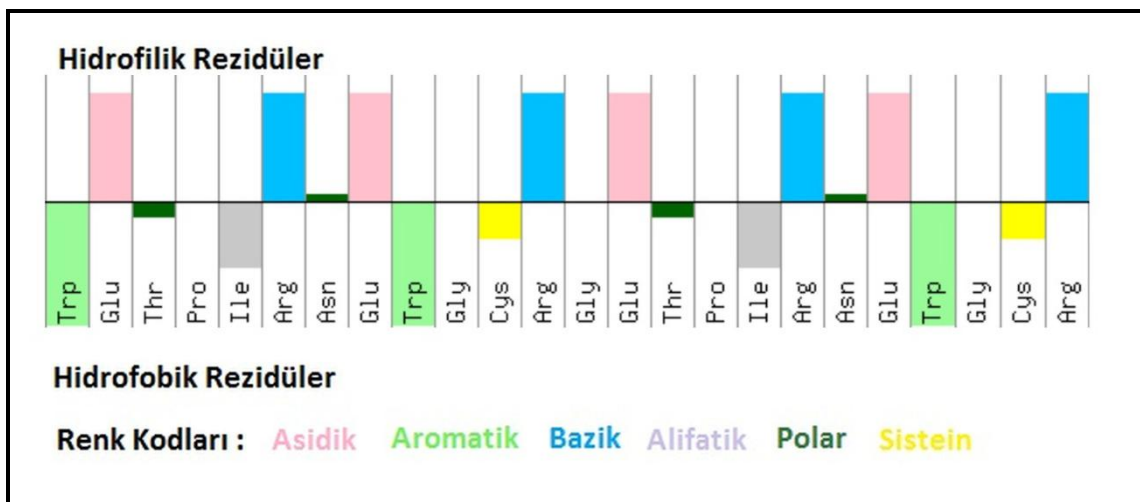
Amino asit	Adet
Trp	3
Glu	4
Thr	2
Pro	2
Ile	2
Cys	2
Arg	4
Asn	2
Gly	3

- Bu peptid dizisi toplam içerdiği 3 **Triptofan** rezidüsü ile diğer peptid dizilerinden farklıdır. Yapısında sadece aromatik amino asitlerden Triptofanı içermesinden dolayı bu tez çalışmasında kullanılan diğer peptidlere göre kuantum verimi daha yüksektir. Farklı spektroskopik ve kromatografik özelliklere sahiptir. Kompozisyonunda yer alan çok sayıdaki **Glutamik Asit** ve **Arjinin** gibi oldukça hidrofilik yan zincire sahip amino asitler sayesinde, bu peptid dizisinin suda çözünürlüğü oldukça yüksektir. Çünkü gerek sulu çözeltide su molekülleri ile,

gerekse konjugasyon reaksiyonları sırasında kompleks oluşurken taşıyıcı makromoleküller ile etkileşimlerinde H bağları yaparak üç boyutlu yapıya katkıda bulunurlar. Peptid dizinde H bağına katkıda bulunan diğer bir amino asit ise **Treonin**'dir. Yan zincirinde yer alan –OH grubu su ile etkileşerek çok sayıda H bağı oluşturur.

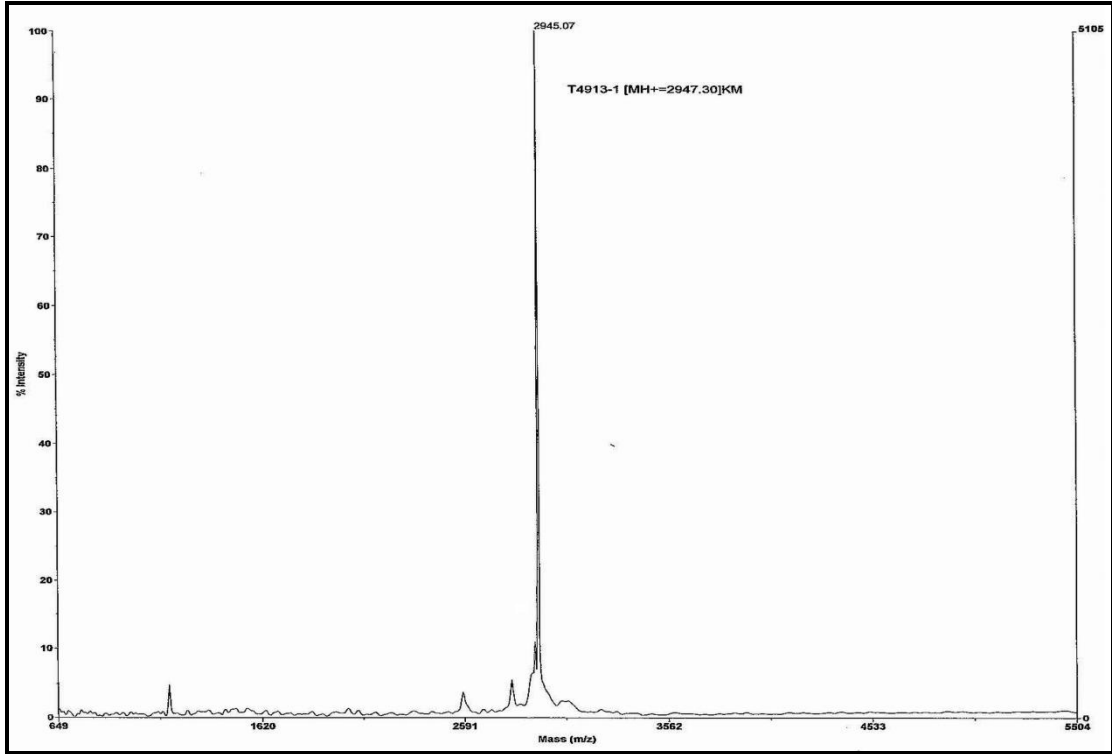
•**Prolin** amino asidinin yapının hareketini kısıtlayıcı etkisine rağmen, bu peptid dizinde yeralan 3 adet **Glisin**, bulunduğu yerde peptide diğer amino asitlerden daha fazla fleksibilite kazandırır. Peptidin yapısındaki **Sistein** amino asiti, kendi arasında bağlanma eğilimine sahiptir. Sisteinin pKa değeri 8,3 dür, bu değerde ve ancak bunun üzerinde peptid dizisi içindeki sistein amino asitleri kendi aralarında bağlanabilirler. Oysa bizim konjugasyon koşullarımızın pH=5'de gerçekleşmesinden dolayı, bu bağlanma riski ortadan kalkmaktadır. **İzolösün**, oldukça hidrofobik bir amino asittir, bu nedenle de hidrofobik etkileşime katkı sağlarlar. **Asparajin**, Aspartik asidin amid türevidir ve yan zincirindeki amid grubu, ne asidik ne de baziktir ama polardır ve hidrojen bağı oluşumuna katılır.

Bu peptid dizisinin molekül ağırlığı 2.946,30 Da, pH 7'deki net yükü -0,1 ve izoelektrik noktası 6,4'dür. Dizinin ortalama hidrofilitiği 0,3 ve dizinin hidrofilik rezidülerinin toplam rezidülerine oranı ise %42'dir.

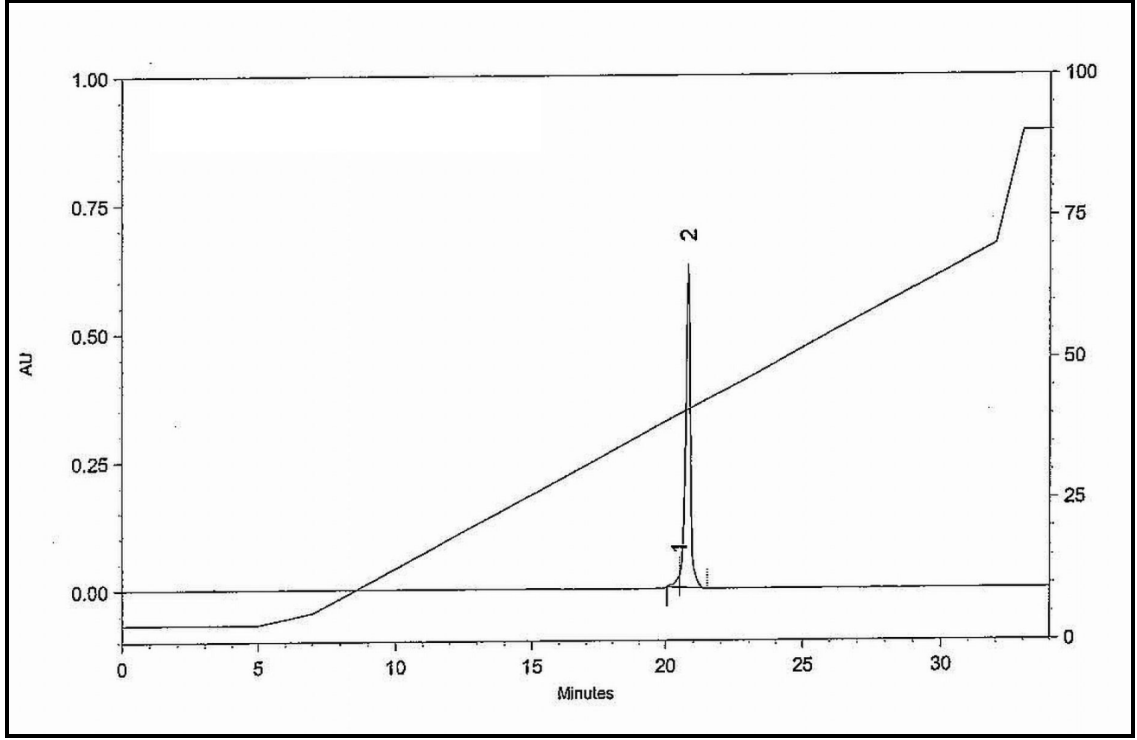


Şekil 4.1 Influenza A Virüsü M2 proteini peptidinde hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.

Hidrofilik ve hidrofobik rezidülerin birbirine oranlarından ve Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi bu peptid dizisi hidrofilik bir dizidir. Sulu ortamda çözündüğü için su ile çözündürülmüştür.



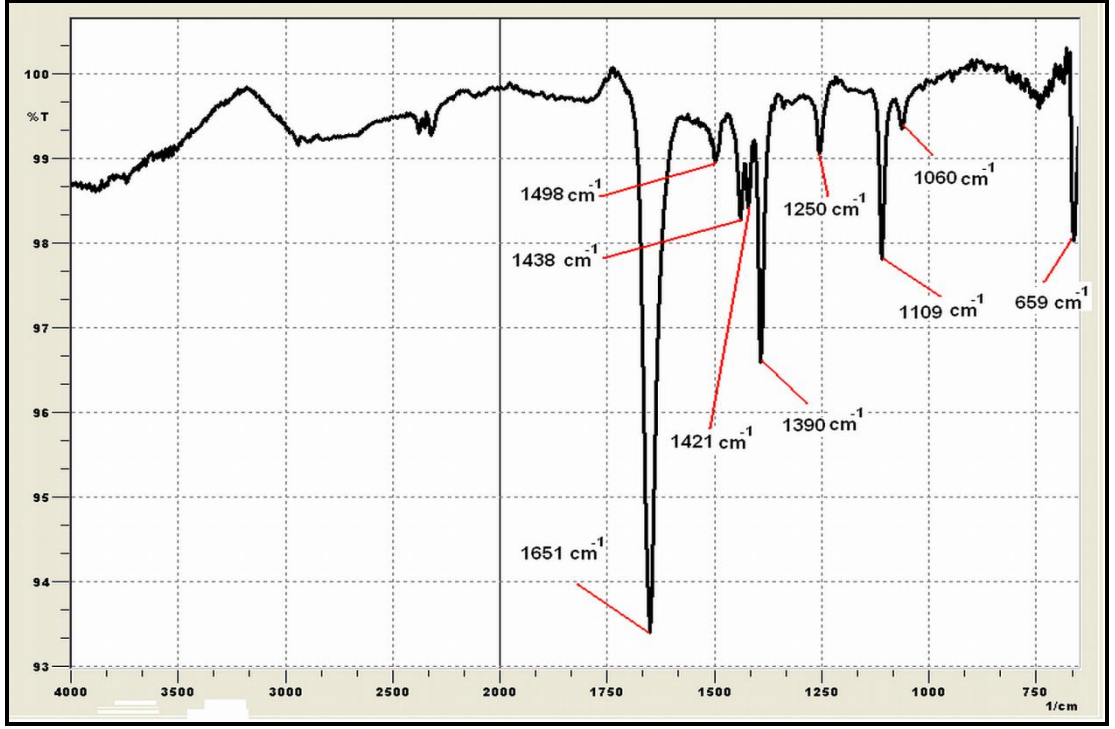
Şekil 4.2 Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait MALDI-TOF sonucu.
Operasyon modu: Lineer, Polarite: Pozitif, Kalibrasyon Matrisi: a-Cyano-4-
hidroksicinnamic asit



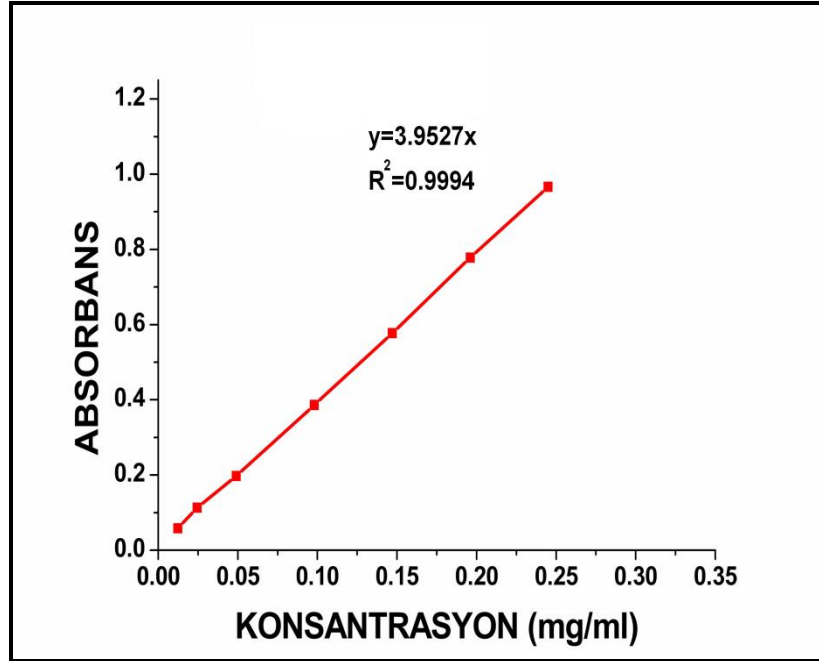
Şekil 4.3 Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait LC-MS sonucu. Solvent A: %0,05 TFA in H₂O. Solvent B: %0,05 TFA in ACN. Dalga boyu: 280 nm Kolon: C18, 10µm, 4.6x250MM.

Çizelge 4.3 Influenza A Virüsü M2e proteini peptidine ait pik değerleri tablosu.

PİK	ALIKONMA ZAMANI	YÜKSEKLİK	YÜKSEKLİK YÜZDESİ	ALAN	ALAN YÜZDESİ
1	20.483	20414	3.136	220783	2.879
2	20.800	630474	96.864	7447844	97.121
TOPLAM		650888	100.000	7668627	100.000



Şekil 4.4 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidine ait FTIR grafiği.



Şekil 4.5 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin UV kalibrasyon eğrisi.

4.1.2 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 Peptid Dizisi

Hemagglutinin A, spesifik sialik asit reseptörlerine bağlanarak eritrositleri aglütine edebilme yeteneğinden dolayı bu isimle adlandırılmıştır. HA'ın, Influenza virüsünün replikatif döngüsü boyunca bilinen üç rolü vardır.

- Hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanır, bu da virus partikülünün hücreye tutunmasını sağlar.
- Virüsün endositoz yoluyla alındıktan sonra membranının füzyona uğrayarak hücre sitoplazması içine penetrasyonundan sorumludur, bunun sonucunda viral nükleokapsid sitoplazma içinde serbest kalır.
- Nötralizan antikor oluşumuna neden olan önemli bir virüs antijenidir. Influenza epidemileri, HA'ın antijenik yapısındaki değişikliklerle ilgili olarak meydana gelir [5], [33]

Bu tez çalışmasında 91-108 peptid dizisinin –N terminal ucuna Triptofan amino asidi, peptid ile polielektrolitler arasındaki konjugasyon mekanizmasının saptayabilmek ve konjugasyon oluşumunu spektroskopik olarak gözlemleyebilmek amacıyla eklenmiştir. Peptid dizisinin üç harfli amino asit dizilimi aşağıdaki gibidir.

Trp-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 peptid dizisi, aşağıdaki tabloda belirtilen amino asit kompozisyonundaki toplam 19 amino asitten oluşmaktadır.

Çizelge 4.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı

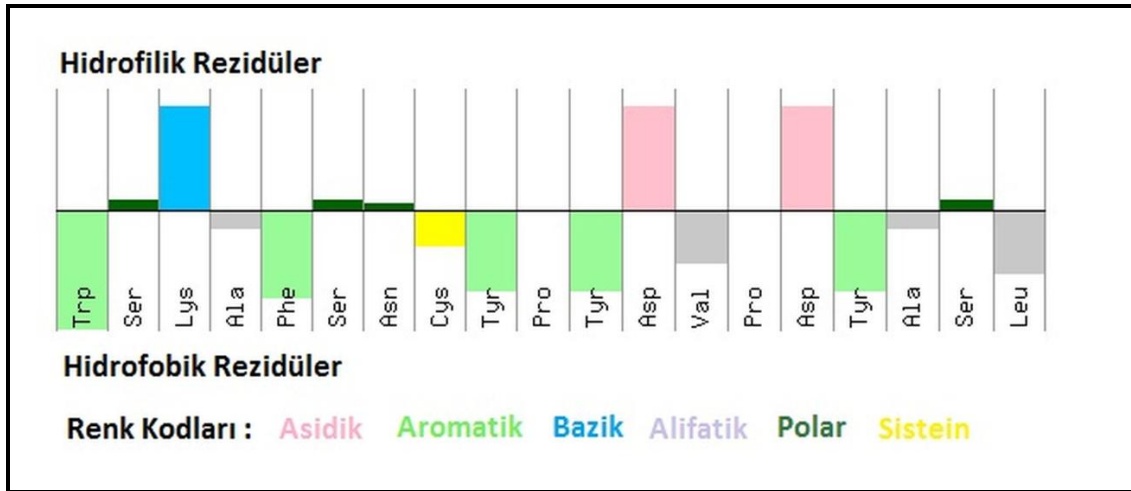
Amino asit	Adet
Trp	1
Ser	3
Ala	2
Phe	1
Asn	1
Cys	1
Tyr	3
Pro	2
Asp	2
Lys	1
Val	1
Leu	1

Bu dizide yer alan amino asitlerin diziye kattıkları özellikler ve bu peptidin sulu çözeltideki davranışlarına olan etkileri ise şöyledir:

- Dizinin ilk amino asidi olan **Triptofan**, hidrofobik ve apolar bir amino asittir. Bu nedenle de, özellikle bu peptidin sulu çözeltideki etkileşimlerinde Triptofan peptid dizisindeki diğer hidrofobik amino asitlerle etkileşerek peptidin iç kısımlarına çekilir. Ayrıca Trp, 280 nm’de UV ışını absorblama özelliğinden dolayı diziye floresans özellik kazandırmaktadır.
- Dizinin diğer hidrofobik ve apolar amino asitleri olan **Fenilalanin** ve **Tirozin**’de **Triptofan** gibi UV ışını absorblama özelliğine sahiptirler. **Tirozin**, içerdiği –OH grubu ile peptidin yaptığı Hidrojen bağlarına katkıda bulunur.
- Alanin**, **Valin** ve **Lösin** gibi oldukça hidrofobik yan zincire sahip amino asitler ise, sulu çözeltide bir araya gelerek, bu peptid dizisinin hidrofobik etkileşimlerle sabitlenmesine yardımcı olurlar. Ayrıca bu amino asitler peptidin α -heliks sarmal konformasyonu oluşturmaya da destek olurlar. Dizinin 10. amino asidi olan **Prolin** ise, dizinin tam ortasında bulunmaktadır ve yapısındaki imino grubu nedeniyle bu peptidin yapısal esnekliğini kısıtlayarak, çok daha katı bir konformasyona neden olabilmektedir.

- Dizinin polar yan zincire sahip amino asitleri; **Serin**, **Asparajin** ve **Sistein** peptidin suda çözünürlüğünü arttıran amino asitlerdendir, çünkü suda diğer aminoasitlere göre daha iyi çözünürler, yani daha hidrofilik bir yapıya sahiptirler. Ayrıca **Serin**'in taşıdığı hidroksil, **Sistein**'in sülfhidril ve **Asparajin**'in amid grupları su ile hidrojen bağları kurarak, peptidin üç boyutlu konformasyonunda önem teşkil etmektedirler.
- Kovalent konjugasyon mekanizması açısından düşünüldüğünde peptid dizisinin en önemli iki amino asidi, **Lizin** ve **Aspartik Asit**'tir. Peptid dizisinde 3. sırada yer alan **Lizin**, yan zincirde taşıdığı $-NH_2$ fonksiyonel grubu nedeniyle hem diziye hidrofilik karakter kazandırmakta, peptid dizisinin sulu çözeltilerinde, peptidin dış kısımlarına doğru yönelerek su molekülleri ile iletişime geçmektedir. Ayrıca Dansyl Klorür'ün bağlanma bölgesi olması dolayısıyla, Floresans Rezonans Enerji Transferi deneylerinin temelindeki amino asittir.
- Aspartik Asit** ise, yan zincirde $-COOH$ fonksiyonel grubunu taşır, pK_a değeri o kadar düşüktür ki, peptidin yapısına katıldıklarında bile, fizyolojik pH'da (-) yük korunur.
- Hem **Lizin** hem de **Aspartik Asit**, yüksek polariteleri ve çözünürlükleri sebebiyle, peptidin dış kısımlarında yer alarak iyonik ve hidrojen bağ oluşumuna katkı sağlamaktadırlar. Ayrıca **Lizin** PAA gibi $-COOH$ fonksiyonel grubu taşıyan polimerler ile bu peptidin konjugasyonlarında hem fiziksel kompleks oluşumuna hem de kovalent bağlanma mekanizmasına katılması açısından önem taşır.

Bu peptid dizisinin molekül ağırlığı 2226,60 Dalton, pH 7'deki net yükü -1 ve izoelektrik noktası 3,9'dur. Dizinin ortalama hidrofilikliği -0,4 ve dizinin hidrofilik rezidülerinin toplam rezidülerine oranı ise %37'dir. Peptid dizisinin molar soğurganlık katsayısı ise $9530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'dir.



Şekil 4.6 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–108 peptid dizisine ait hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.

Hidrofilik ve hidrofobik rezidürlerin birbirine oranlarından ve Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisi hidrofobik bir dizidir. Hidrofobik ve sulu ortamda çözünmediği için bu peptid dizisi %5 (v/v)'lik DMSO-su ile çözündürülmüştür.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisi Biyomühendislik Bölümü Peptid Sentezi Laboratuvarı'nda sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır [132].

4.1.3 Influenza A Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisi

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin –N terminal ucuna Triptofan amino asidi, peptid ile polielektrolitler arasındaki konjugasyon mekanizmasının saptayabilmek ve konjugasyon oluşumunu spektroskopik olarak gözlemleyebilmek amacıyla eklenmiştir. Peptid dizisinin üç harfli amino asit dizilimi aşağıdaki gibidir.

Trp-Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–106 peptid dizisi, aşağıdaki tabloda belirtilen amino asit kompozisyonundaki toplam 17 amino asitten oluşmaktadır.

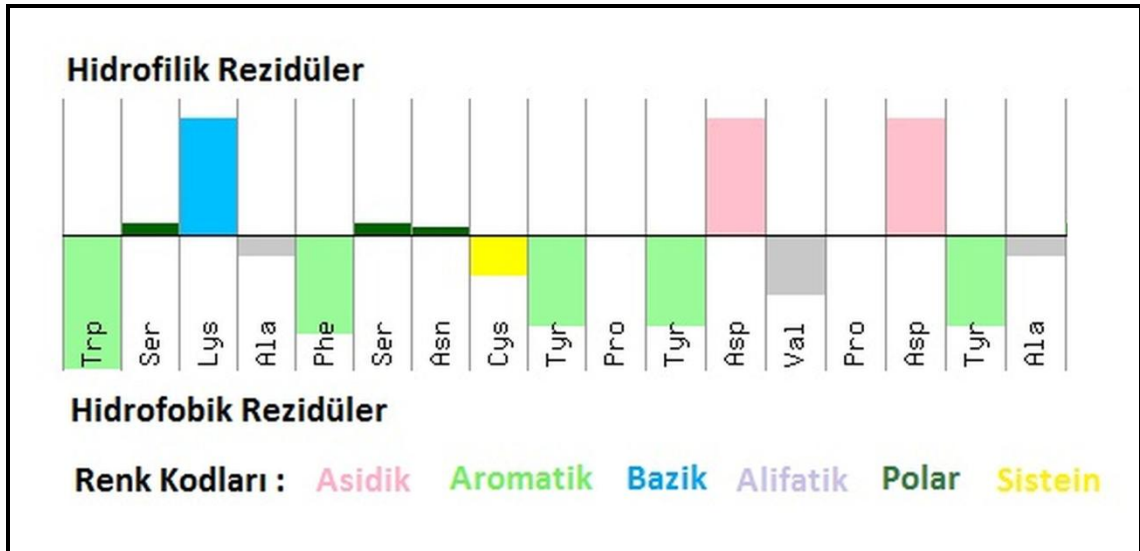
Çizelge 4.5 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–106 peptid dizisinin amino asitlerinin dağılımı.

Amino asit	Adet
Trp	1
Ser	2
Ala	2
Phe	1
Asn	1
Cys	1
Tyr	3
Pro	2
Asp	2
Lys	1
Val	1

Bu peptid dizisinde Influenza A Virüsü H3N2 91-108 dizisinden farklı olarak son konumdaki iki amino asit **Serin** ve **Lösin** eksiktir. **Serin** amino asitinin yokluğu hidrofililiği azalmış gibi görünmesine rağmen, **Lösin** amino asitinin de yokluğundan dolayı hidrobik özellik daha da azaldığı için 91-106 peptid dizisi, 91-108 dizisine göre daha az hidrofobiktir.

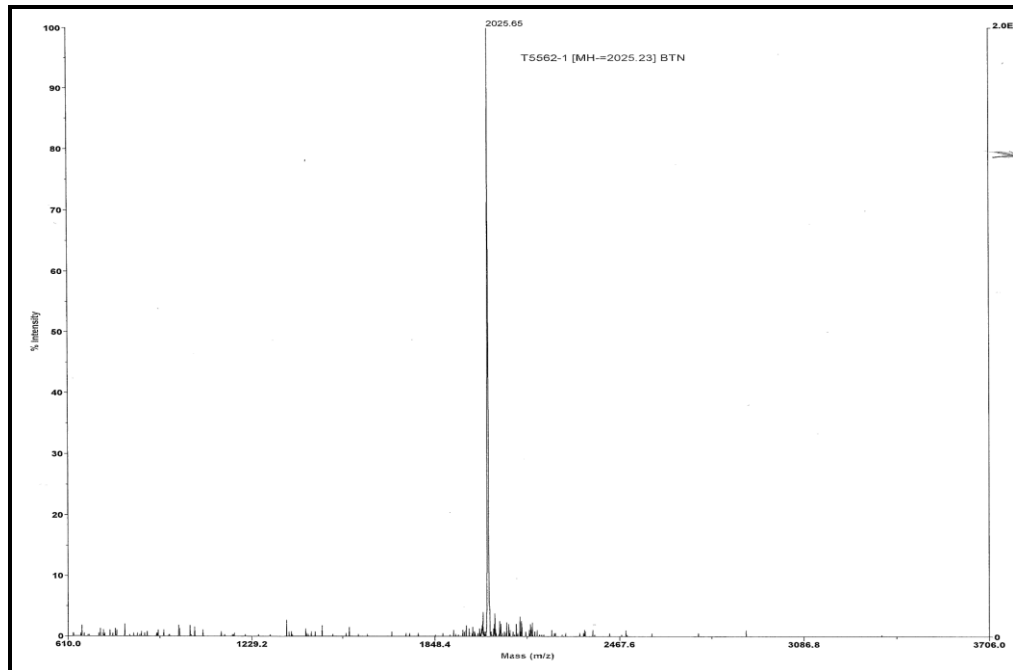
Yapısındaki **Alanin** ve **Valin** amino asitleri peptidin α -heliks sarmal konformasyonu oluşturmaya destek olurlar.

Bu peptid dizisinin molekül ağırlığı 2026.20 Dalton, pH 7'deki net yükü -1 ve izoelektrik noktası 3,9'dur. Dizinin ortalama hidrofiliği -0,4 ve dizinin hidrofilik rezidülerinin toplam rezidülerine oranı ise %35'dir. Molar soğurganlık katsayısı ise $9530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'dir.

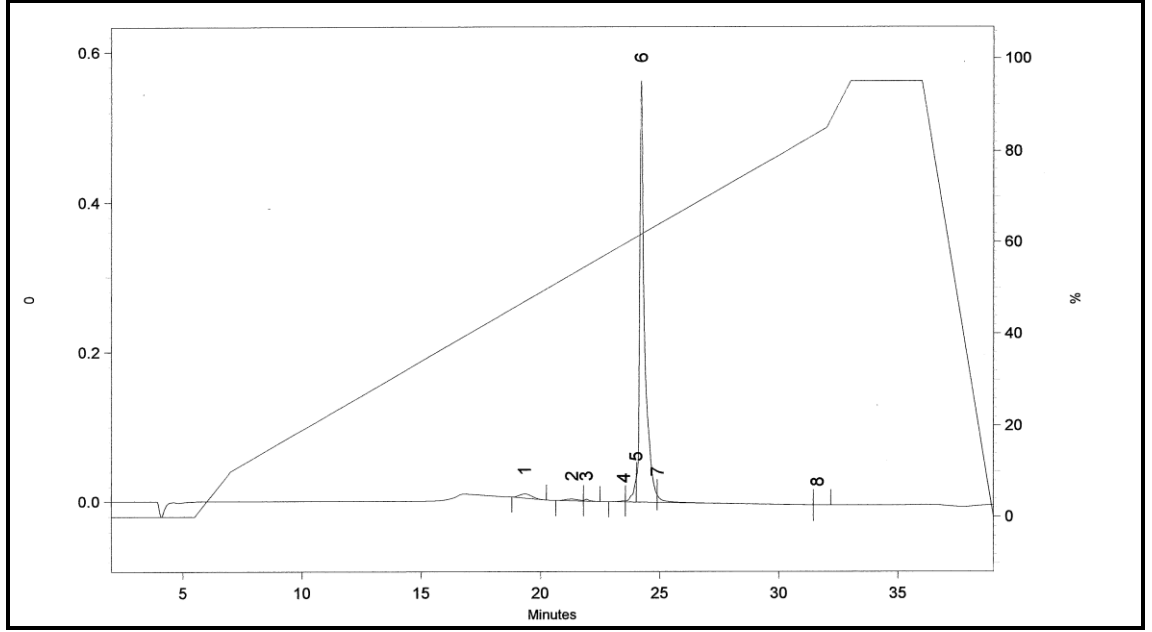


Şekil 4.7Ticari olarak alınan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91–106 peptid dizisine ait hidrofilik ve hidrofofik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.

Hidrofilik ve hidrofofik rezidülerin birbirine oranlarından ve Şekil 4.7’den de görüldüğü gibi Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi hidrofofik bir dizidir. Hidrofofik ve sulu ortamda çözünmediği için bu peptid dizisi %5 (v/v)’lik DMSO-su ile çözündürülmüştür.



Şekil 4.8Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait MALDI-TOF sonucu. Operasyon modu: Lineer, Polarite: Negatif, Kalibrasyon Matrisi: a-Cyano-4-hidroksicinnamic asit.



Şekil 4.9 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait LC-MS sonucu.
Solvent A: %0,05 TFA in H₂O. Solvent B: %0,05 TFA in ACN. Dalga boyu: 220 nm
Kolon: C18, 10µm, 4.6x250mm.

Çizelge 4.6 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidine ait pik değerleri tablosu.

PİK	ALIKONMA ZAMANI	ALAN	ALAN YÜZDESİ
1	19,333	213846	2.395
2	21,317	94739	1.061
3	21,917	38624	0.433
4	23,483	22737	0.255
5	24,000	272973	3.057
6	24,217	8121245	90.955
7	24,900	161092	1.804
8	31,617	3606	0.040
TOPLAM		8928862	100.000

4.1.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine Ait 98–106 Peptid Dizisi

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi 9 adet amino asit rezidüsünden oluşmaktadır. Bu dizide Triptofan amino asiti eklenmemiştir. Bu dizideki floresans özellik ise Triptofana göre daha düşük kuantum verimine sahip olan **Tirozin** amino asitinin rezüdülerinden meydana gelmektedir. Peptid dizisinin üç harfli amino asit dizilimi aşağıdaki gibidir.

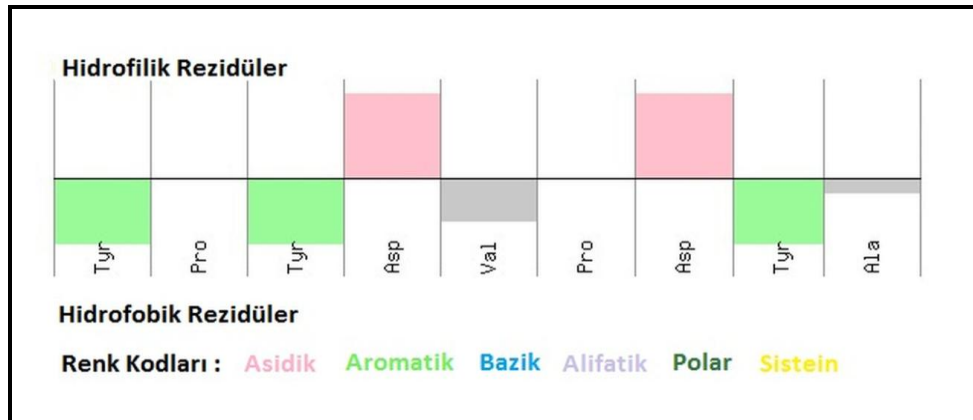
Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98-106 peptid dizisinin 91-108 peptid dizisinden en önemli farklarından bir tanesi dizide hiç Triptofan amino asidi içermemesi ve 91-108 dizisinin Triptofan rezidüsünden sonra dizinin 8. ve 16. amino asit rezidülerini kapsamasıdır.

98-106 peptid dizisinin toplam 9 adet amino asit rezidüsü bulunmaktadır. Bu amino asit rezidülerinden

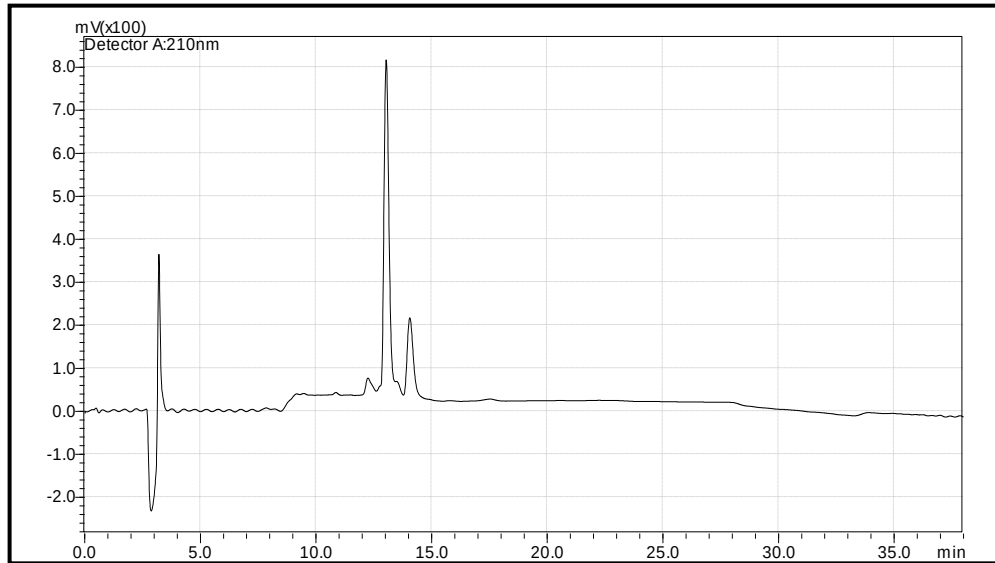
- 3 tanesi aromatik amino asittir (**Tirozin**), yani floresans özellik göstermektedir.
- 3 tanesi hidrofobik (**Prolin, Valin, Alanin**) özelliktedir. Sulu ortamda zor çözünürler.
- 3 tanesi polar yüksüz (**Tirozin**) özelliktedir. Bu amino asit rezidüleri fizyolojik pH'da su dahil olmak üzere diğer moleküllerle –H bağı yapabilirler.
- 2 tanesi polar asidik (Asp) özelliktedir. Sulu ortamda pH değeri 7 iken negatif yüklüdürler.
- Prolin, Alanin ve Valin hidrofobik etkileşimlerin yanı sıra Van Der Waals kuvvetleri ile de diğer moleküllerle etkileşirler.

Bu peptid dizisinin molekül ağırlığı 1102,2 Dalton, pH 7'deki net yükü -2 ve izoelektrik noktası 2,9'dur. Dizinin ortalama hidrofilikliği -0,3 ve dizinin hidrofilik rezidülerinin toplam rezidülerine oranı ise %22'dir.



Şekil 4.10 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisine ait hidrofobik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi.

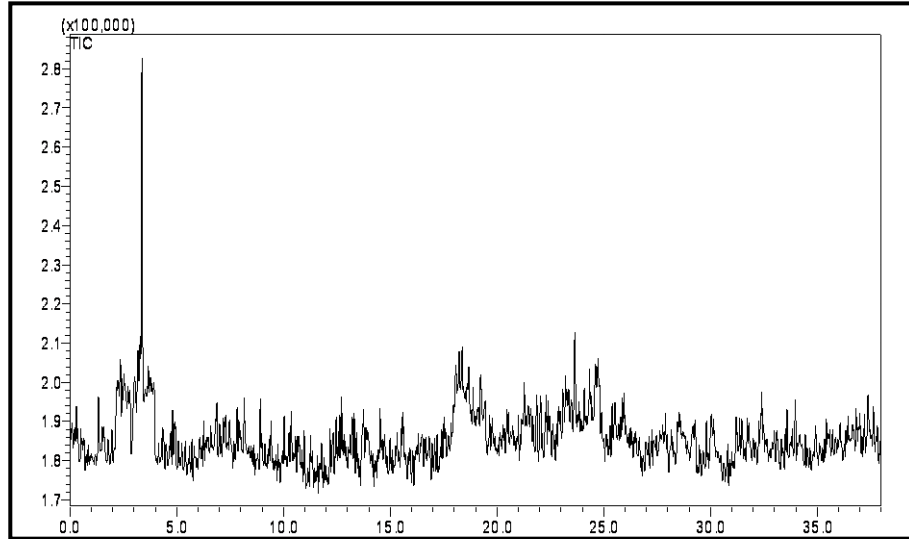
Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi Biyomühendislik Bölümü Peptid Sentezi Laboratuvarı'nda sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır.



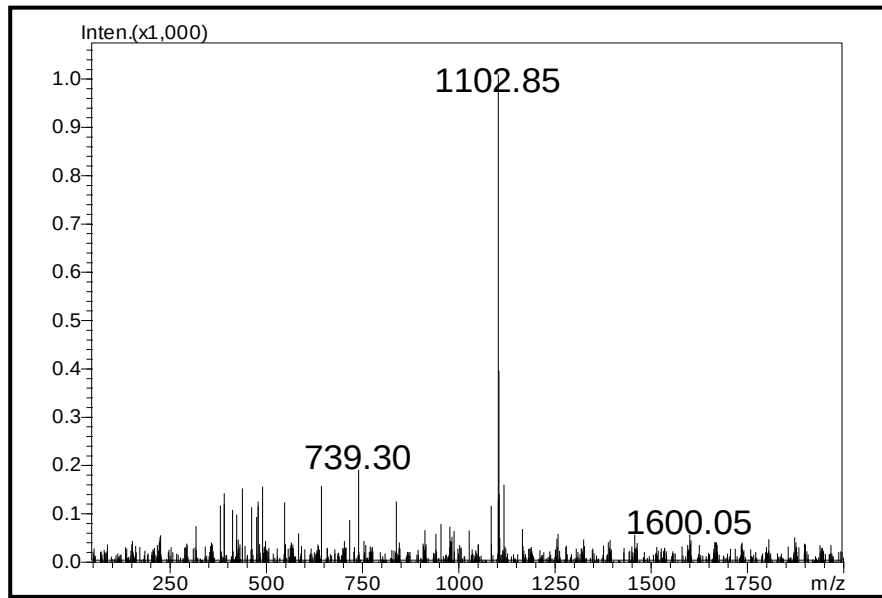
Şekil 4.11 Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin UV Kromatogramı.

CEM marka Liberty microdalga destekli peptid sentezi cihazında katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi, ve saflaştırma yapılmadan önce ham olarak LC-MS cihazında analiz edilmiştir. Ham olarak elde edilen peptid dizisine ait pikler UV Kromatogramında görülmektedir (Şekil 4.12).

Ham olarak elde edilen peptid dizisi MS cihazının iyonlaştırma ünitesinde, ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırılmış ve peptide ait toplam iyon kromatogramı elde edilmiştir. Toplam iyon kromatogramında elde edilen piklerden molekül ağırlığı hesabı yapılmıştır. Bu piklerden alıkonma zamanı 12,7'inci dakikadaki pikin kütle spektrumunda yapılan molekül ağırlığı tayininde, analiz sonucu hesaplanan (Hesaplanan $M_w=1101,89$ Da) ile teorik olarak bulunan (Teorik $M_w=1102,2$ Da) molekül ağırlığı yaklaşık olarak eşittir.



Şekil 4.12 Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.13 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmentine ait 98–106 peptid dizisinin alıkonma zamanı 12,7 dakikadaki kütle spektrumu.

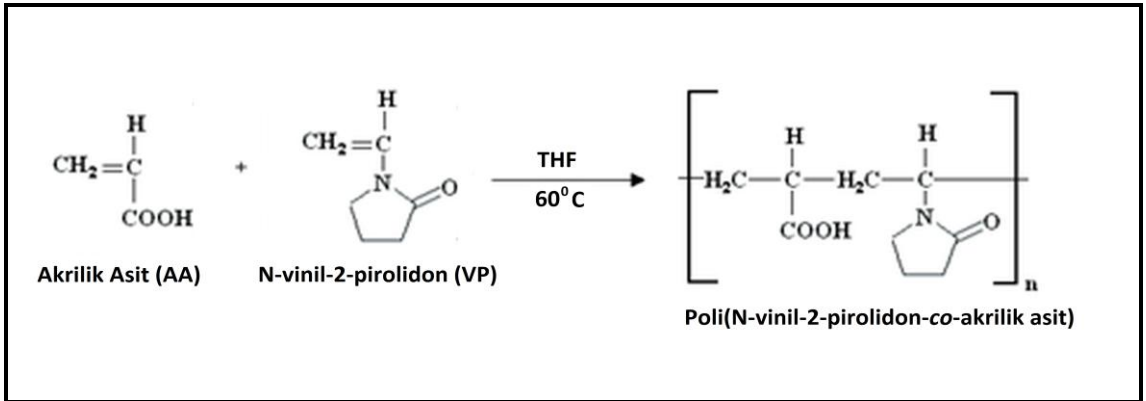
4.2 Kullanılan Taşıyıcılar

4.2.1 Poliakrilik Asit

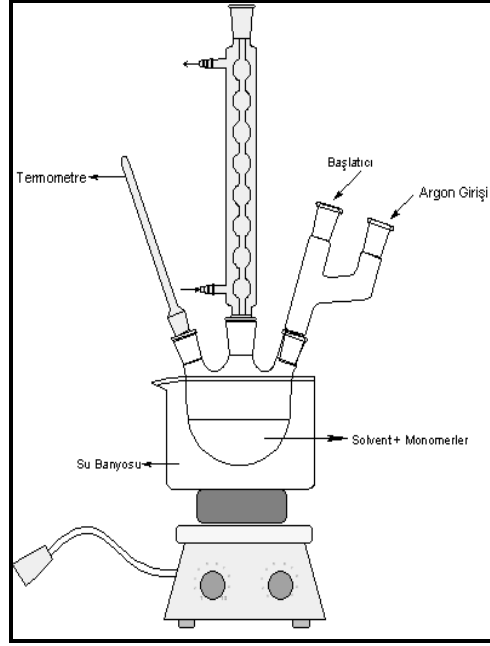
Poliakrilik asit, akrilik asit monomerlerinden oluşan suda çözünen bir polimerdir. Karbomer adı ile de kozmetik ürünlerden, farmasotik preparatların hazırlanmasında karşımıza çıkmaktadır. Düşük pH değerlerinde ($\text{pH} \leq 4$) hemen hemen disosiyasyon olmaz. $\text{pH} \geq 8$ 'de tamamen yüklü bir zincire sahiptir.

4.2.2 N-Vinil-2-pirolidon Akrilik Asit (2:1) Kopolimerinin Sentezi

P(VP-co-AA) sentezi literatürde [133] [134] belirtildiği metoda göre yapılmıştır. Reaksiyonda akrilik asit ve N-vinil-2-pirolidon molar oranları 2:3 olacak şekilde yapılmıştır. 48 g Glacial akrilik asit ve 111 g vinilpirolidon-2 tetrahidrofuran içerisinde karıştırılır. 318 mg Benzoil peroksit ve 32 mg kobalt naftanat akrilik asit ve vinilpirolidon karışırken ortama eklenir. 60°C ' de inert gaz ortamında argon gazı kullanılmıştır. Kopolimer çökeltisi filtre kâğıdından süzildükten sonra kurutulmuştur. Reaksiyonun verimi %80 olarak hesaplanmıştır. Polimerin molekül ağırlığı ise 250.000 Da olarak bulunmuştur [133].



(a)



(b)

Şekil 4.14 Poli(N-vinil-2-pirolidon'un akrilik asit ile kopolimerinin sentez reaksiyonunun (a) şematik gösterimi, (b) deney düzeneği.

4.2.3 Dekstran Aldehit'in Sentezi

4.2.3.1 Dekstran

Dekstran doğada bulunabilen, biyobozunur, inert ve toksik özelliği olmayan bir polimerdir. Bu özelliklerinden dolayı dekstran ve türevleri biyolojik birçok uygulamada kullanılmaktadır [135], [136].

Enzimlerin, proteinlerin ve peptidlerin, hidrofobik arayüzeyler ile etkileşime karşı korunması ve yüzey etrafında bir kılıf oluşturulması amacıyla bunların yüzeyinin hidrofilik bir polimer ile minimal modifikasyonu iyi bir çözüm gibi görünmektedir. Modifikasyonda kullanılan bu polimer modifikasyon sonrası diğer moleküller ile etkileşime olanak vermelidir. Ayrıca seçilen polimer enzim, protein veya peptide ait gruplar ile reaksiyona girebilmelidir. Aldehit dekstran bütün bu gereklilikleri yerine getirebilen esnek bir polimerdir [137] .

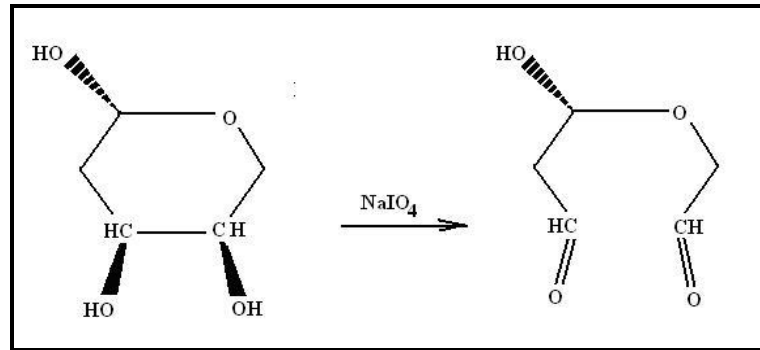
Periyodat oksidasyonu, şeker rezidülerinin göreceli olarak reaktif olmayan hidroksil gruplarını amin grupları ile reaksiyona girebilecek aldehit gruplarına dönüştürmede

kullanılabilecek en basit yöntemlerden biridir. Periyodat, ardışık hidroksil grubu taşıyan C-C bağlarını kırmaktadır ve –OH gruplarını yükseltgeyerek yüksek oranda reaktif aldehit grupları oluşturmaktadır [81].

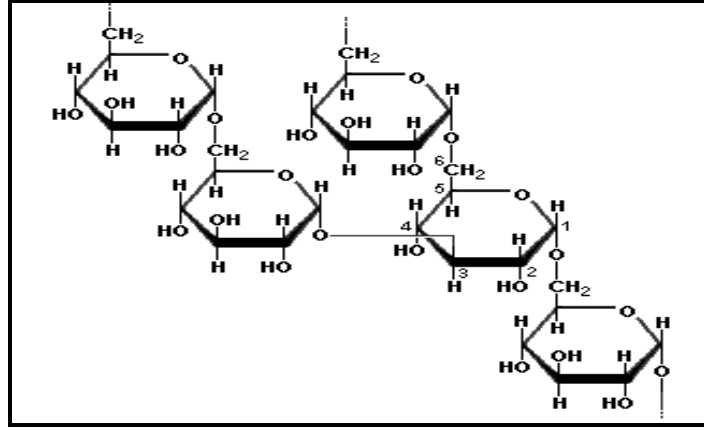
4.2.3.2 Dekstran-Aldehit Türevinin Eldesi

Reaksiyon şeması Şekil 4.15’de gösterilen Dekstran-Aldehit türevinin eldesi şu aşamalar gerçekleştirilerek yapıldı;

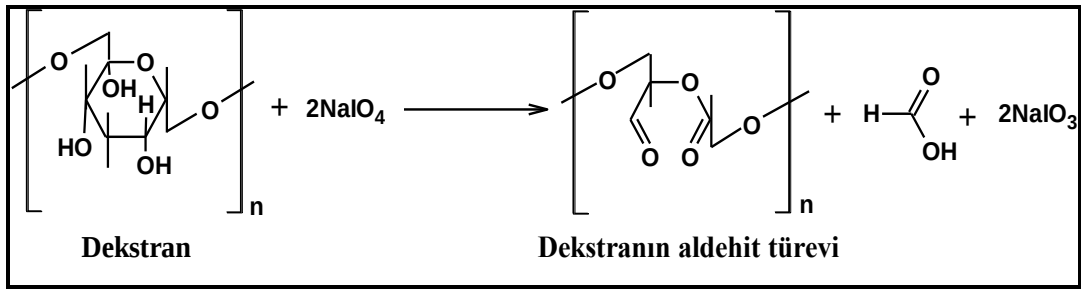
- 3,33 g Dekstran 30 ml destile suda çözüldü.
- 8 g NaIO_4 (Sodyum periyodat) 70 ml destile suda çözüldü (ışıktan korunarak).
- Dekstran çözeltisinin üzerine NaIO_4 çözeltisi yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi.
- Elde edilen bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat karıştırıldı.
- Reaksiyon çözeltisi 24 saat süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta destile suya karşı diyaliz edildi.
- Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) katı dekstran-aldehit türevi elde edildi [138].



Şekil 4.15Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi [139].



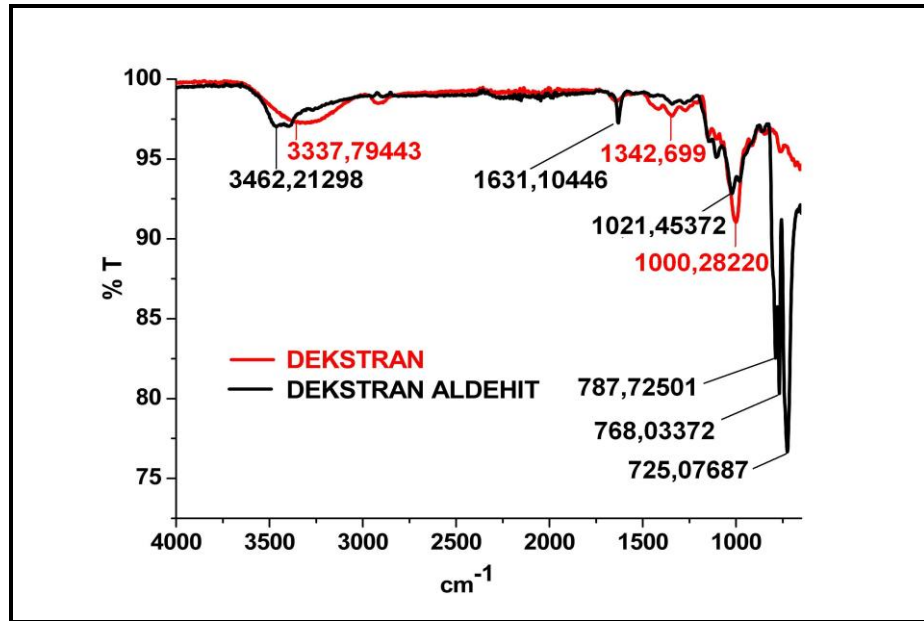
Şekil 4.16Dekstran yapısı [140]



Şekil 4.17Dekstran aldehit türevinin oluşumu.

4.2.3.3 Dekstan-Aldehit Türevinin FT-IR ile Karakterizasyonu

Dekstran ve dekstranın periyodat oksidasyonu ile elde edilen dekstran-aldehit türevinin FT-IR spektrumları Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18Dekstran ve sentezlenen dekstran aldehit türevine ait FT-IR spektrumları.

Dekstran ve dekstran-aldehit türevinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, dekstran-aldehite ait FT-IR spektrumunda 1631 cm^{-1} 'de C=O gerilmesine ait bir pikin olduğu görülmektedir. Bu bize dekstran aldehitin oluşturulduğunu ispat etmektedir.

4.2.4 Bovine Serum Albumin

Yapısında 585 amino asit içeren, antikor oluşumunda konjugasyon için en yaygın kullanılan globular yapıdaki taşıyıcı bir proteindir. İzoelektrik noktası suda 4,7'dur. Molekül ağırlığı ise 66000 Dalton'dur. Amino asit diziliminde iki tane Triptofan bulunmaktadır. Yapısında bulundurduğu çeşitli fonksiyonel gruplardan dolayı konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler ya da haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir [141].

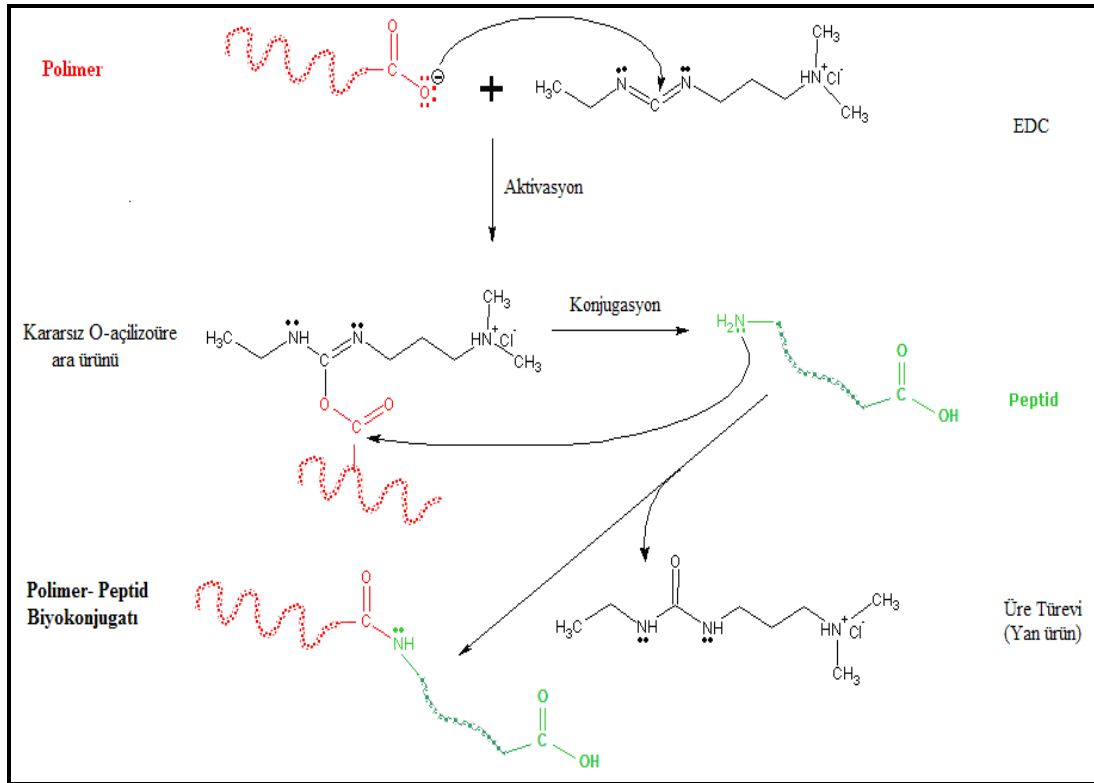
4.3 Konjugasyon Yöntemleri

Bu tez çalışmasında peptid ile polimer reaksiyon için üç farklı konjugasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunlar sırası ile şöyledir;

1.EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemi

Karboksil grubunun karbodiimide bağlı aktivasyon reaksiyonunun basit mekanizması, polimerin karboksil grubu ile proteinin amino grubu arasında gerçekleşen ve iki basamaktan oluşan bir kondenzasyon reaksiyondur [142].

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-açilisoüre 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.

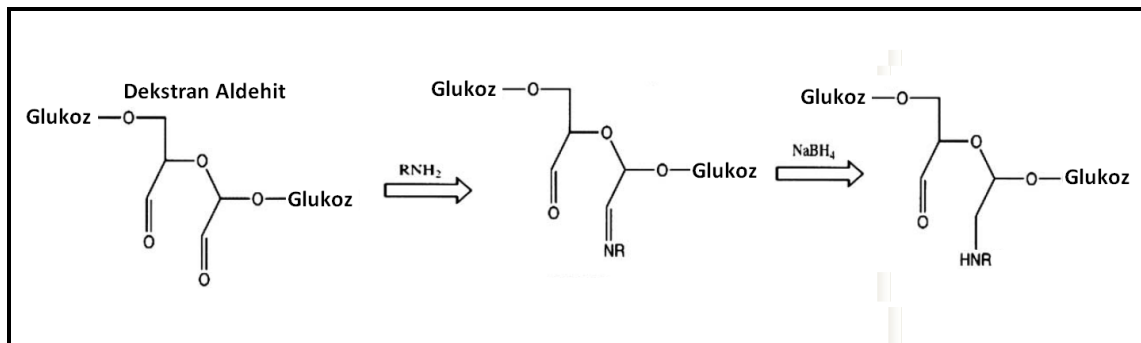


Şekil 4.19EDC varlığında peptid/polimer konjugasyonunun mekanizması [117]

Çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda oluşan izoüre ara ürünü ve reaktifin fazlası suda çözünabilir özellikte olduklarından, diyalizle ya da jel filtrasyonu ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir [81].

2.Dekstran Aldehit İle Konjugasyon Yöntemi

Dekstran aldehit ile peptid dizisinin konjugasyonu Şekil 4.20’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.20Peptid/DA konjugasyonunun şematik gösterimi [143].

3.Kompleks Oluşturma Yöntemi

Kompleks oluşturma yönteminde baskın kuvvet peptid ile polimer zinciri arasında elektrostatik etkileşim olup, bununla birlikte hidrofobik etkilerin ve hidrojen bağlarının katkısı da mümkündür. Sulu çözeltilerde polielektrolit ile peptid arasındaki etkileşimler; pH, iyonik şiddet ve peptid/polielektrolit miktarına bağlıdır.

4.3.1 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Sonuçlar

4.3.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonu

Peptid dizisinin PAA asit ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon koşullarını belirleyebilmek için konjugasyon mekanizması üç farklı koşulda oluşturulmuş ve elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

Reaksiyon Koşulları

•A Koşulları

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4263 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltilisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. Aktive edilmiş polimer çözeltilisinin pH'ı 7.2'ye getirildi. Yaklaşık 1 saat karıştırıldıktan sonra üzerine 737 μ L PBS tamponunda çözülmüş 0.737 mg peptid çözeltilisi eklendi. +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ının 7.2 olduğu kontrol edildi.

• B Koşulları

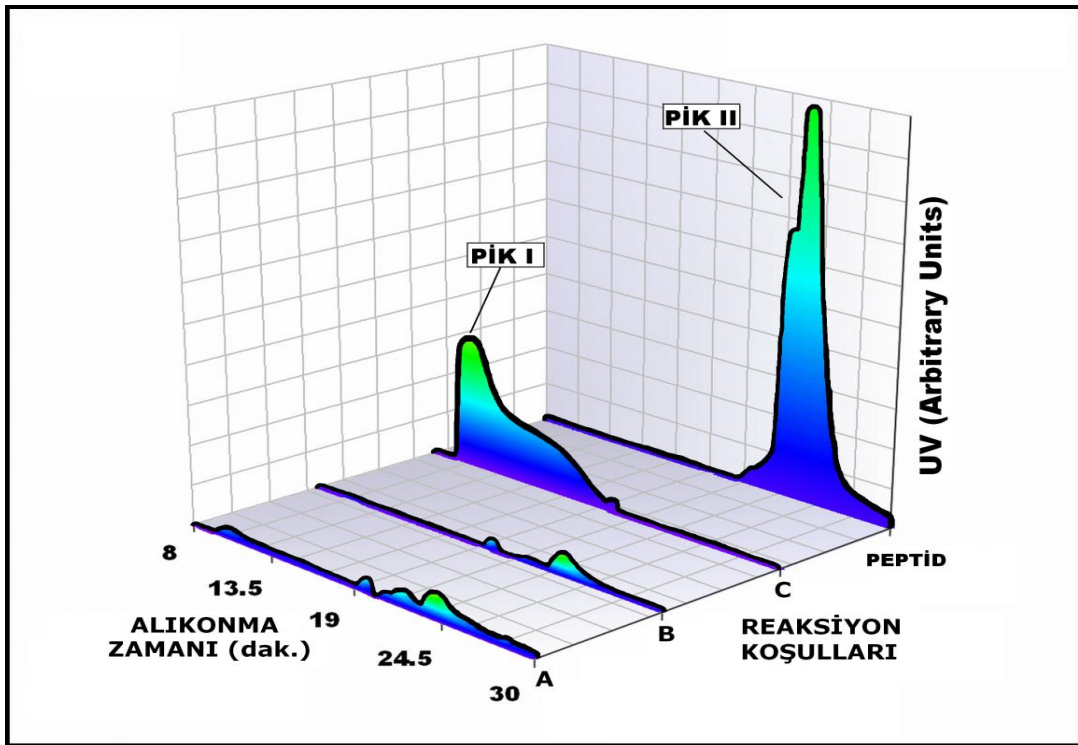
2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4263 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltilisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik

karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. 0.737 mg peptid 737 µl PBS tamponunda çözüldü ve aktive edilmiş polimer çözeltisine eklendi. +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

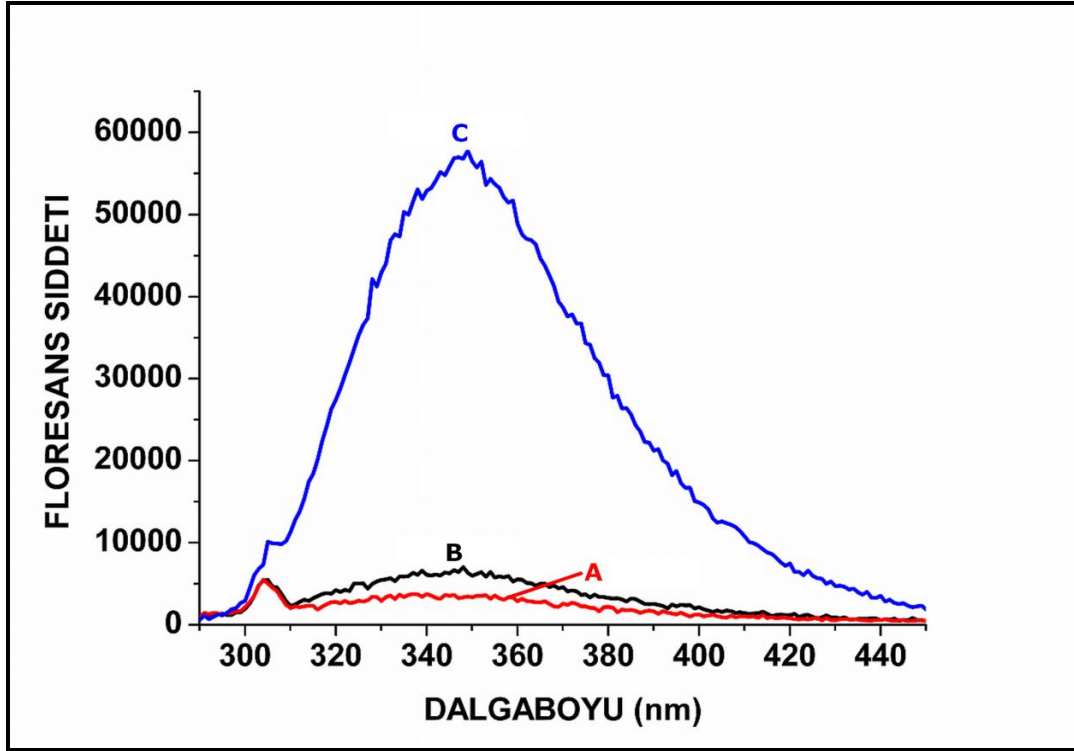
• C Koşulları

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4263 µL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. 0.737 mg peptid 737 µl PBS tamponunda çözüldü ve polimer çözeltisine eklendi. Peptid/polimer fiziksel karışımı yaklaşık olarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

EDC aktivasyon yöntemine göre üç farklı reaksiyon koşulunda sentezlenen konjugatlar kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle ile analiz edilmiştir.

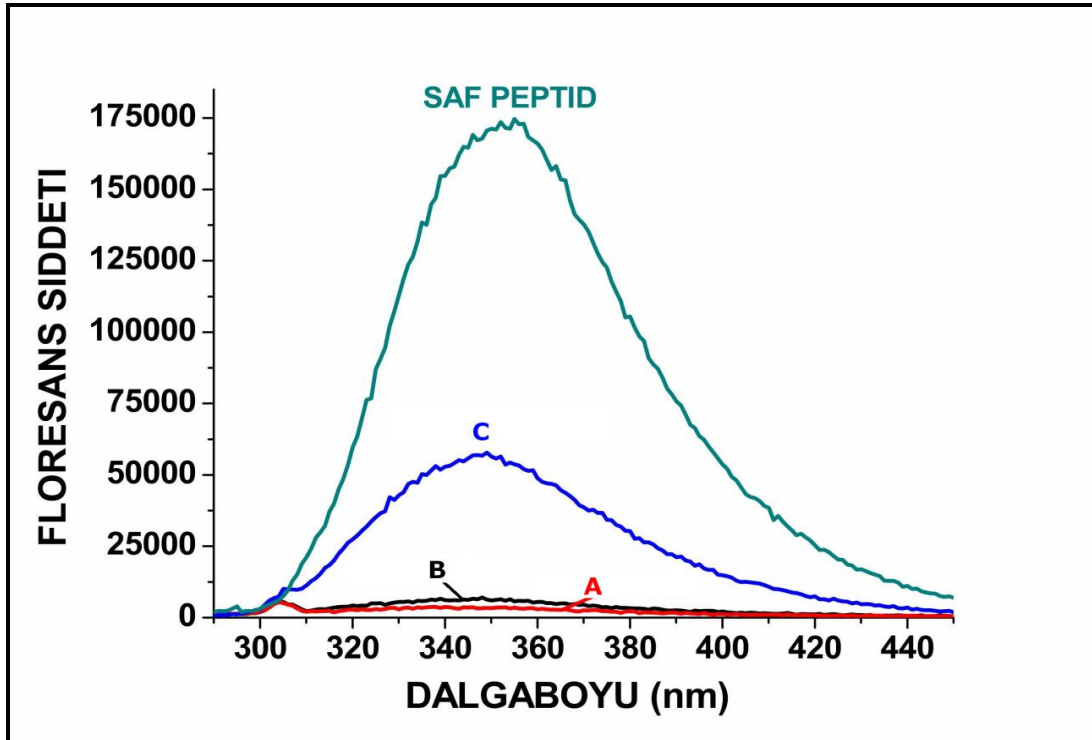


Şekil 4.21EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.



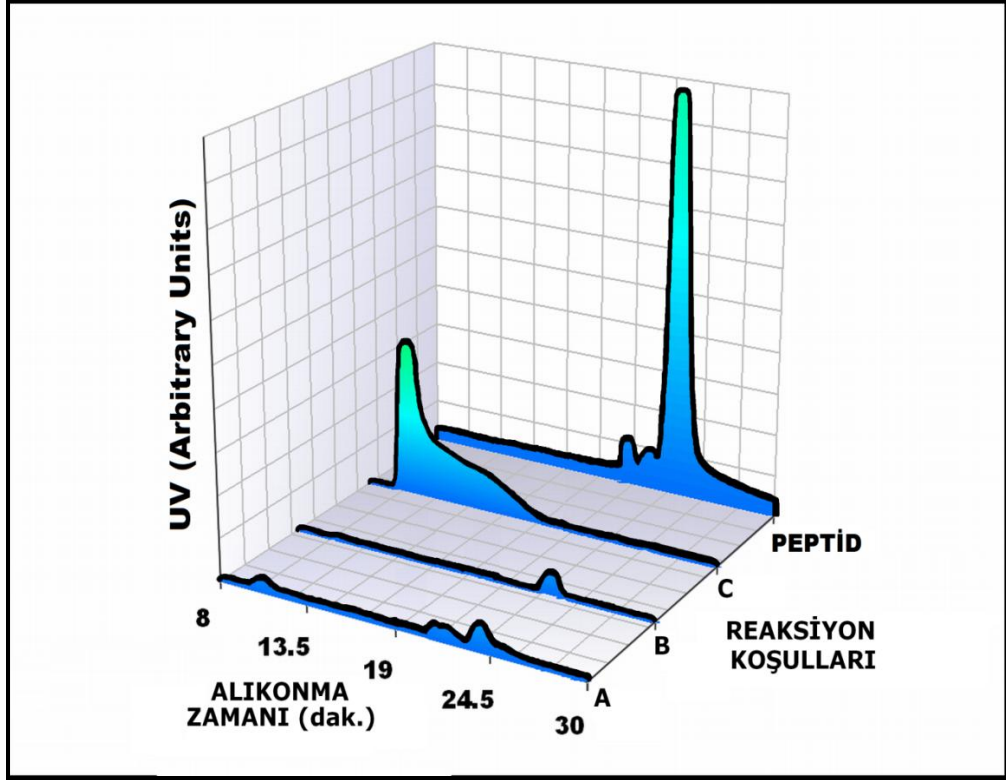
Şekil 4.22EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteinini peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği.

(♦) A koşulları, (♦) B koşulları, (♦) C koşulları.

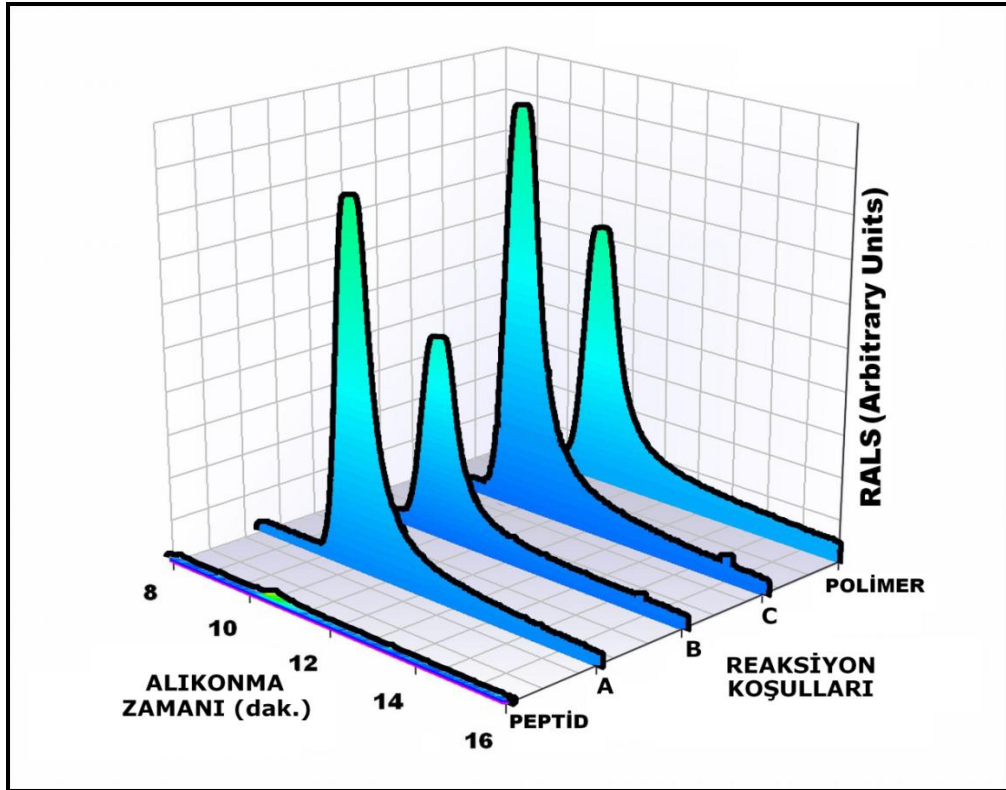


Şekil 4.23EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteinini peptidinin PAA ile konjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı floresans grafiği. **Saf Peptid (353 nm.)** (♦) A koşulları (351 nm.), (♦) B

koşulları (350 nm.), (♦) C koşulları (347 nm.).



(a)



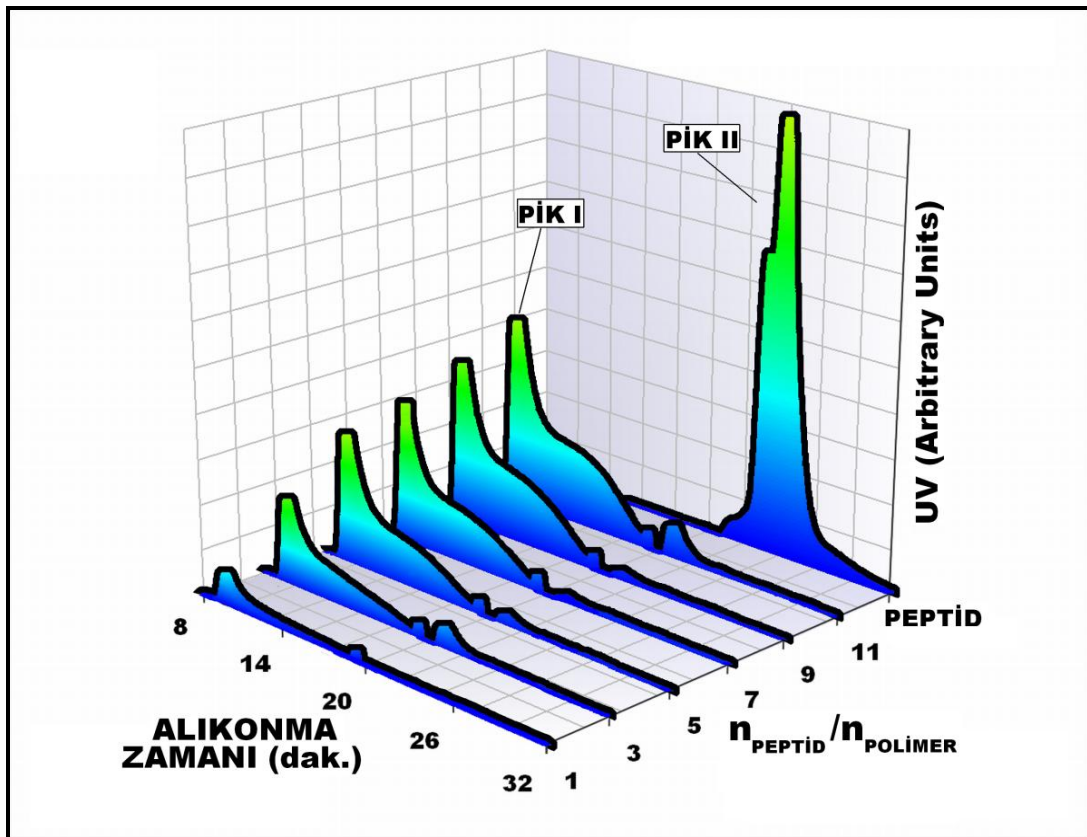
(b)

Şekil 4.24 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteinini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı SEC grafiği: (a) UV, (b) Işık saçılması dedektörü.

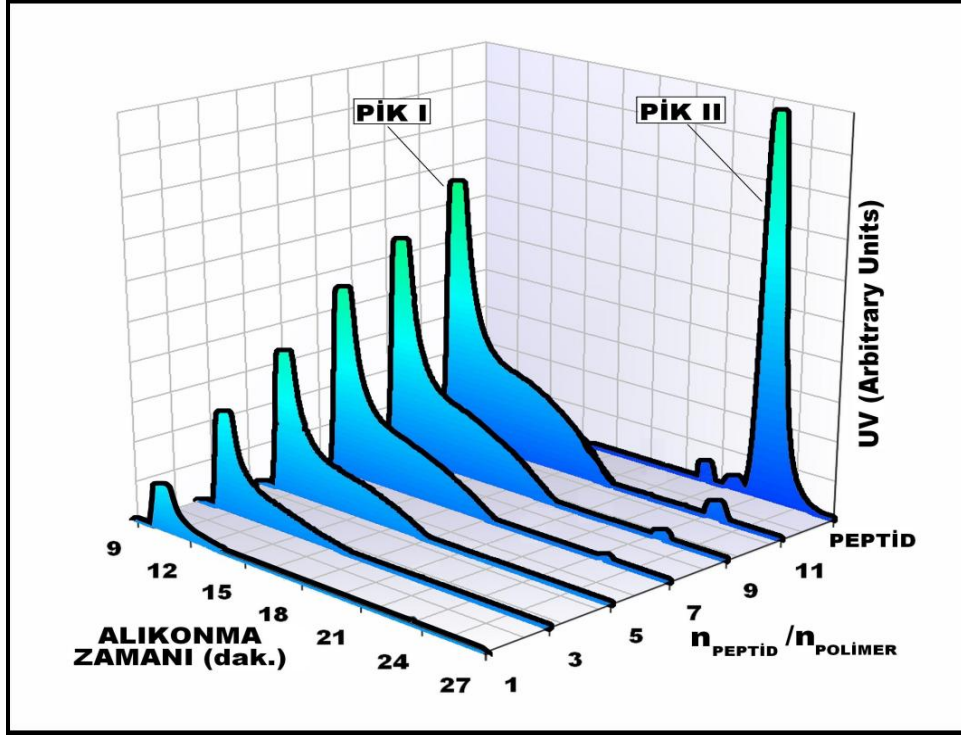
Bu doğrultuda bu peptid dizisi için poliakrilik asit ile biyokonjugatları, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}=1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir biyokonjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan C koşullarına göre sentezlenmiştir.

Çizelge 4.7 İnfluenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

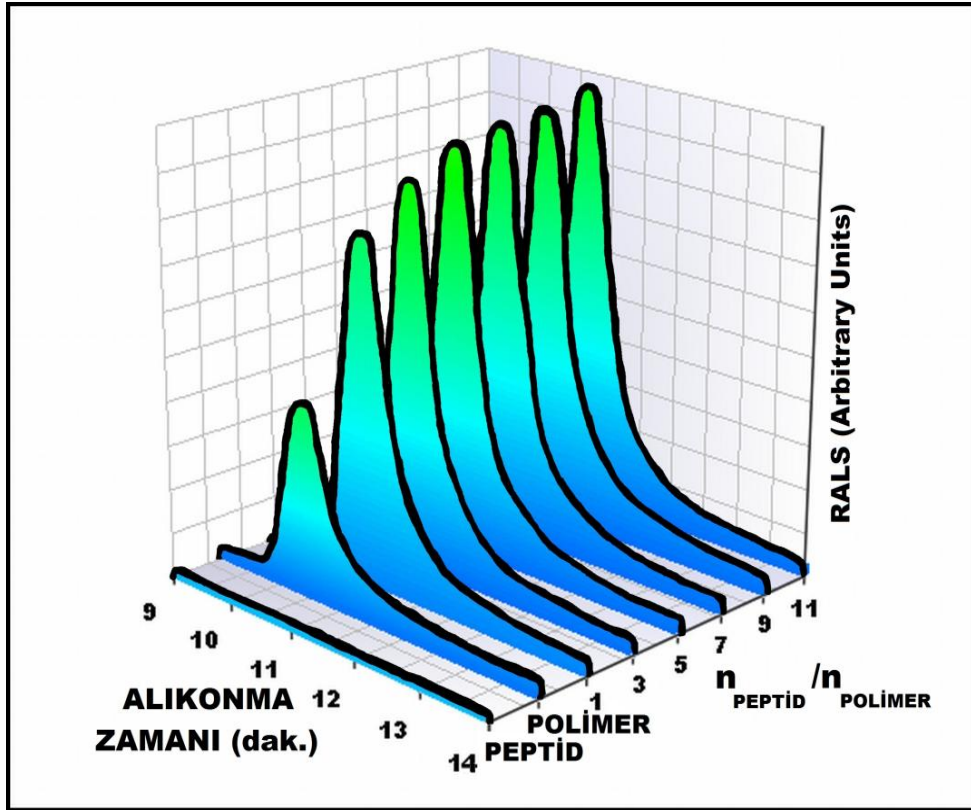
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan PBS Miktarı (mL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.074	5	7.5	5
3	0.221	5	7.5	5
5	0.369	5	7.5	5
7	0.516	5	7.5	5
9	0.663	5	7.5	5
11	0.810	5	7.5	5



Şekil 4.25 İnfluenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği. (Serbest peptid $n=7$ mol oranındaki biyokonjugat ile eşit miktarda peptid içermektedir.)

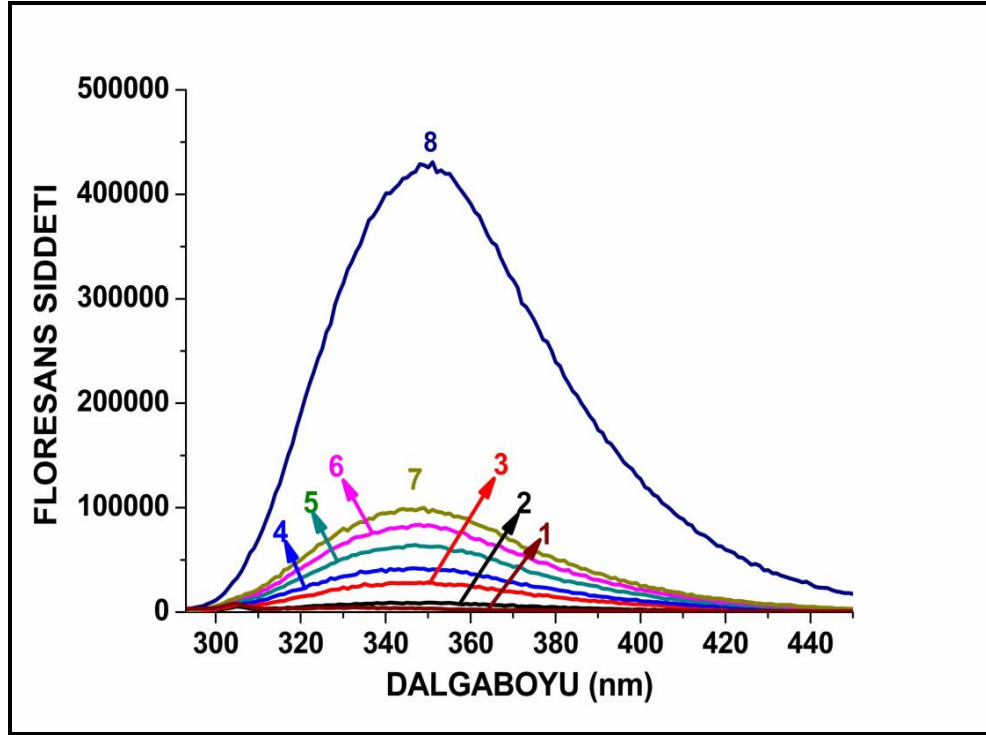


(a)



(b)

Şekil 4.26 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunun saf peptid ile kıyaslamalı SEC grafiği: (a) UV, (b) Işık saçılması dedektörü.



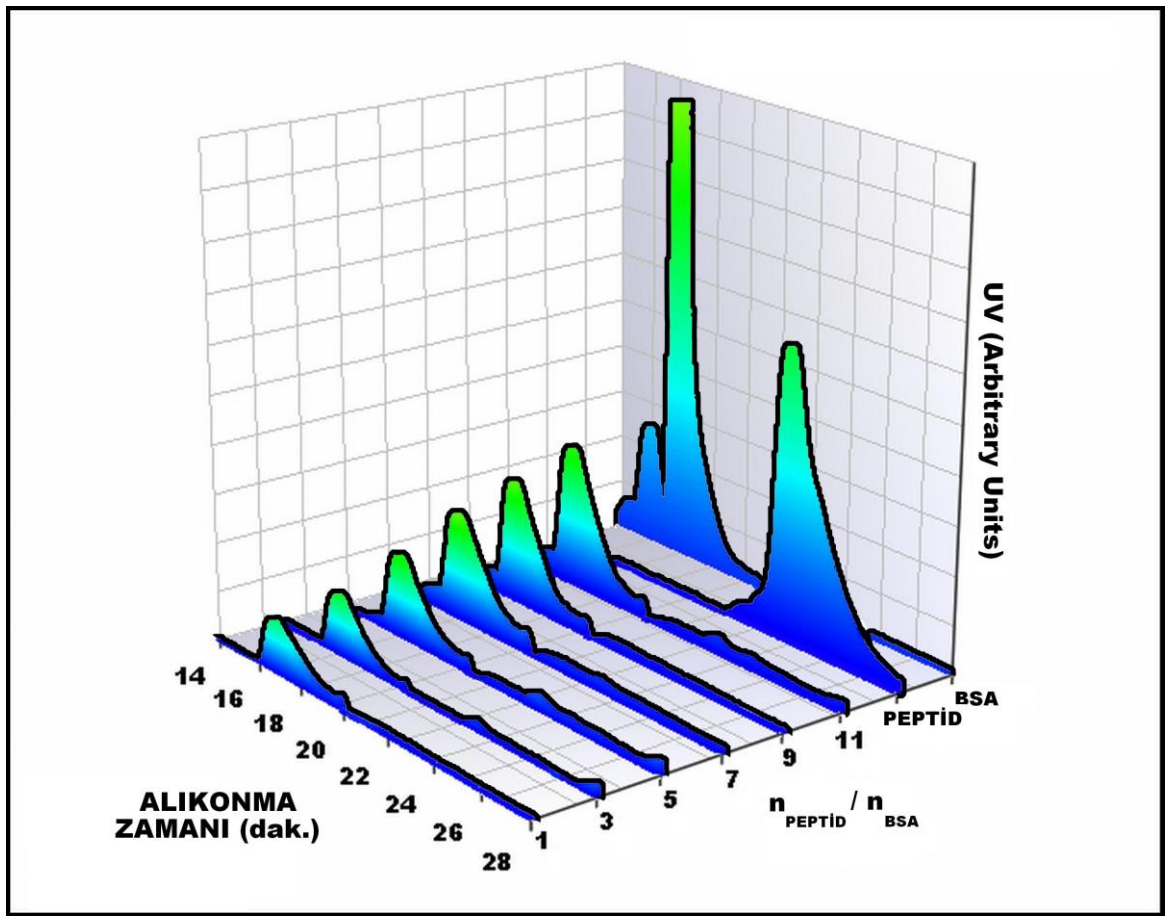
Şekil 4.27 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1♦), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 3 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 5 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 7 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 9 (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 11 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): Serbest peptid (8♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$).

4.3.1.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Bovine Serum Albumin ile Biyokonjugasyonu

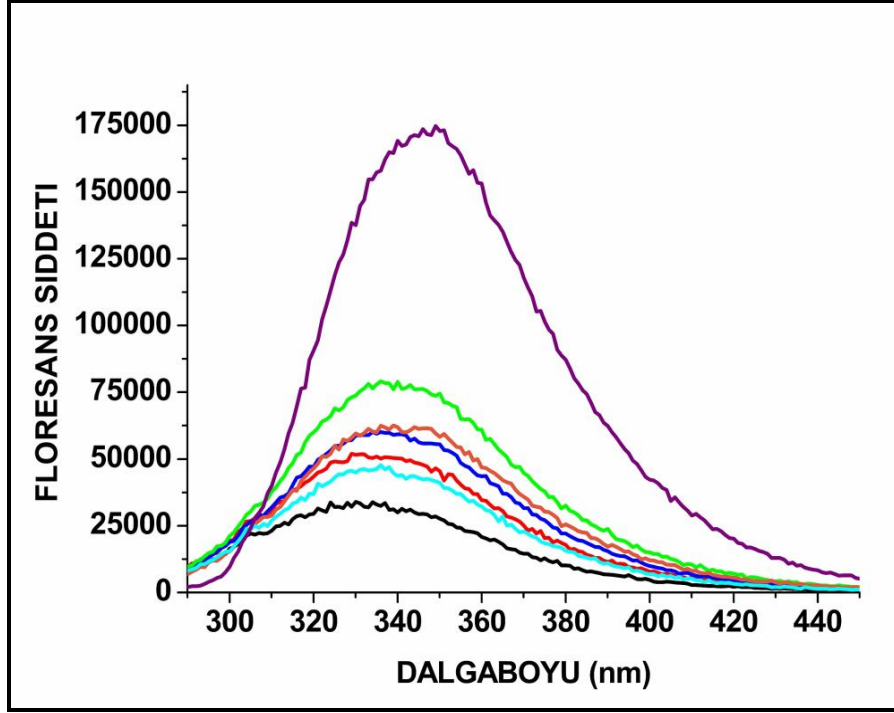
Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile olan konjugasyonu da PAA ile konjugasyonunda olduğu gibi C reaksiyon koşullarına göre yapıldı. 2,5 mg Bovine Serum Albumin (BSA $M_w=66000$ Da) 4442 μL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir çözelti için sabit konsantrasyondaki BSA çözeltisi üzerine PBS tamponunda pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı fiziksel karışımın üstüne ilave edilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün biyokonjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Elde edilen biyokonjugatın karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

Çizelge 4.8 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

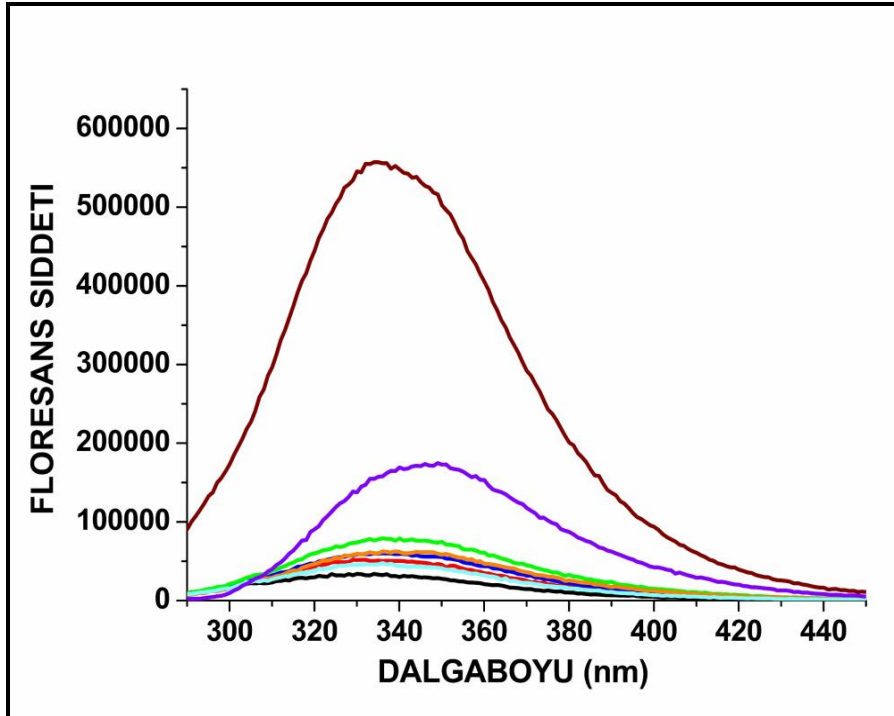
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan EDC Miktarı (mg)	Kullanılan BSA Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.1116	7.5	2.5	5
3	0.3348	7.5	2.5	5
5	0.558	7.5	2.5	5
7	0.7812	7.5	2.5	5
9	1.0044	7.5	2.5	5
11	1.2276	7.5	2.5	5



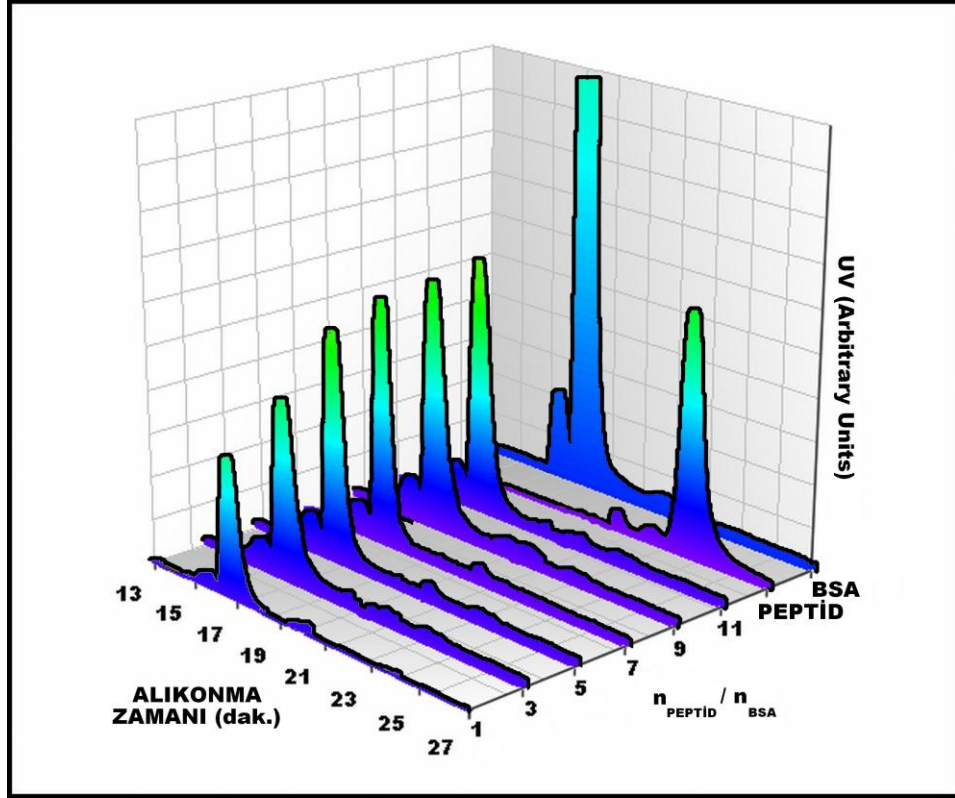
Şekil 4.28 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf BSA ve peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.



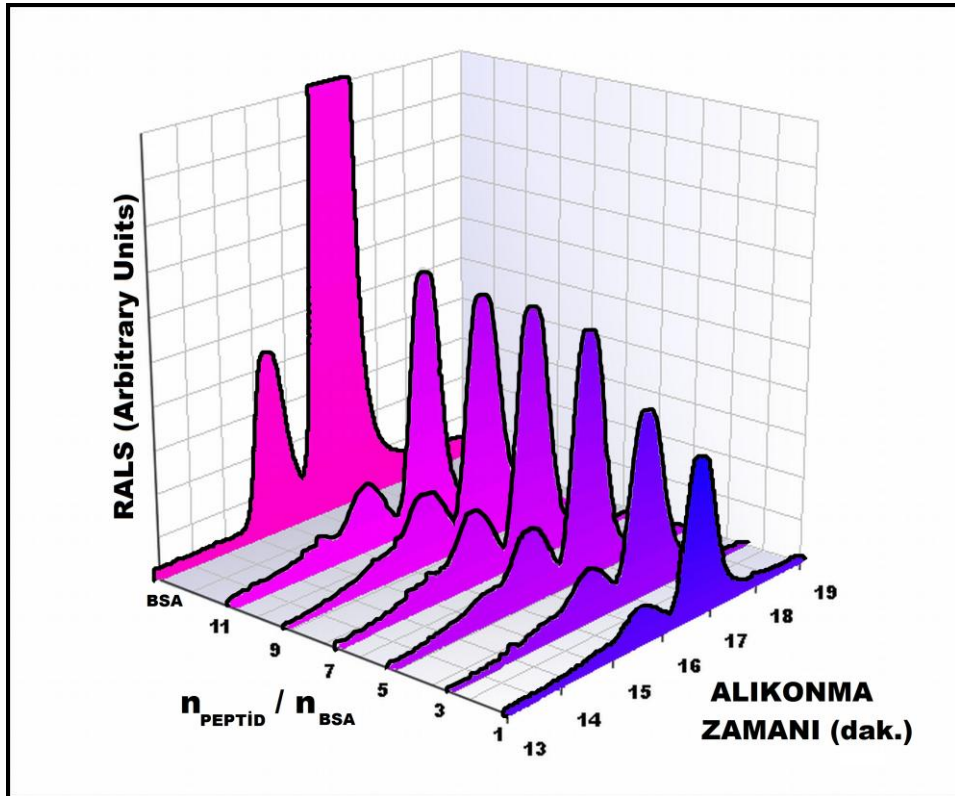
Şekil 4.29 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları. (♦) $n=1$ ($\lambda_{\max}=331\text{nm}$), (♦) $n=3$ ($\lambda_{\max}=335\text{nm}$), (♦) $n=5$ ($\lambda_{\max}=336\text{nm}$), (♦) $n=7$ ($\lambda_{\max}=337\text{nm}$), (♦) $n=9$ ($\lambda_{\max}=338\text{nm}$), (♦) $n=11$ ($\lambda_{\max}=338\text{nm}$), (♦) Saf peptid $n=5$ ($\lambda_{\max}=353\text{nm}$)



Şekil 4.30 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının BSA ve saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları. (♦) $n=1$ ($\lambda_{\max}=331\text{nm}$), (♦) $n=3$ ($\lambda_{\max}=335\text{nm}$), (♦) $n=5$ ($\lambda_{\max}=336\text{nm}$), (♦) $n=7$ ($\lambda_{\max}=337\text{nm}$), (♦) $n=9$ ($\lambda_{\max}=338\text{nm}$), (♦) $n=11$ ($\lambda_{\max}=338\text{nm}$), (♦) Saf peptid $n=5$ ($\lambda_{\max}=353\text{nm}$), (♦) BSA ($\lambda_{\max}=335\text{nm}$).



(a)



(b)

Şekil 4.31 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının SEC grafikleri: (a) UV ve (b) Işık Saçılması dedektörlerine ait kromatogramlar.

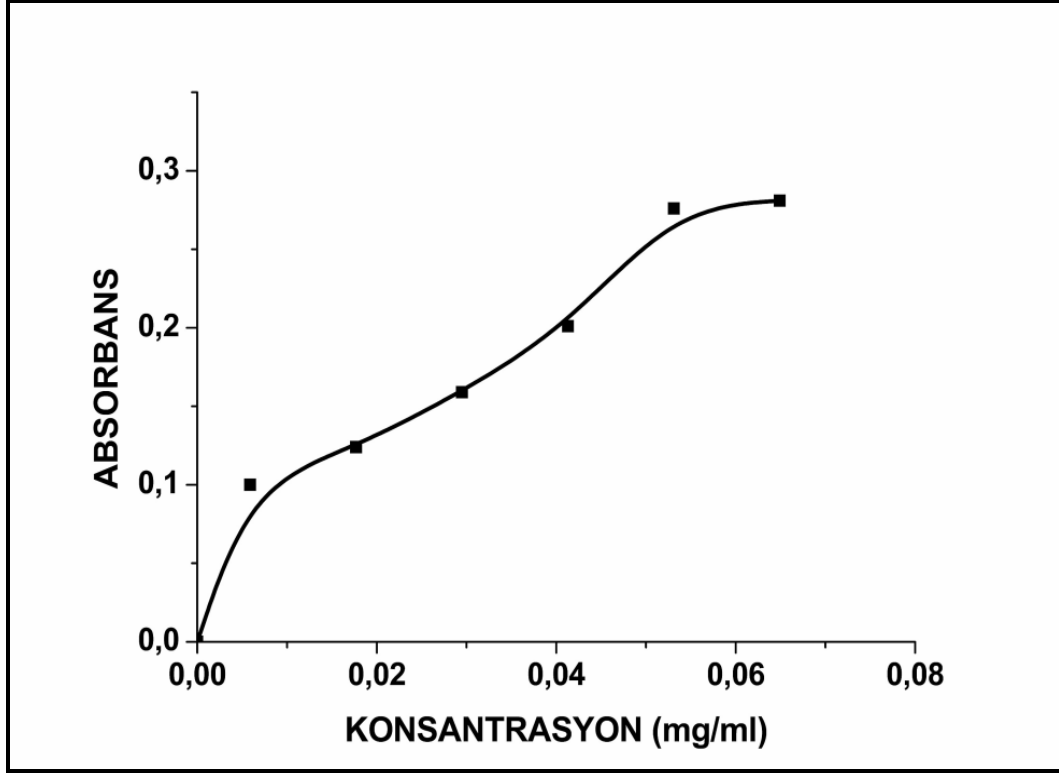
4.3.1.3 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da)

Kopolimeri ile Biyokonjugasyonu

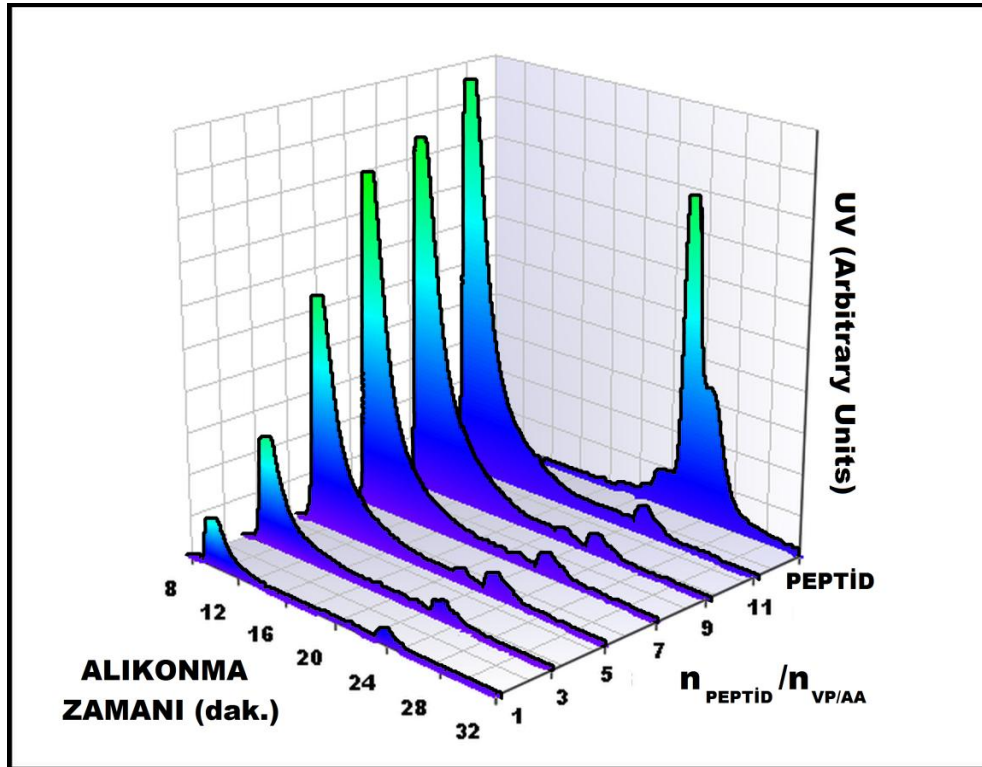
Molekül ağırlığı 250.000 Da olarak sentezlenen [P(VP-ko-AA)] kopolimerinin antijenik peptidimiz ile biyokonjugasyonda daha önce PAA ile yapılan ve en verimli reaksiyon koşulu olarak belirlediğimiz C reaksiyon koşulları kullanılmıştır. 2,5 mg P(VP-ko-AA)] kopolimeri ($M_w=250000$ Da) PBS tamponunda çözöldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir çözelti için sabit konsantrasyondaki [P(VP-ko-AA)] kopolimeri çözeltisi üzerine PBS tamponunda pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 7.5 g suda çözönen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı karışımın üstüne ilave edilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün biyokonjugatların pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelendi.

Çizelge 4.9 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile konjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

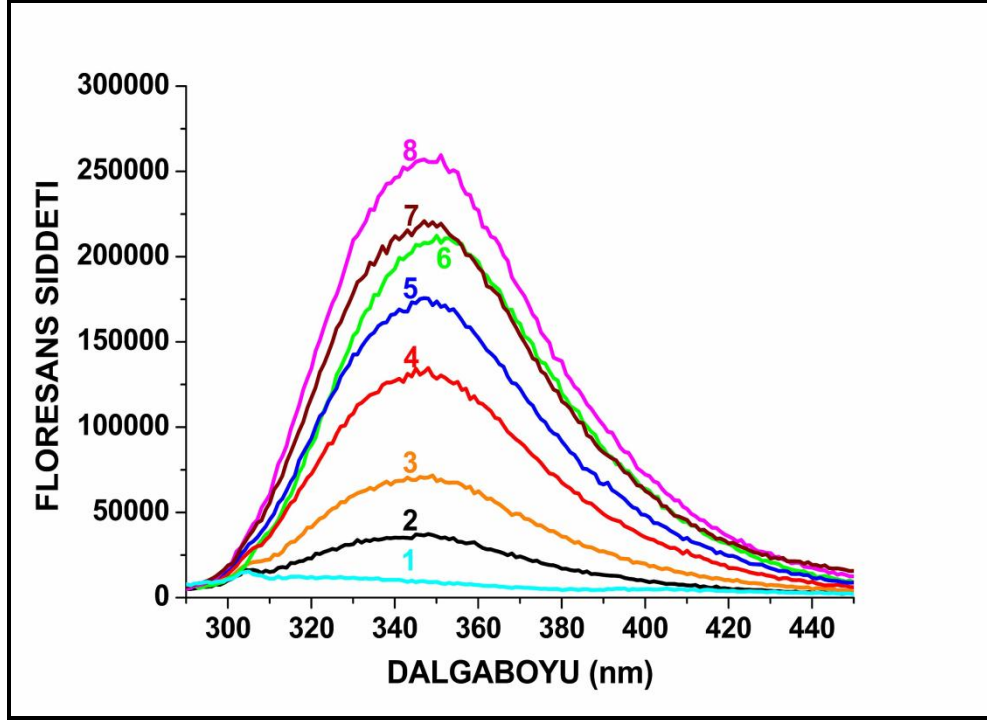
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan VP/AA Miktarı (mg)	Kullanılan EDC Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.0295	2.5	7.5	5
3	0.0885	2.5	7.5	5
5	0.1475	2.5	7.5	5
7	0.2065	2.5	7.5	5
9	0.2655	2.5	7.5	5
11	0.3245	2.5	7.5	5



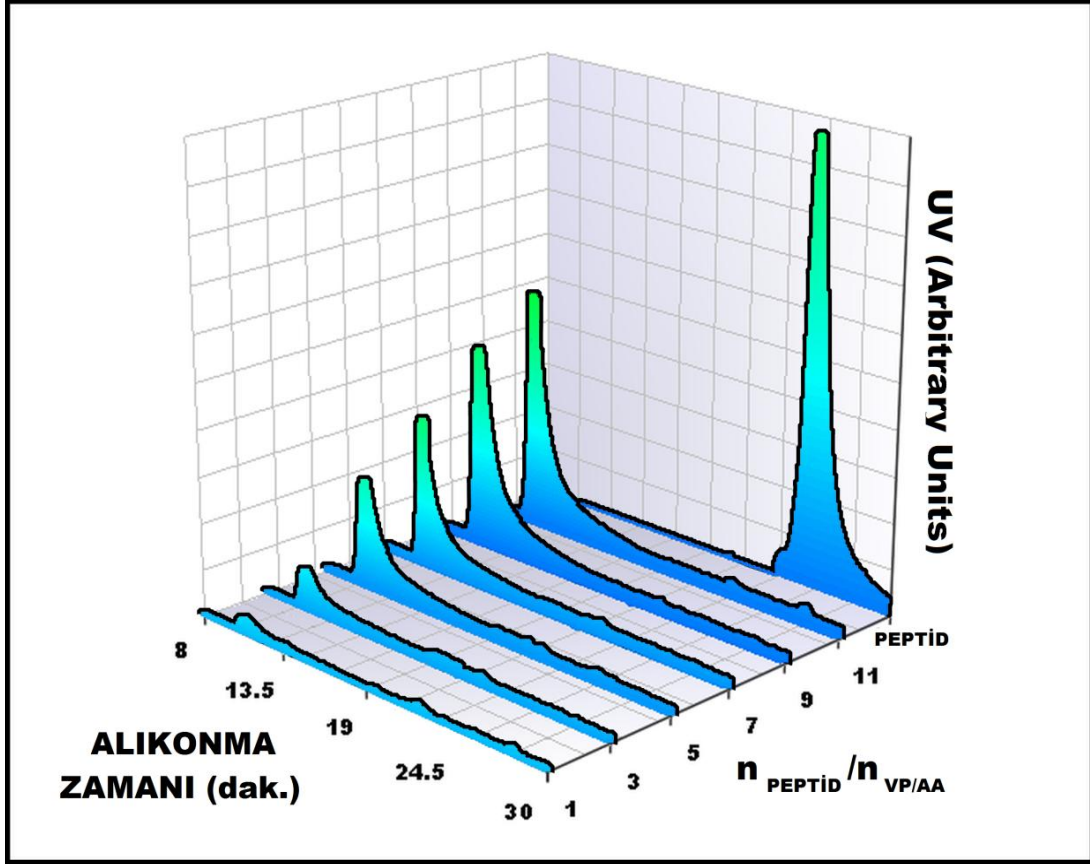
Şekil 4.32 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının absorbans grafiği.



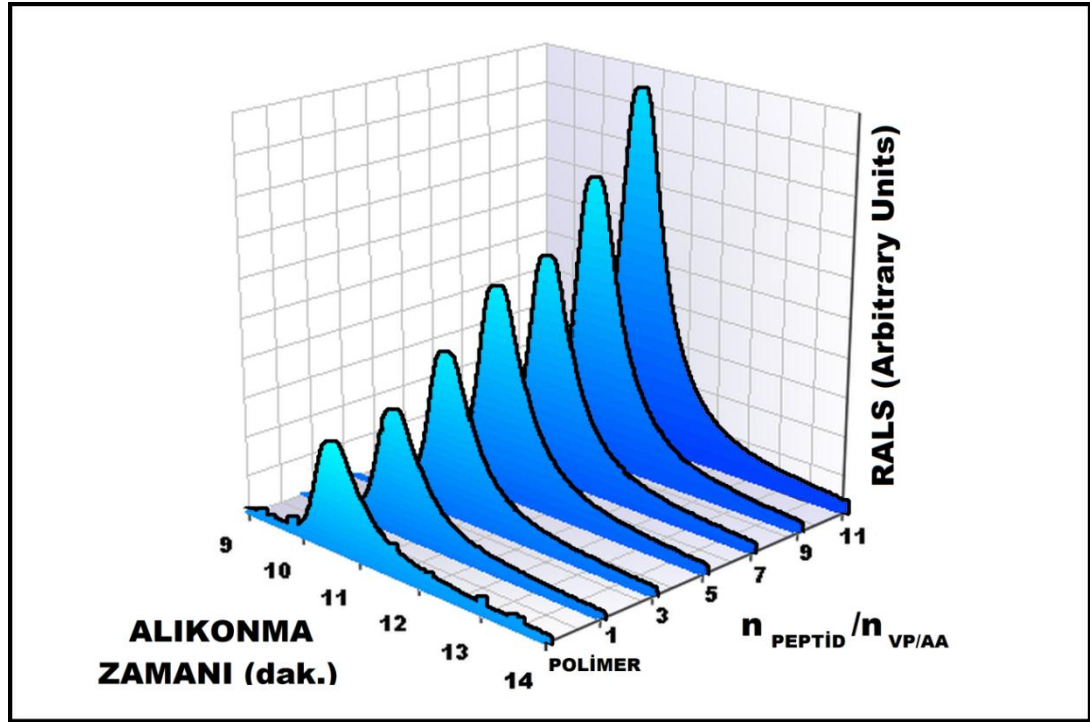
Şekil 4.33 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.



Şekil 4.34 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri (1♦), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 3 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 5 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 7 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): Serbest peptid (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$): 9 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 11 (8♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$).



(a)



(b)

Şekil 4.35 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin [P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının (a) saf peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait (b) kopolimer ile kıyaslamalı Işık saçılması dedektörüne ait SEC kromatogramları.

4.3.1.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Dizisinin PAA ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon koşullarını belirleyebilmek için konjugasyon mekanizması dört farklı koşulda oluşturulmuş ve elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

REAKSİYON KOŞULLARI

- **A Koşulları**

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4621.5 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. Aktive edilmiş polimer çözeltisinin pH'ı 7.2'ye getirildi. Yaklaşık 1 saat karıştırıldıktan sonra üzerine 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülmüş 0.357 mg peptid çözeltisi eklendi. Tüm karışımın üstüne 278.5 μ L PBS tamponu eklendi ve +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ının 7.2 olduğu kontrol edildi.

- **B Koşulları**

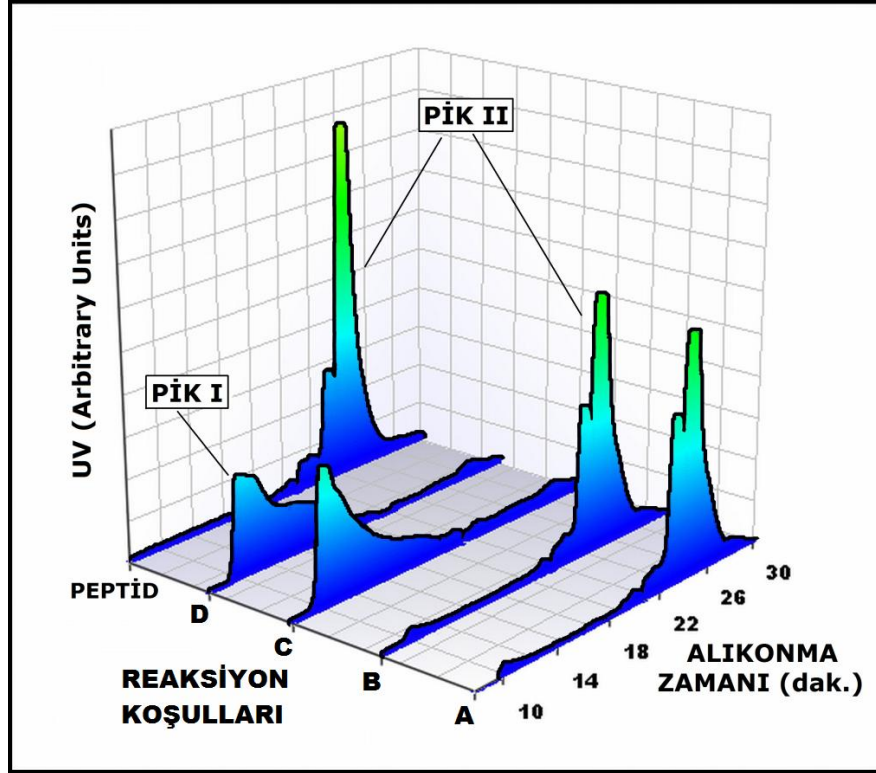
2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4621.5 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. 0.357 mg peptid 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve aktive edilmiş polimer çözeltisine eklendi. Tüm karışımın üstüne 278.5 μ L PBS tamponu eklendi ve +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

- **C Koşulları**

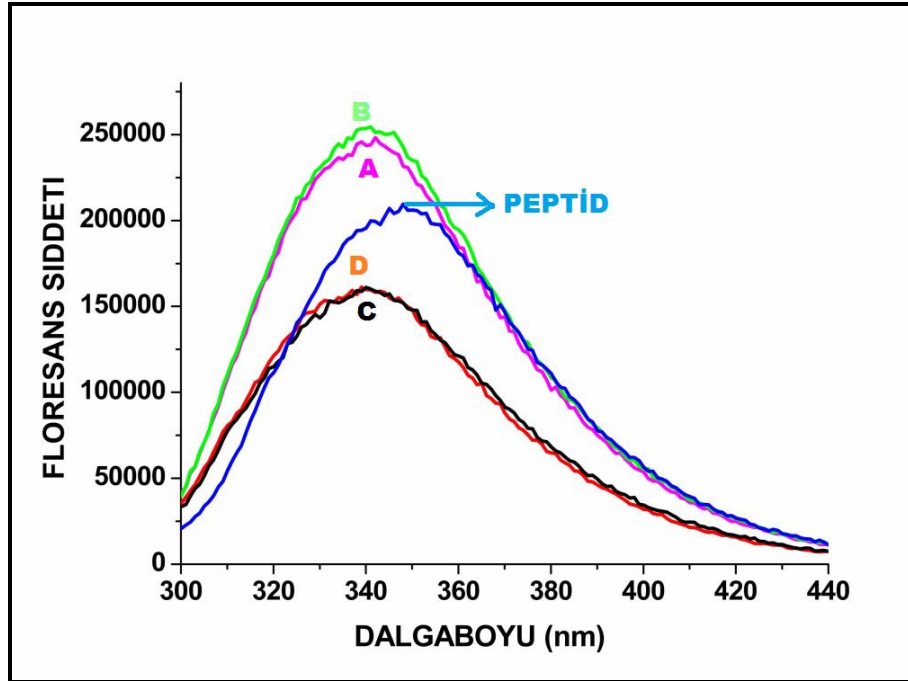
2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4621.5 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. 0.357 mg peptid 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve polimer çözeltisine eklendi. Tüm karışımın üstüne 278.5 μ L PBS tamponu eklendi ve peptid/polimer fiziksel karışımı yaklaşık olarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

- **D Koşulları**

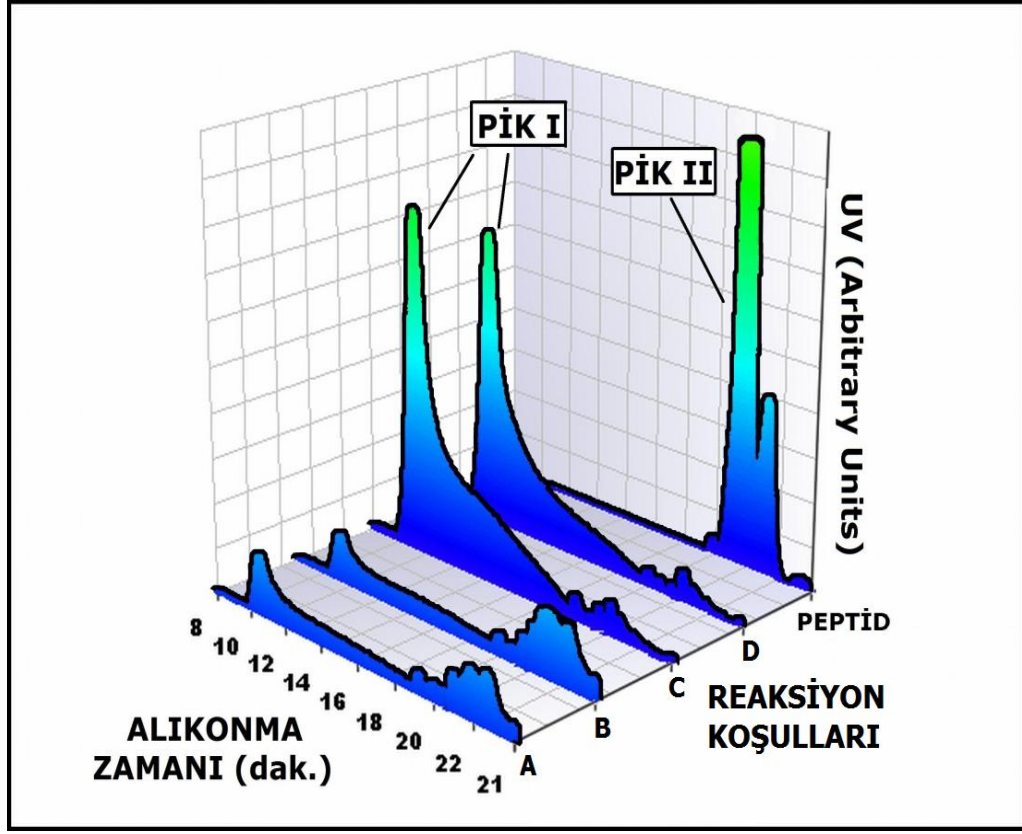
2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4621.5 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.357 mg peptid 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve polimer çözeltisine eklendi. Tüm karışımın üstüne 278.5 μ L PBS tamponu eklendi ve peptid/polimer fiziksel karışımı yaklaşık olarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Fiziksel karışımın pH=5'e getirildi. Daha sonra 7.5 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer konjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.



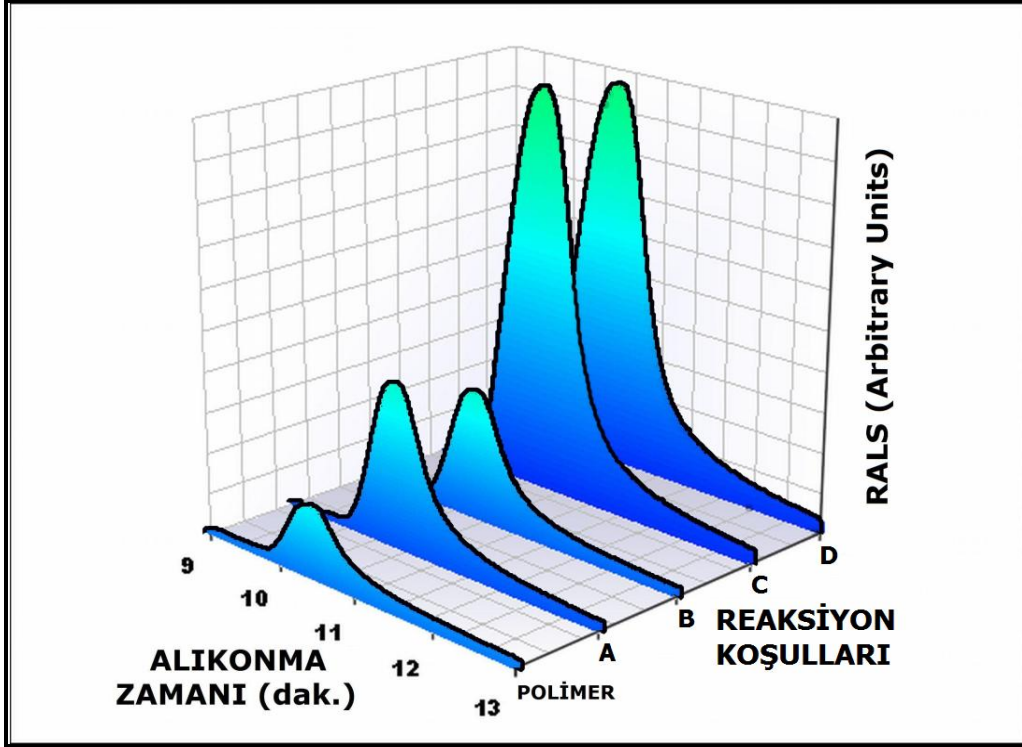
Şekil 4.36EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramları.



Şekil 4.37EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait Floresans spektrumları; (C♦) C Koşulları ($\lambda_{\max}$ =341nm), (D ♦) D Koşulları ($\lambda_{\max}$ =341nm), (♦) Saf Peptid ($\lambda_{\max}$ =350nm), (A♦) A Koşulları ($\lambda_{\max}$ =343nm), (B♦) B Koşulları ($\lambda_{\max}$ =343nm).



(a)



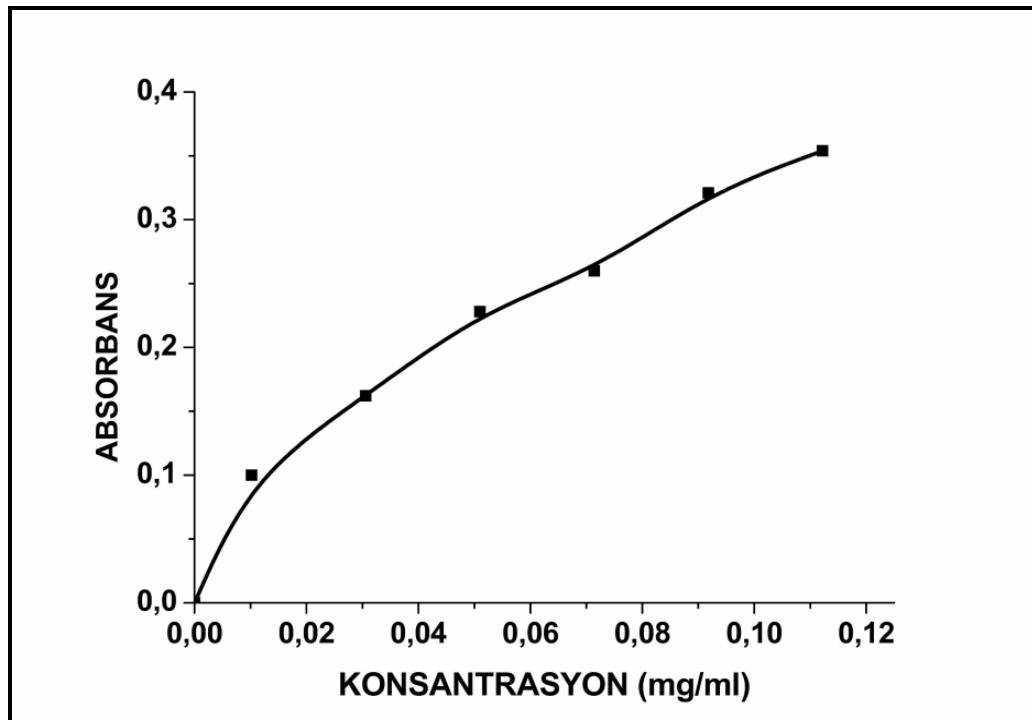
(b)

Şekil 4.38 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.

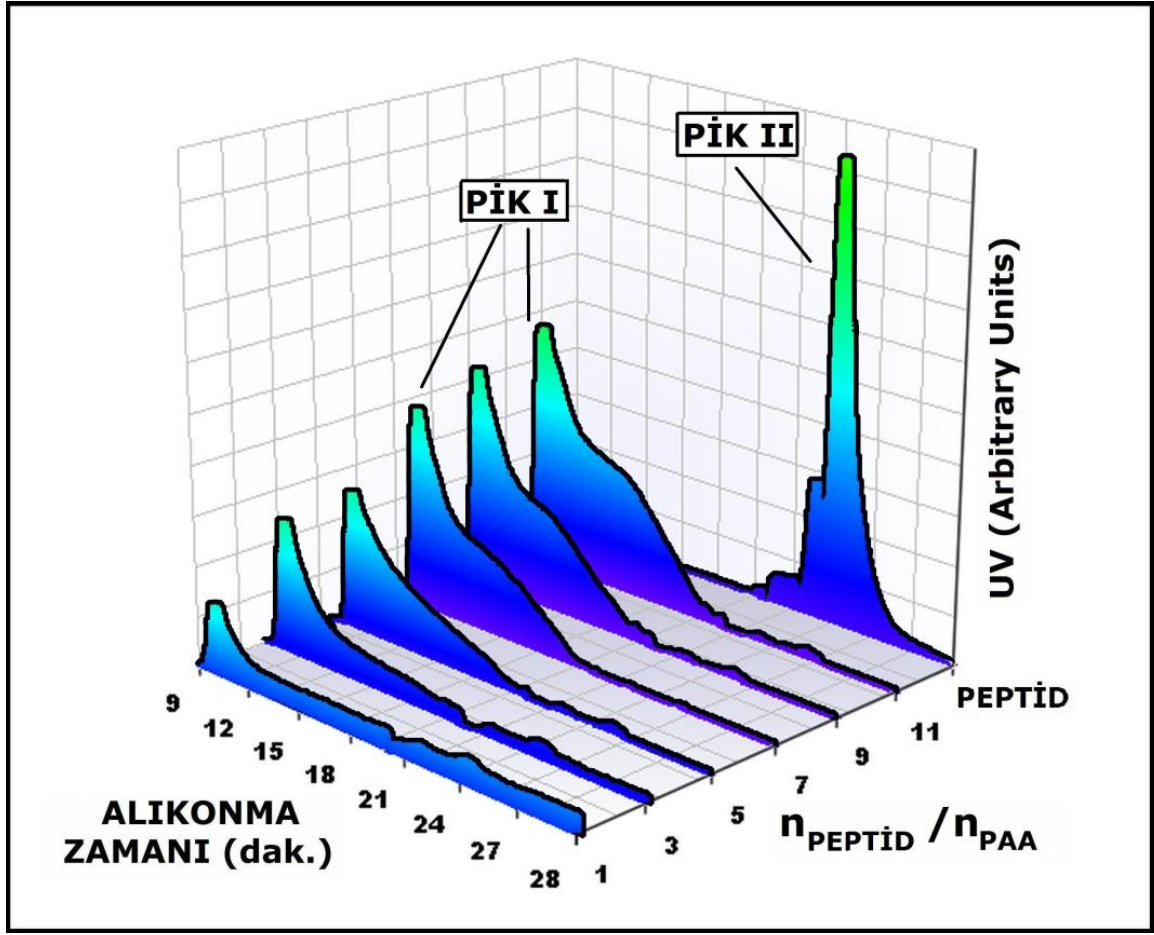
Spektroskopik ve kromatografik analizler sonucunda peptid/PAA biyokonjugatları için en verimli reaksiyon koşulunun C reaksiyon koşulları olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi için peptid/polimer konjugatları $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında C reaksiyon koşullarına göre sentezlenmiştir.

Çizelge 4.10 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

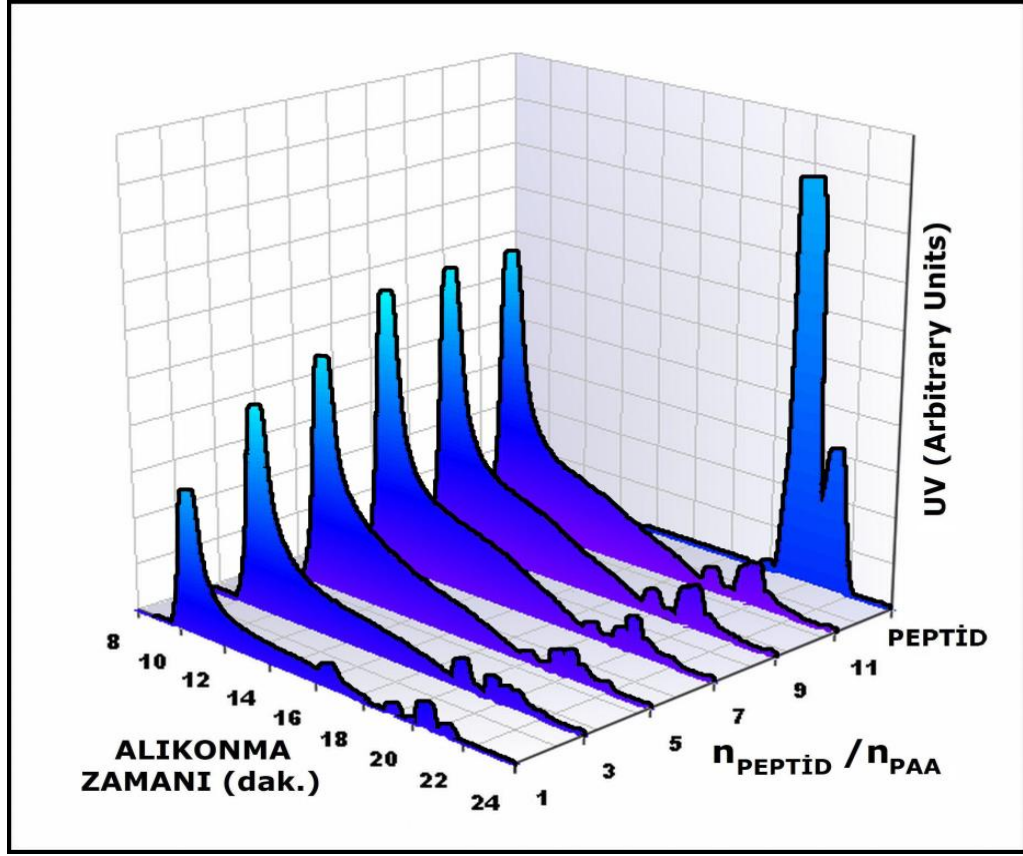
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan DMSO Miktarı (μL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.051	100	7.5	5
3	0.153	100	7.5	5
5	0.255	100	7.5	5
7	0.357	100	7.5	5
9	0.459	100	7.5	5
11	0.561	100	7.5	5



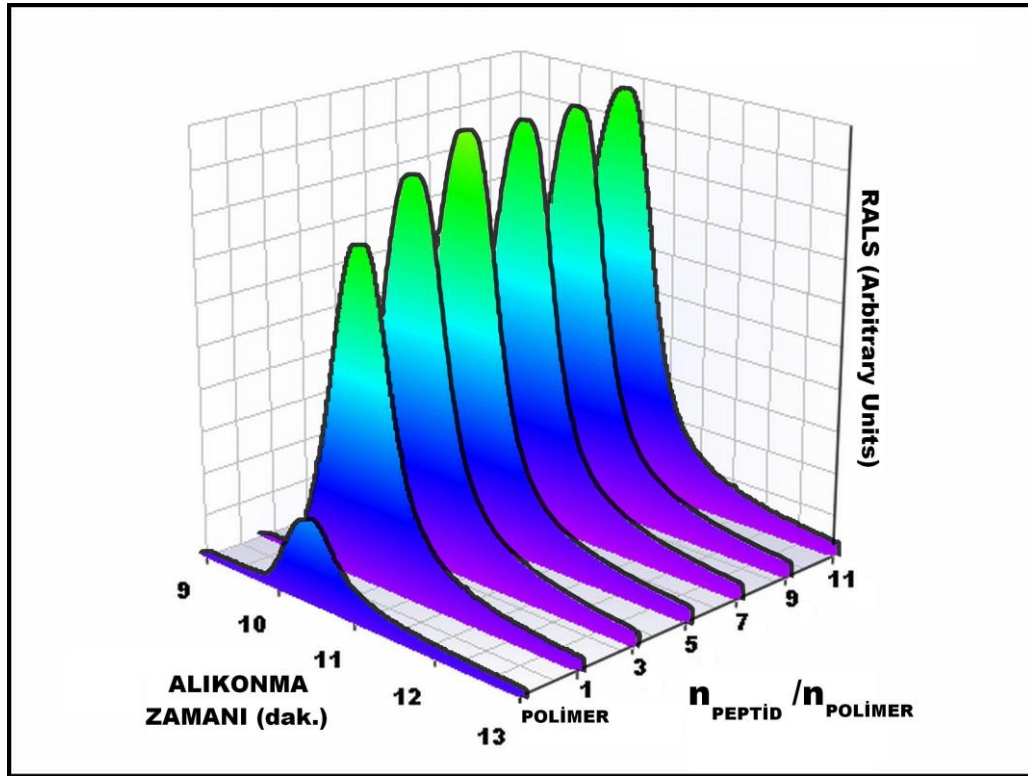
Şekil 4.39 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 dizili peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının konsantrasyona bağlı absorbans değişimi grafiği.



Şekil 4.40 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.

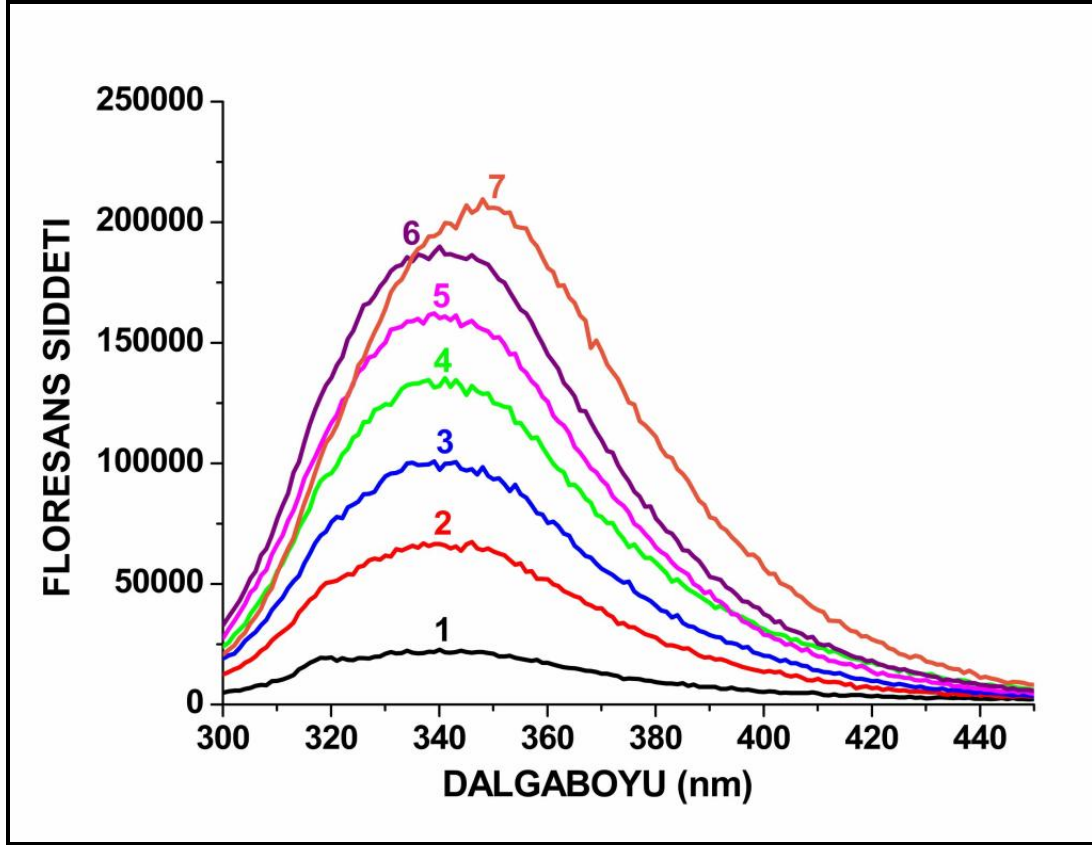


(a)



(b)

Şekil 4.41 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan konjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.



Şekil 4.42 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait Floresans spektrumları; $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (1♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): 3 (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): 5 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): 7 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): 9 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): 11 (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=341\text{nm}$): Serbest peptid (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$).

4.3.1.5 Influenza_A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile EDC varlığında biyokonjugatlarının hazırlanmasında dört ayrı reaksiyon koşulu kullanılmıştır. Farklı koşullarda sentezlenen biyokonjugatlar, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilerek, en fazla verime sahip reaksiyon koşulları belirlenmiştir.

- **A Koşulları**

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4874.35 μL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik

karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. Aktive edilmiş polimer çözeltisinin pH'ı 7.2'ye getirildi. Yaklaşık 1 saat karıştırıldıktan sonra üzerine 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülmüş 0.1929 mg peptid çözeltisi eklendi. +4⁰C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer biyokonjugatının pH'ının 7.2 olduğu kontrol edildi.

- **B Koşulları**

2,5 mg poliakrilik asid (PAA M_w=100000 Da) 4874.35 µL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak aktivasyona bırakıldı. 0.1929 mg peptid 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve aktive edilmiş polimer çözeltisine eklendi. +4⁰C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer biyokonjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

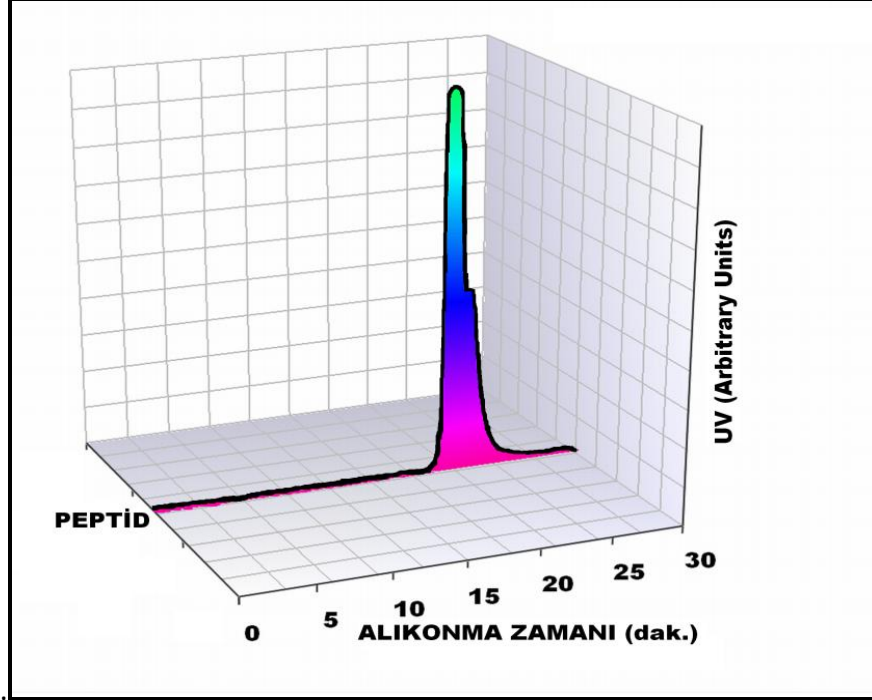
- **C Koşulları**

2,5 mg poliakrilik asid (PAA M_w=100000 Da) 4874.35 µL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. 0.1929 mg peptid 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve polimer çözeltisine eklendi. Peptid/polimer fiziksel karışımı yaklaşık olarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek +4⁰C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer biyokonjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

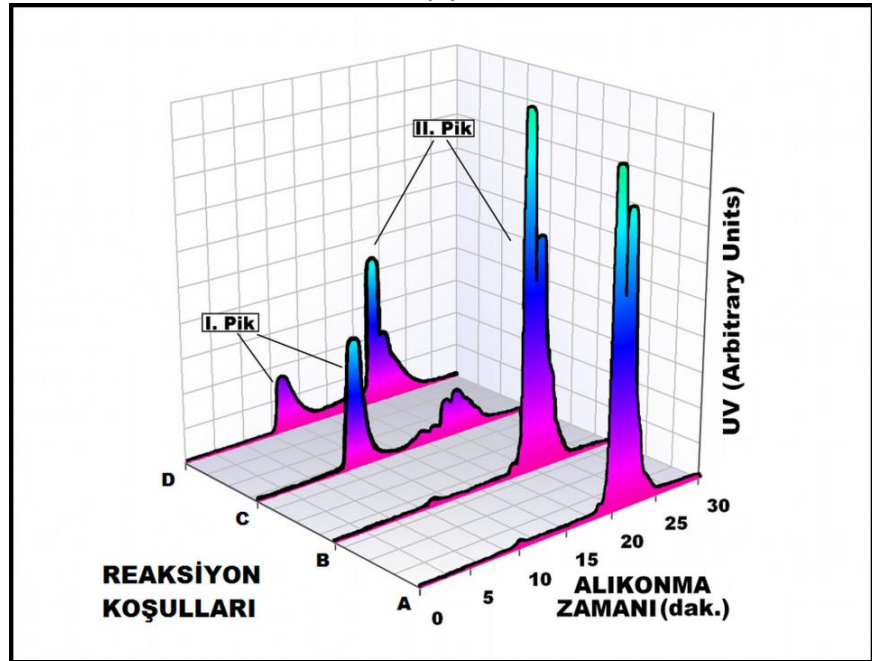
- **D Koşulları**

2,5 mg poliakrilik asid (PAA M_w=100000 Da) 4874.35 µL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.1929 mg peptid 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve polimer çözeltisine eklendi. Peptid/polimer fiziksel karışımı yaklaşık olarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Fiziksel karışımın pH=5'e getirildi. Daha sonra 7.5 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı polimer çözeltisinin üstüne ilave edilerek +4°C'de gece boyunca karıştırılmak üzere bırakıldı. Ertesi gün peptid/polimer biyokonjugatının pH'ı 7.2'ye getirildi. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.

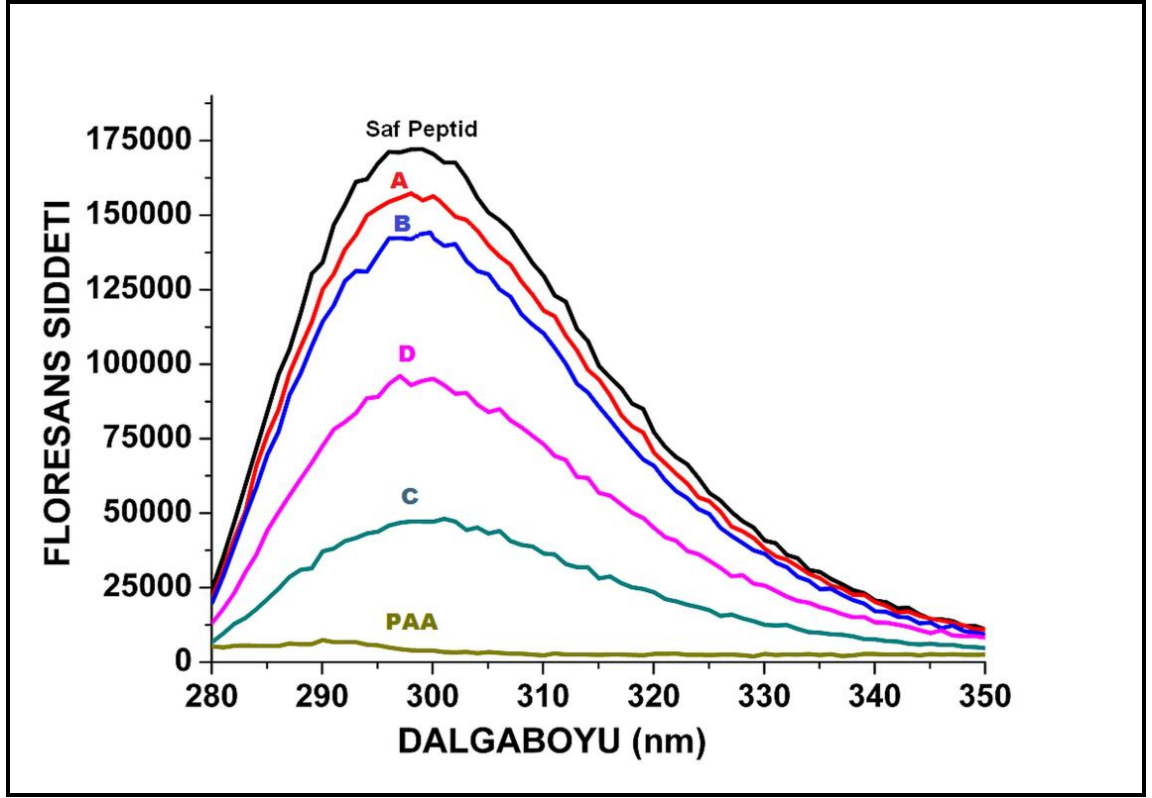


(a)

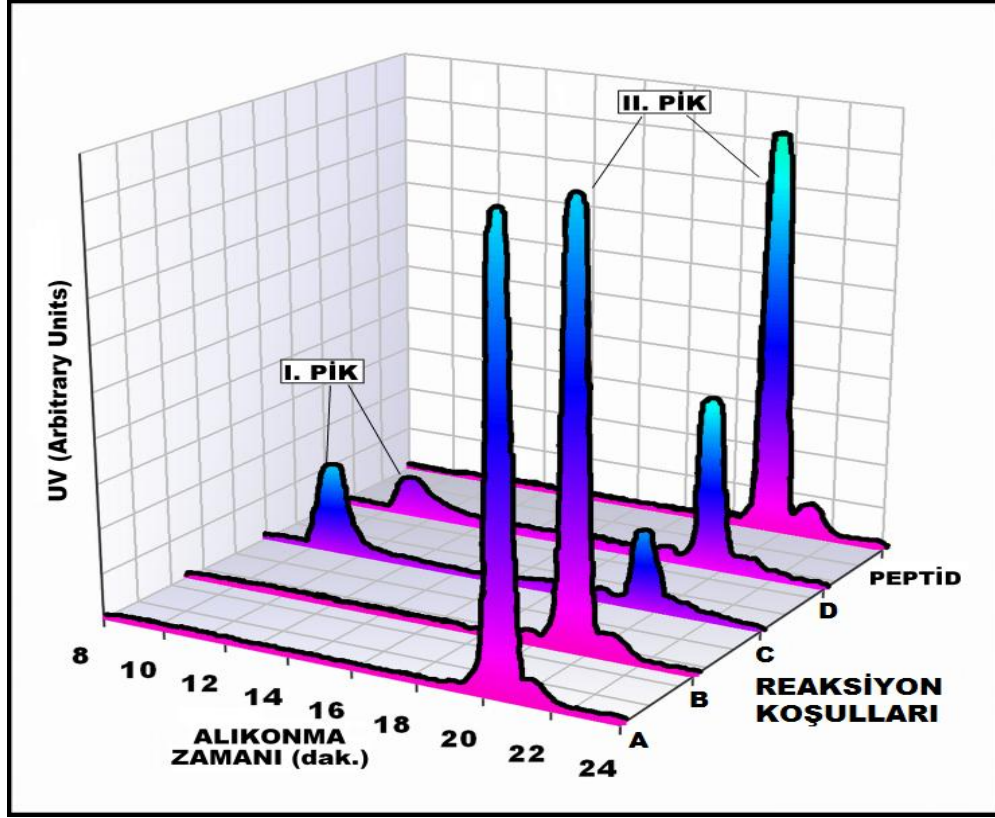


(b)

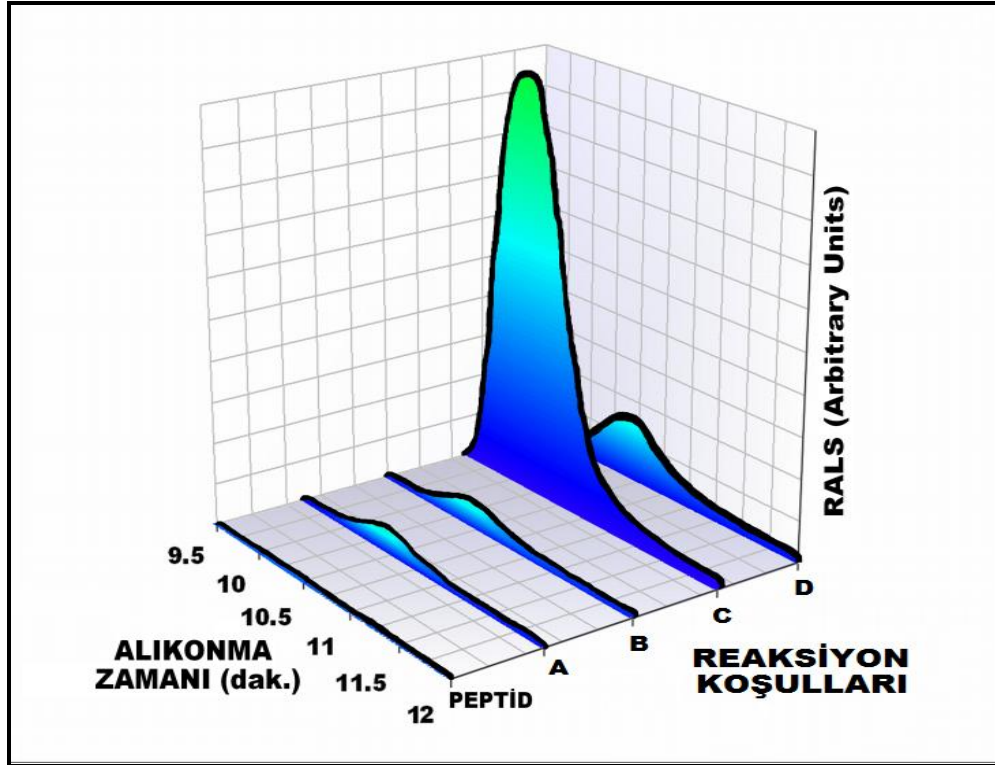
Şekil 4.43(a) Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisine ait HPLC kromatogramı. (b) EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.



Şekil 4.44EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği. (♦) A koşulları, (♦) B koşulları, (♦) C koşulları, (♦) D koşulları, (♦) PAA.



(a)



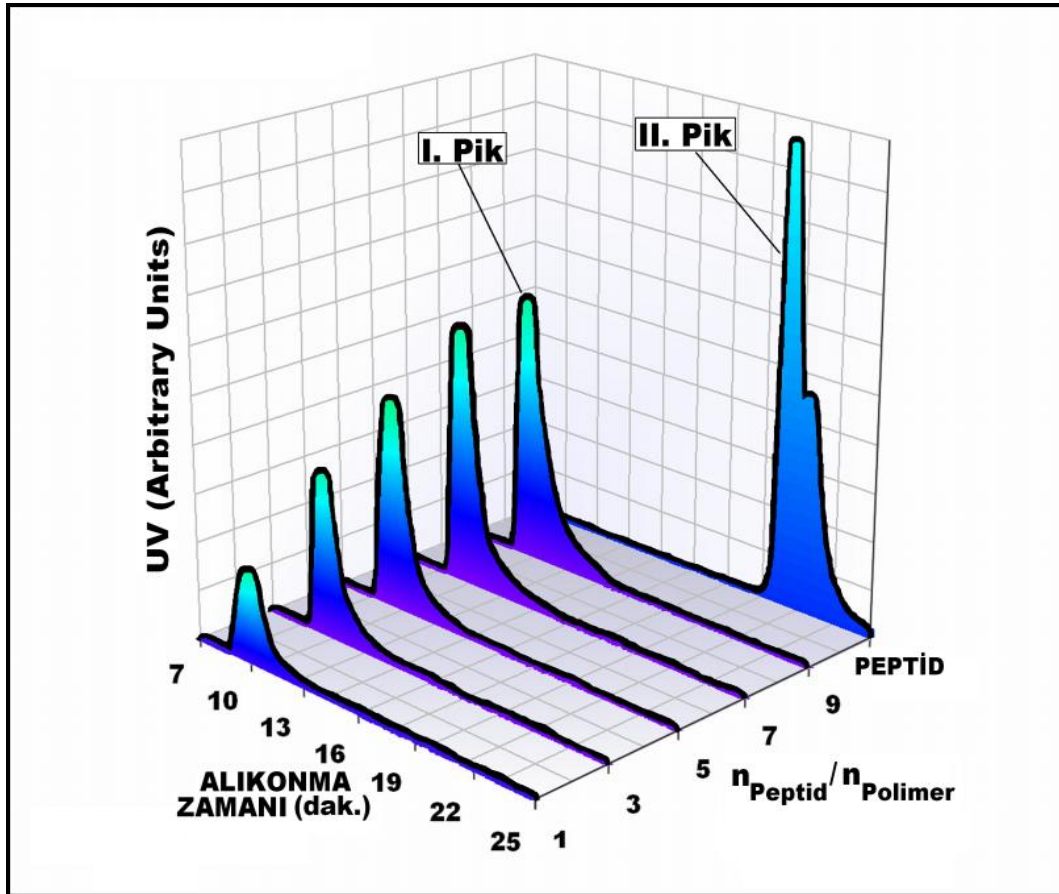
(b)

Şekil 4.45EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.

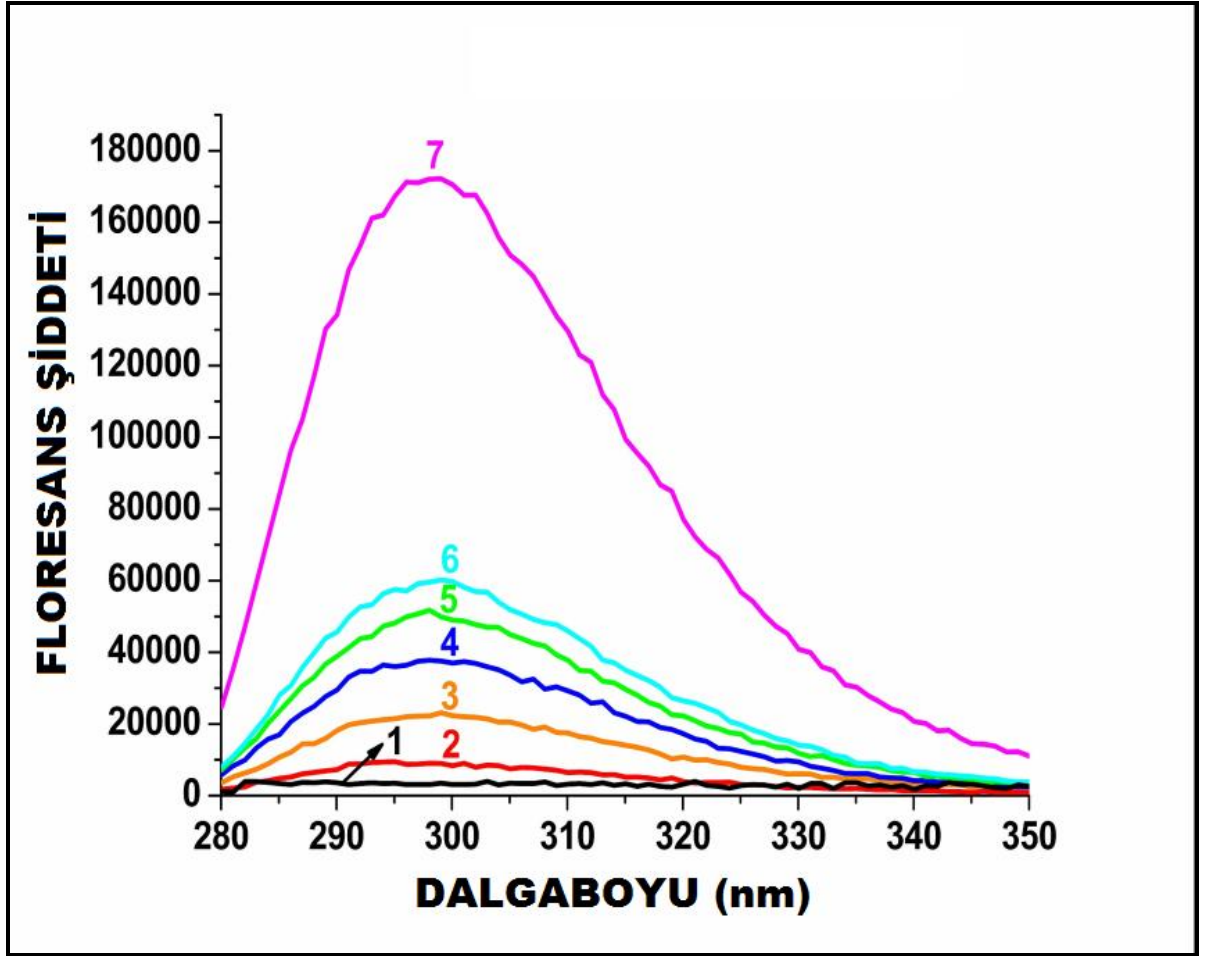
Spektrofluorimetrik ve kromatografik yöntemlerle yapılan analizler sonucunda, 98-106 peptid dizisinin poliakrilik asit ile konjugasyonu için en verimli reaksiyon koşullarının C reaksiyon koşulları olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda 98-106 peptid dizisi için peptid/polimer konjugatları $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9$ oranlarında C reaksiyon koşullarına göre sentezlenmiştir.

Çizelge 4.11 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

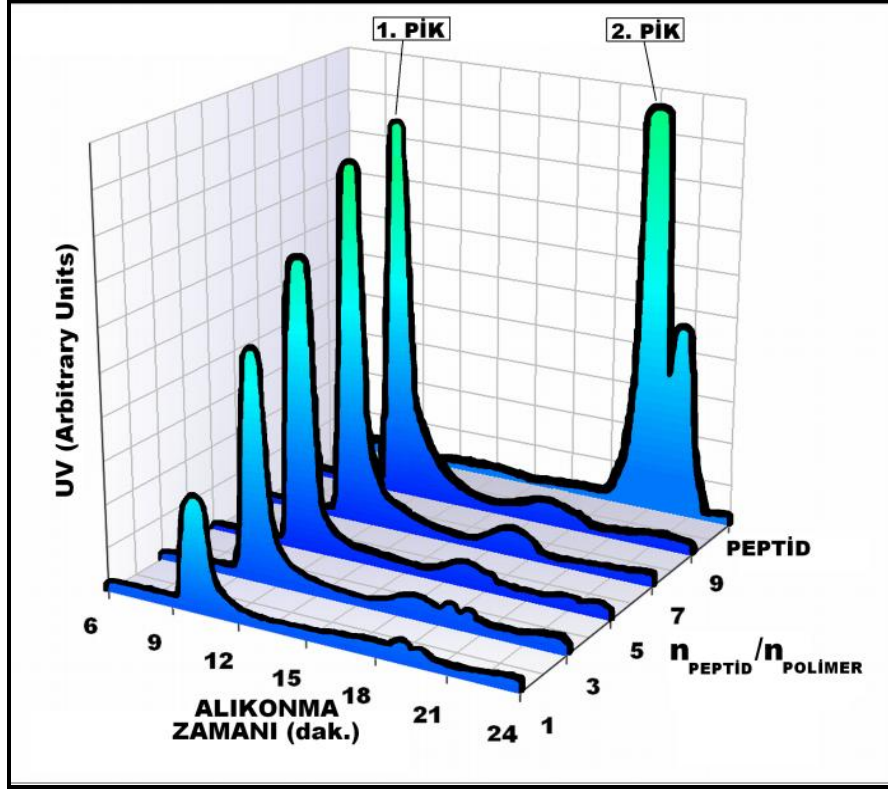
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan DMSO Miktarı (μL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.02756	100	7.5	5
3	0.08267	100	7.5	5
5	0.1378	100	7.5	5
7	0.1929	100	7.5	5
9	0.2480	100	7.5	5



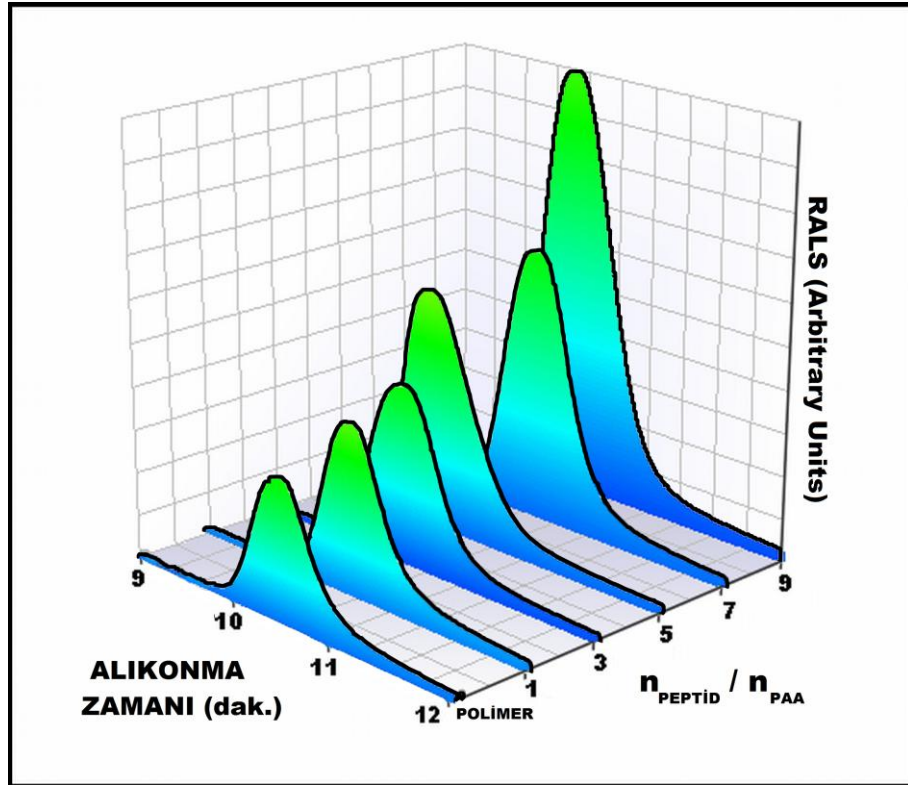
Şekil 4.46 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları.



Şekil 4.47 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptidi ile PAA'nın biyokonjugatlarının floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 3 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 5 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 7 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 9 (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): Serbest peptid (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$).



(a)



(b)

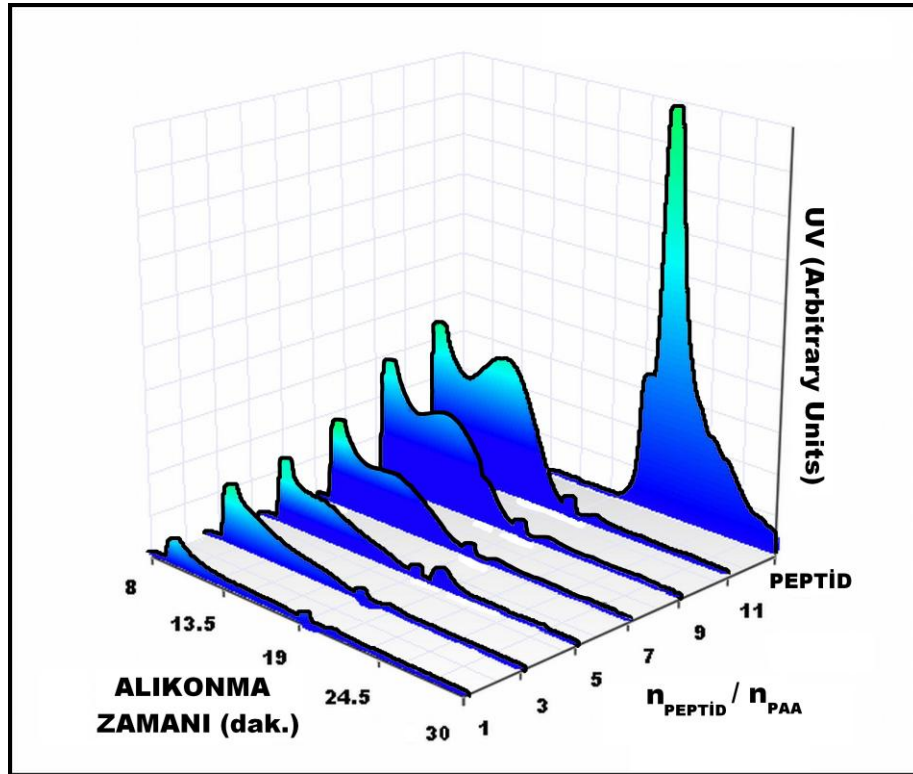
Şekil 4.48 İnfluenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.

4.3.1.6 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugasyonu

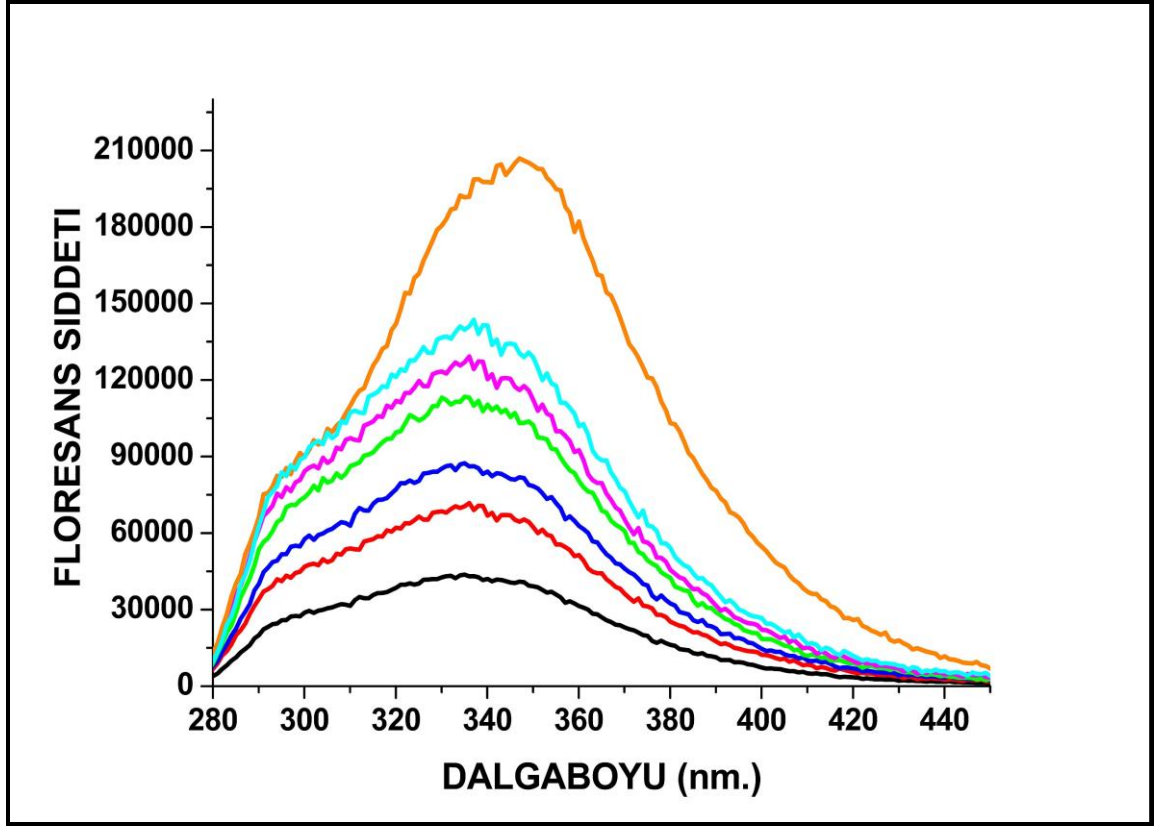
Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile konjugasyonu için en verimli reaksiyon koşullarınının C Koşulları olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda peptid dizisi için peptid/polimer konjugatları $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında EDC varlığında C reaksiyon koşullarına göre sentezlenmiştir.

Çizelge 4.12 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

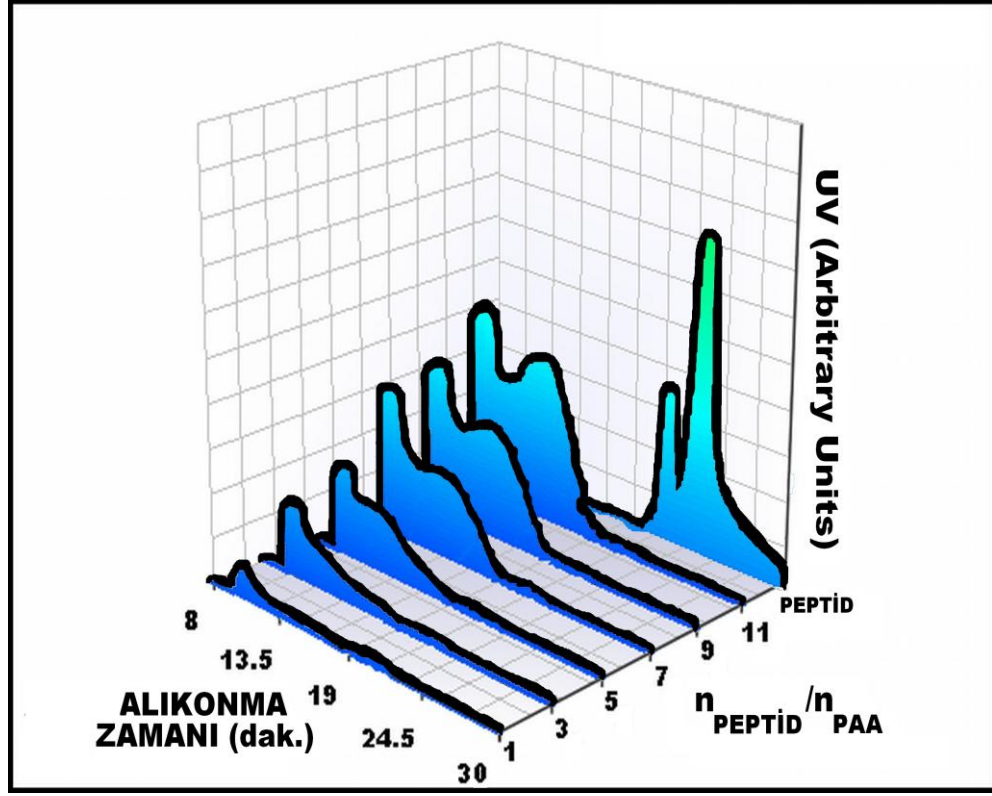
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan DMSO Miktarı (μL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.0556	100	7.5	5
3	0.1668	100	7.5	5
5	0.278	100	7.5	5
7	0.3892	100	7.5	5
9	0.5004	100	7.5	5
11	0.6116	100	7.5	5



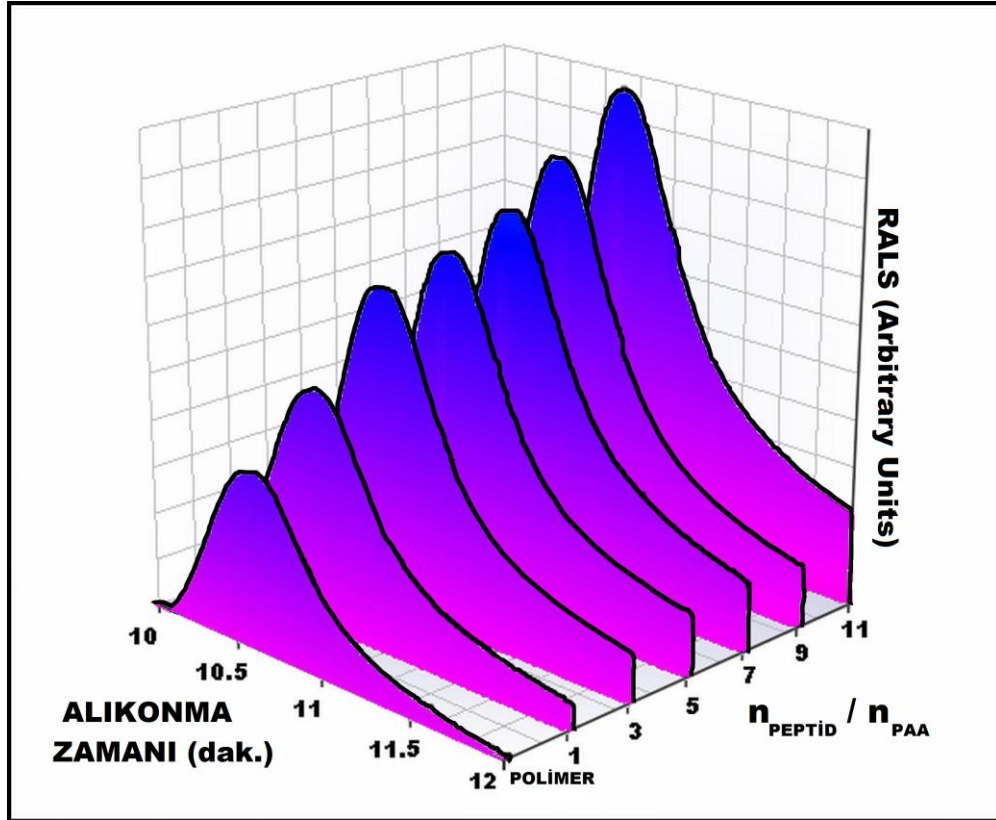
Şekil 4.49 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramları.



Şekil 4.50 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptidi ile PAA'nın biyokonjugatlarının floresans spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (♦) ($\lambda_{\text{max}}=334\text{nm}$): 3 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): 5 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): 7 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): 9 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): 11 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): Serbest peptid (♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$).



(a)



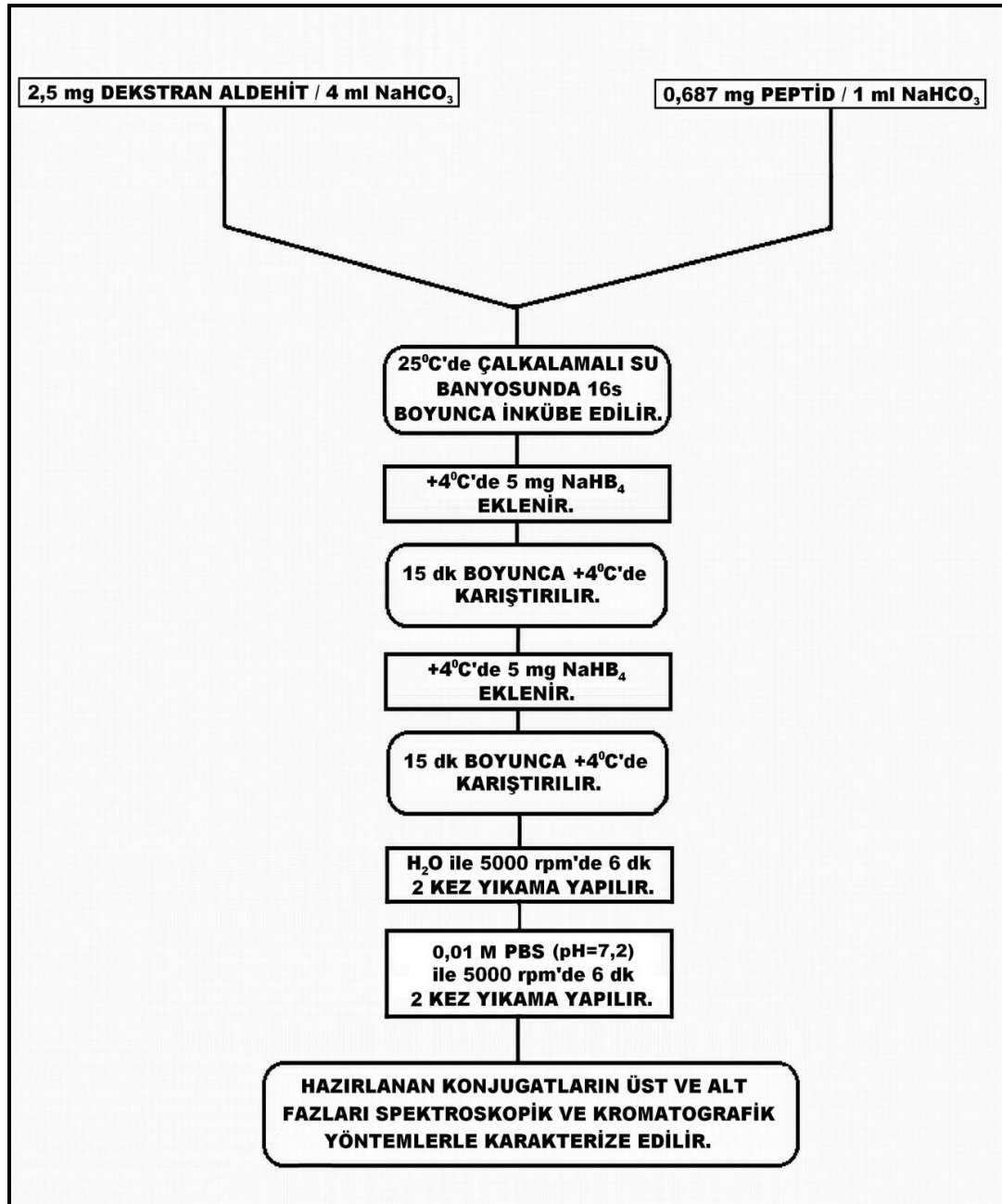
(b)

Şekil 4.51 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile olan biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.

4.3.2 Dekstran Aldehit ile Konjugasyon Yöntemi

4.3.2.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Dekstran Aldehit ile Konjugasyonu

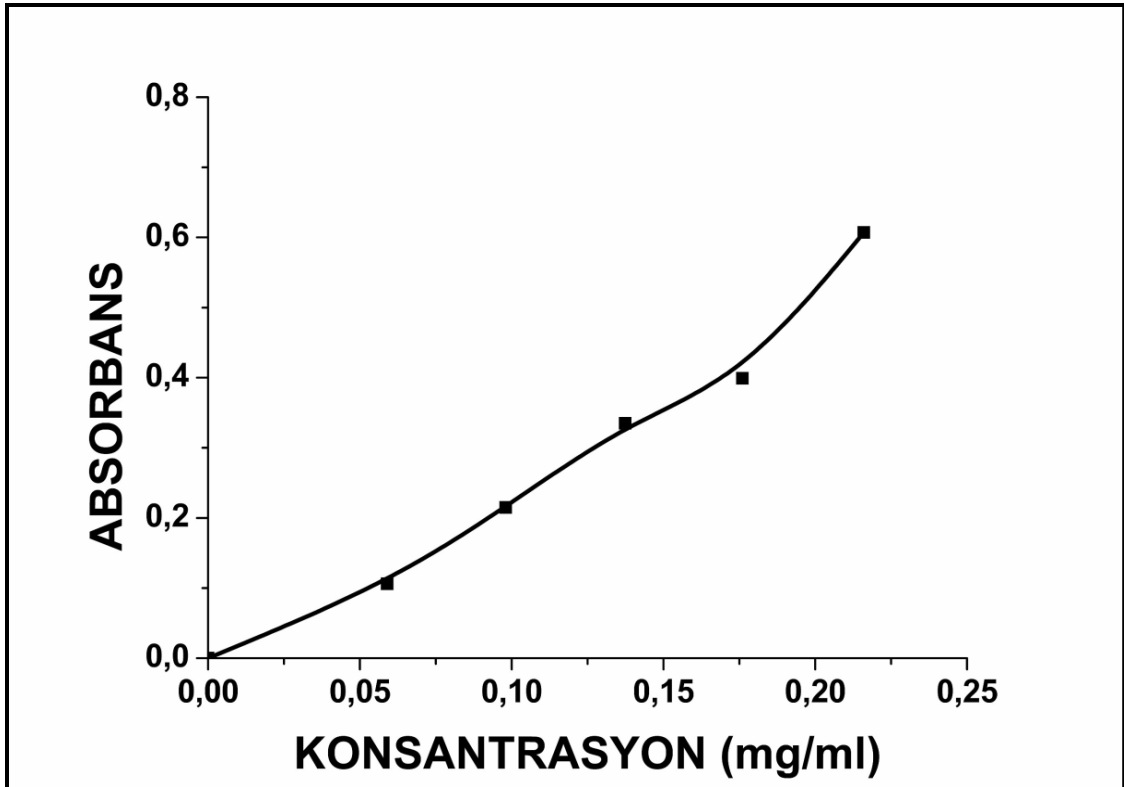
Şekil 4.52’de gösterilen yöntem uygulanarak, Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin dekstran aldehit ile olan konjugatları n=3,5,7,9,11 mol oranlarında sentezlenmiştir.



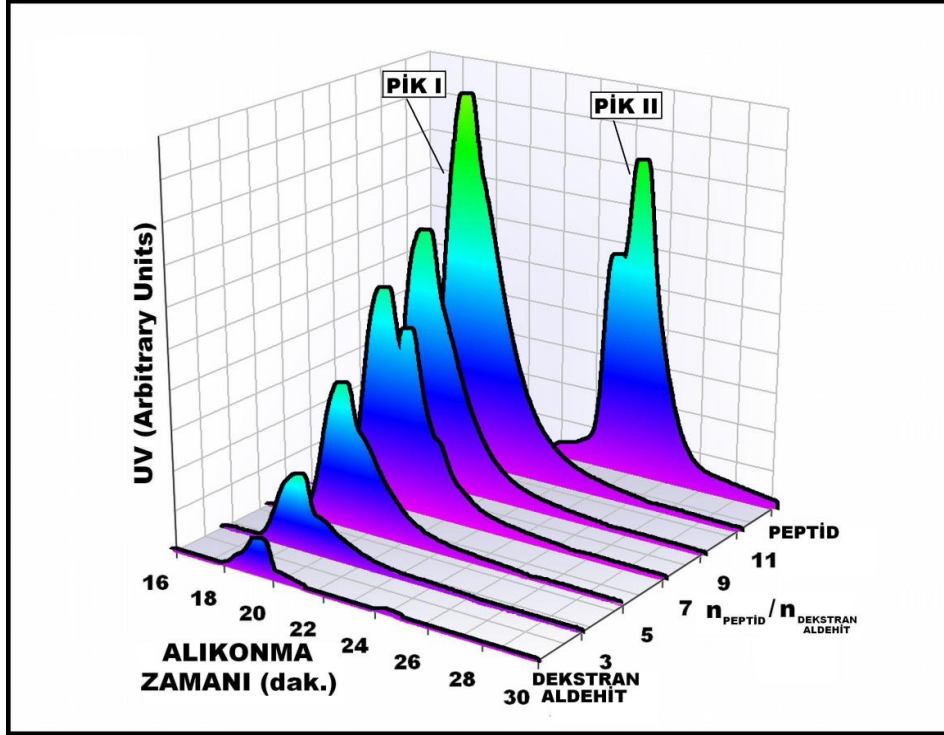
Şekil 4.52 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyon reaksiyonu aşamaları.

Çizelge 4.13 Influenza A Virüsü M2e Proteini peptid dizisinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyon reaksiyonu için gerekli bileşlerin miktarları.

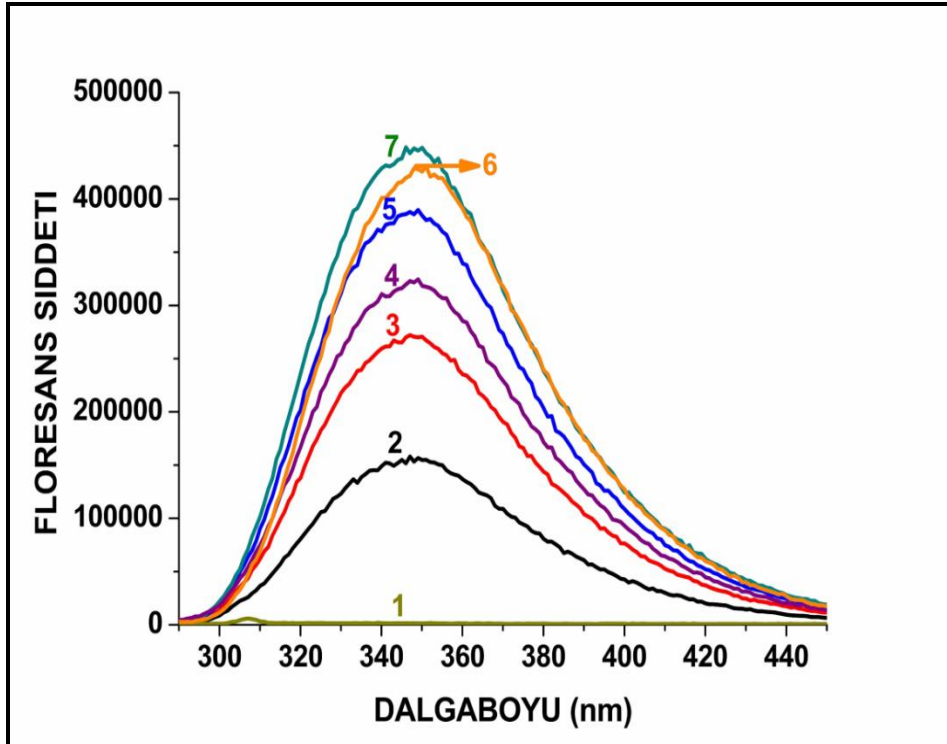
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{DA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan NaHCO_3 Miktarı (μL)	Kullanılan NaBH_4 Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
3	0.295	1000	10	5
5	0.49	1000	10	5
7	0.687	1000	10	5
9	0.88	1000	10	5
11	1.08	1000	10	5



Şekil 4.53 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit biyokonjugatlarının konsantrasyona bağlı absorbans değişimi grafiği.



Şekil 4.54 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile konjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.

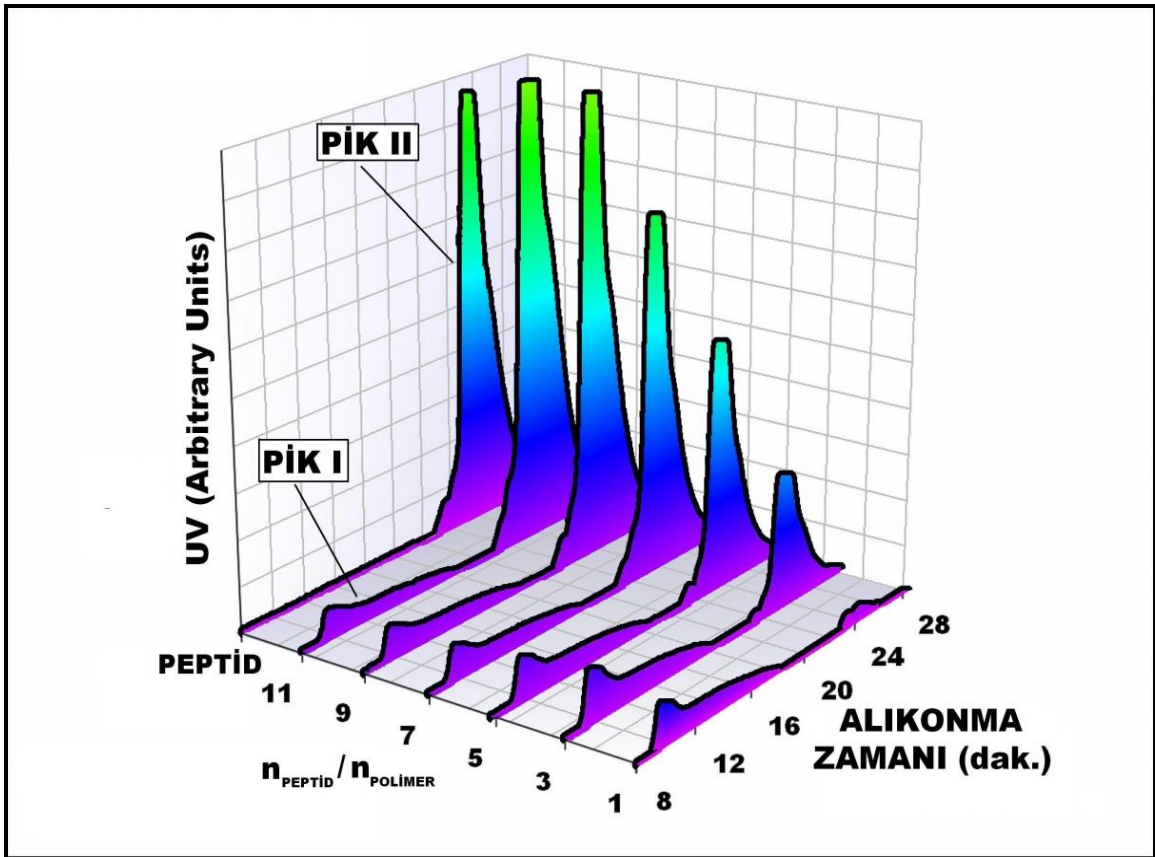


Şekil 4.55 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları:
 (♦) Dekstran Aldehit (1), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 5 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 7 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 9 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): Serbest peptid (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$): 11 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$).

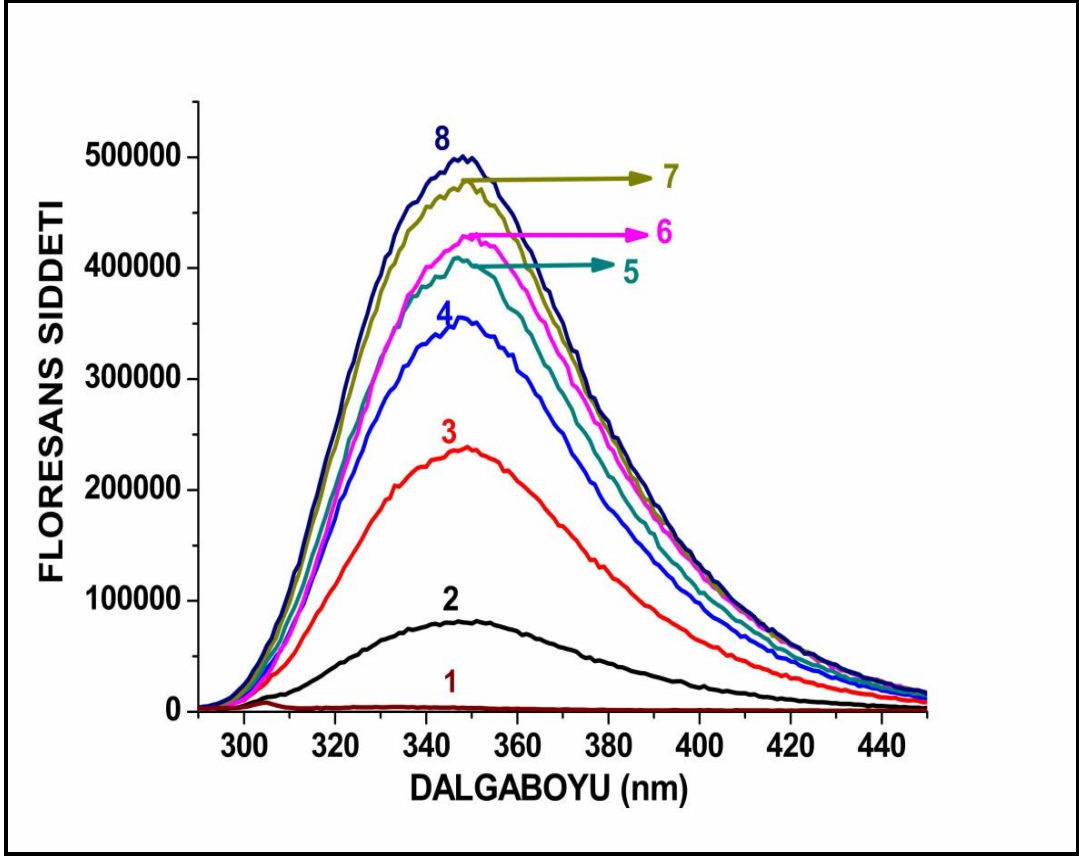
4.3.3 Kompleks Oluşumu Yöntemi

4.3.3.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Kompleksleri

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4263 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.



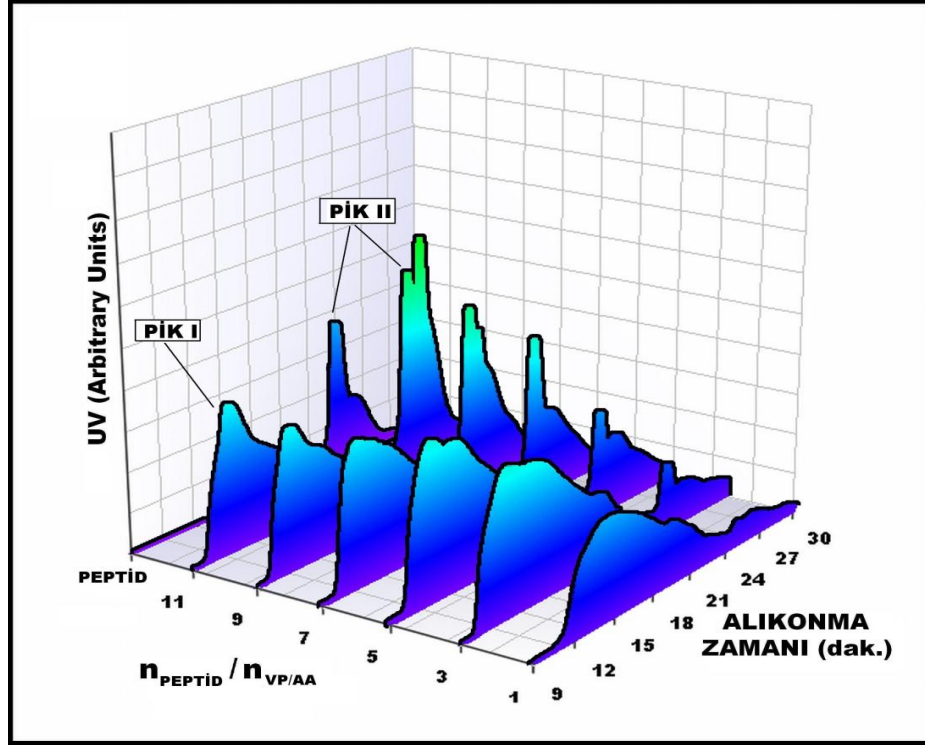
Şekil 4.56 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.



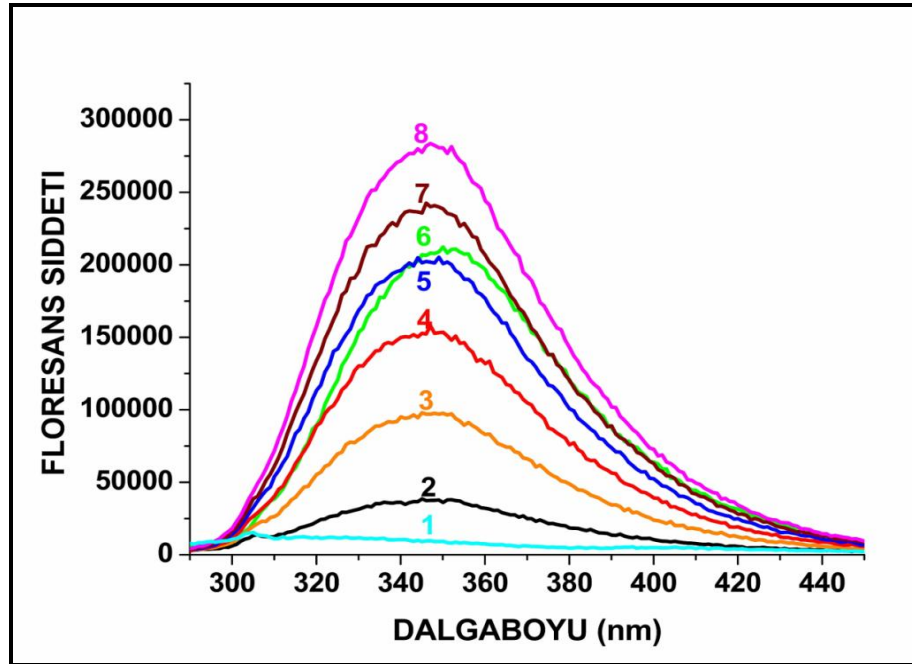
Şekil 4.57 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı floresans spektrumları: **Polimer (PAA)** (1♦), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): **3** (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): **5** (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): **7** (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=349\text{nm}$): **9** (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=351\text{nm}$): **11** (8♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): **Serbest peptid** (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$).

4.3.3.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin VP-co-AA ($M_w=250.000$ Da) Kopolimeri ile Kompleksleri

2,5 mg VP-co-AA kopolimeri 4263 μL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki VP-co-AA çözeltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.



Şekil 4.58 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.

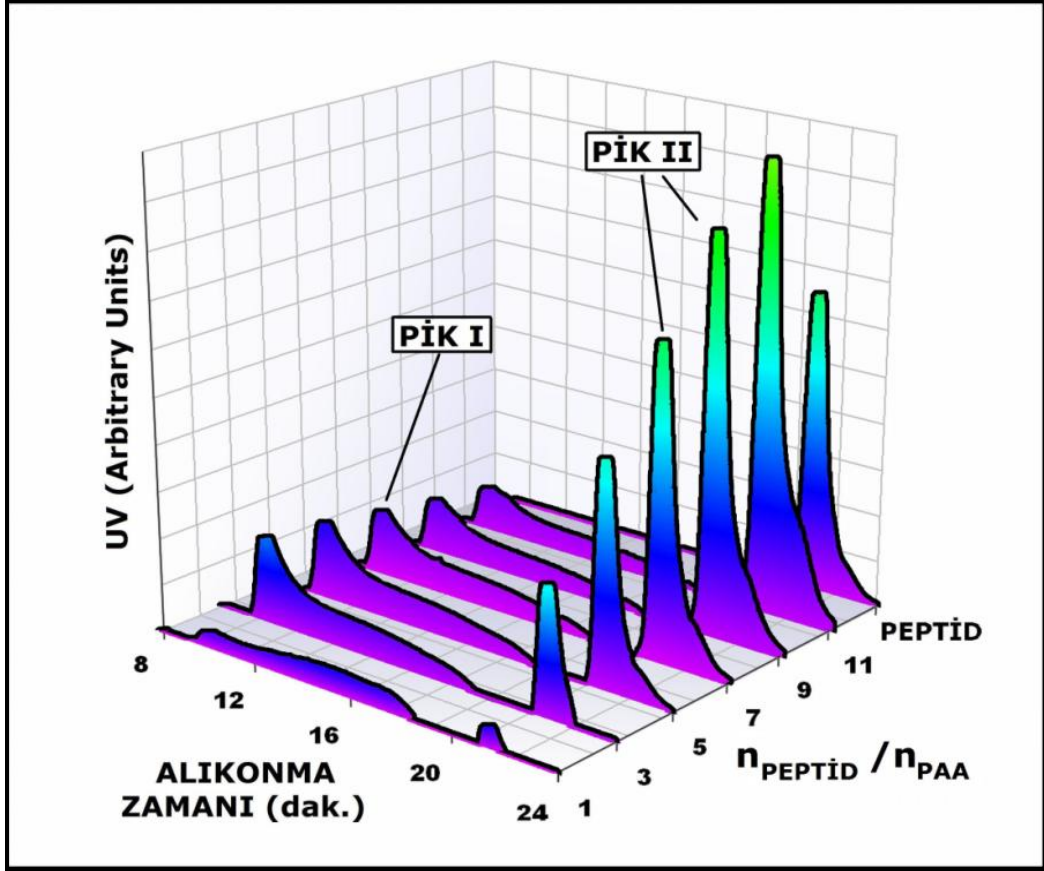


Şekil 4.59 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin P(VP-ko-AA)] ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı

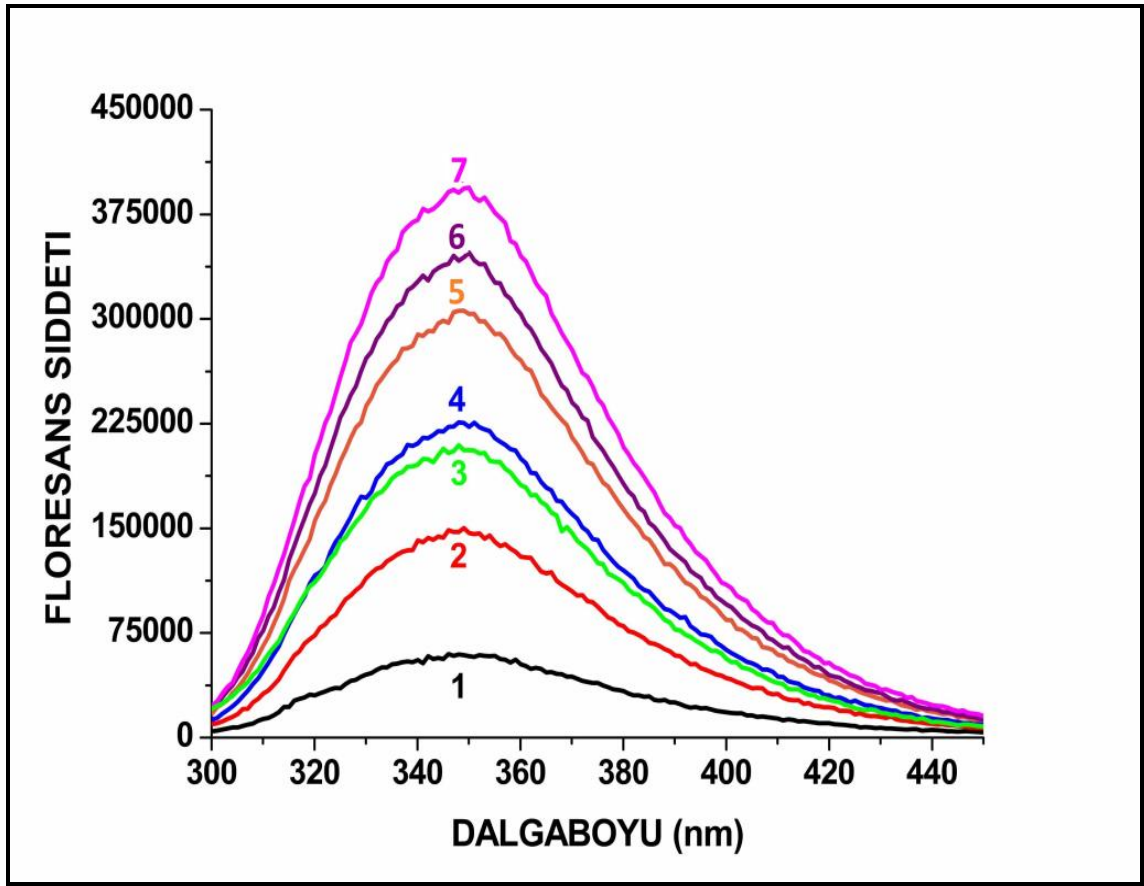
Floresans Spektrumları: VP/AA ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri (1♦),
 $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 3 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 5 (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 7 (5♦)
 ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): Serbest peptid (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=353\text{nm}$): 9 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 11 (8♦)
 ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$).

4.3.3.3 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4621.5 μ L PBS tamponunda çözöldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözöltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözöltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.



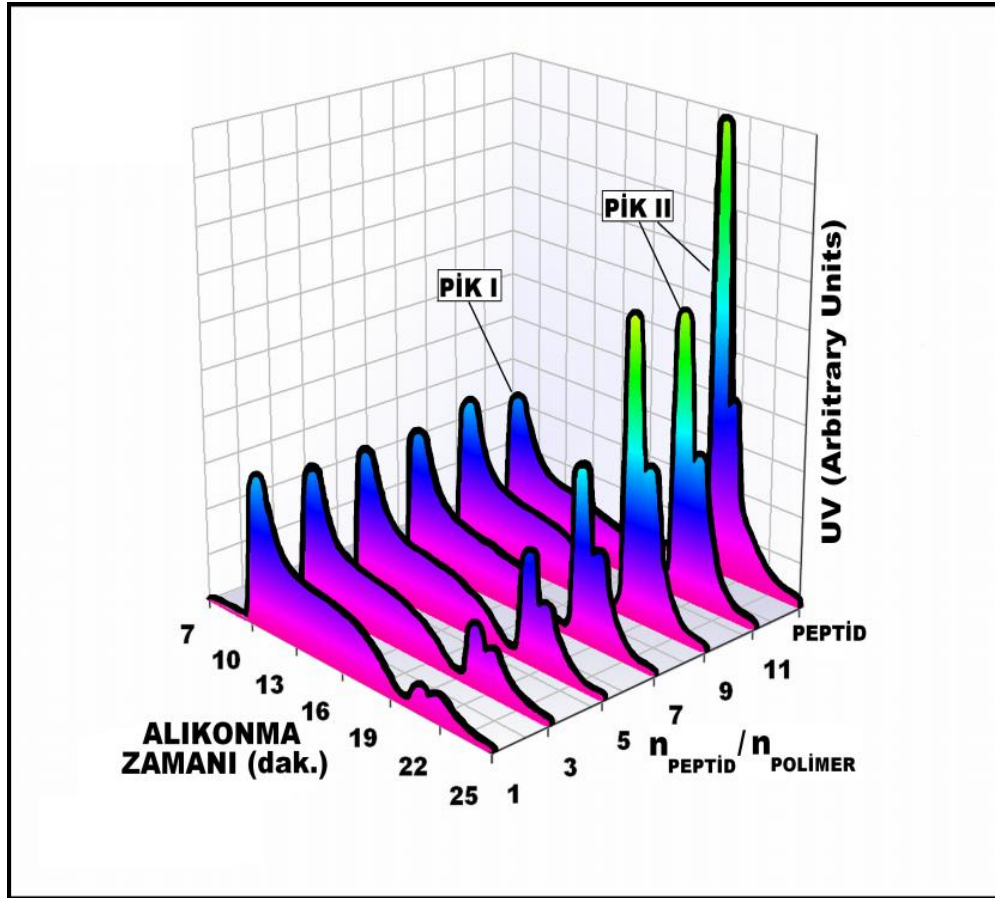
Şekil 4.60 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan komplekslerine ait HPLC kromatogramları.



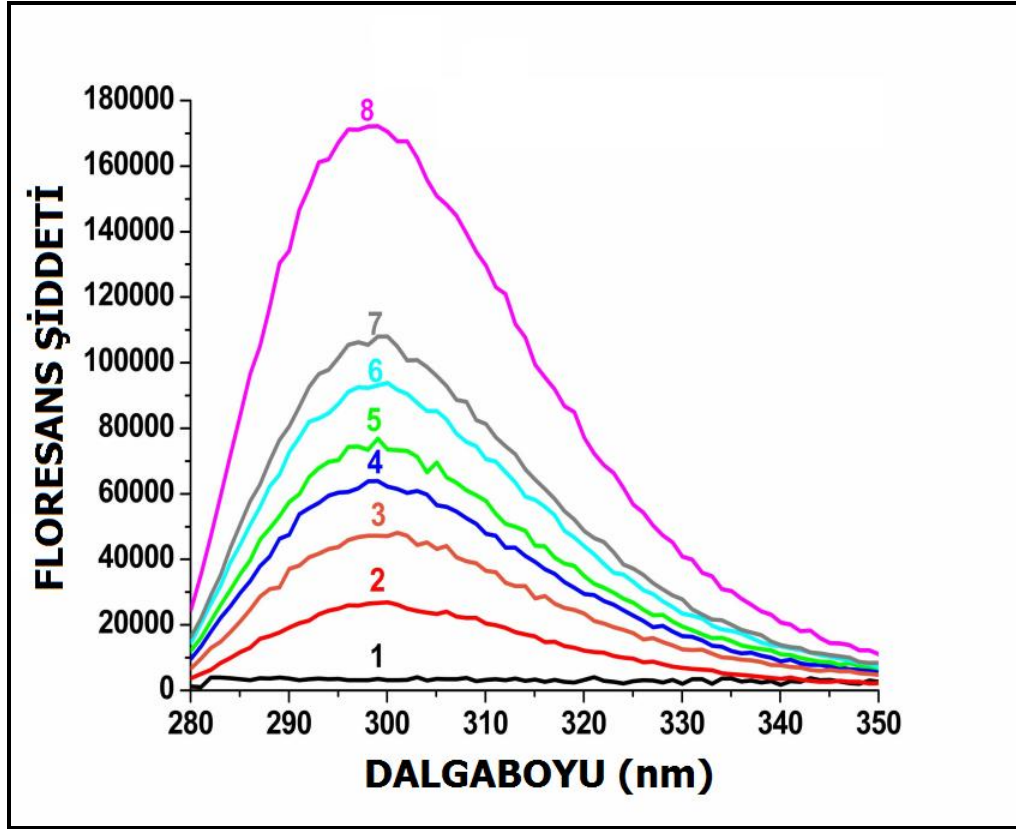
Şekil 4.61 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan komplekslerine ait Floresans spektrumları;
 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (1♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): 3 (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): 5 (3♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): 7 (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): 9 (6♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): 11 (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$): Serbest peptid (4♦) ($\lambda_{\text{max}}=350\text{nm}$).

4.3.3.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4874.35 μ L PBS tamponunda çözöldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözöltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözöltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.



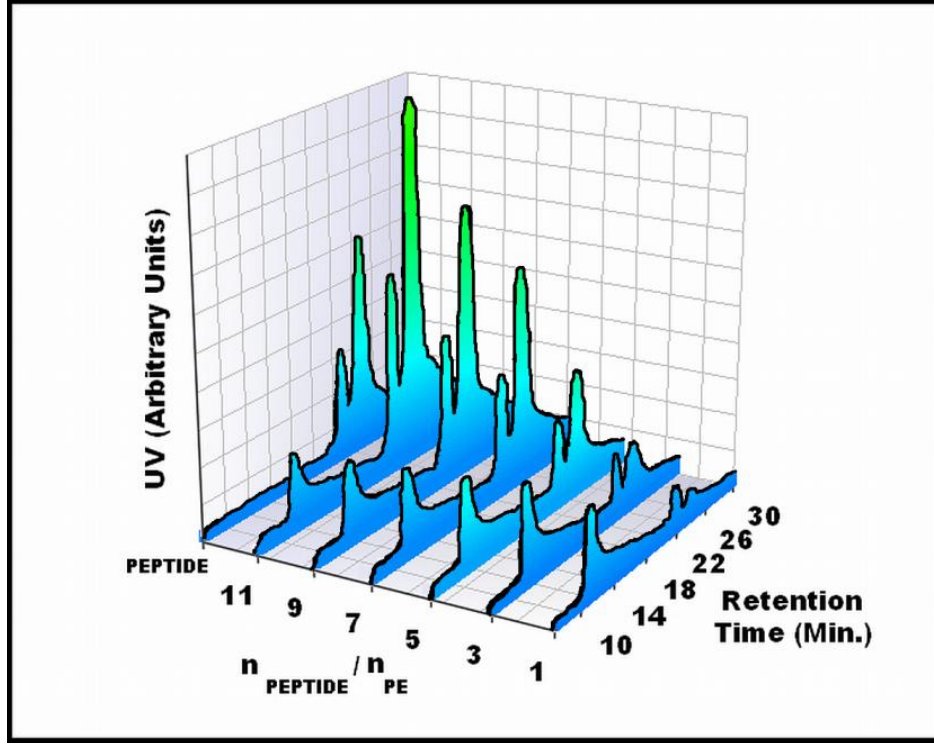
Şekil 4.62 Farklı mol oranlarında sentezlenen 98-106 peptid dizisi PAA komplekslerine ait HPLC kromatogramları.



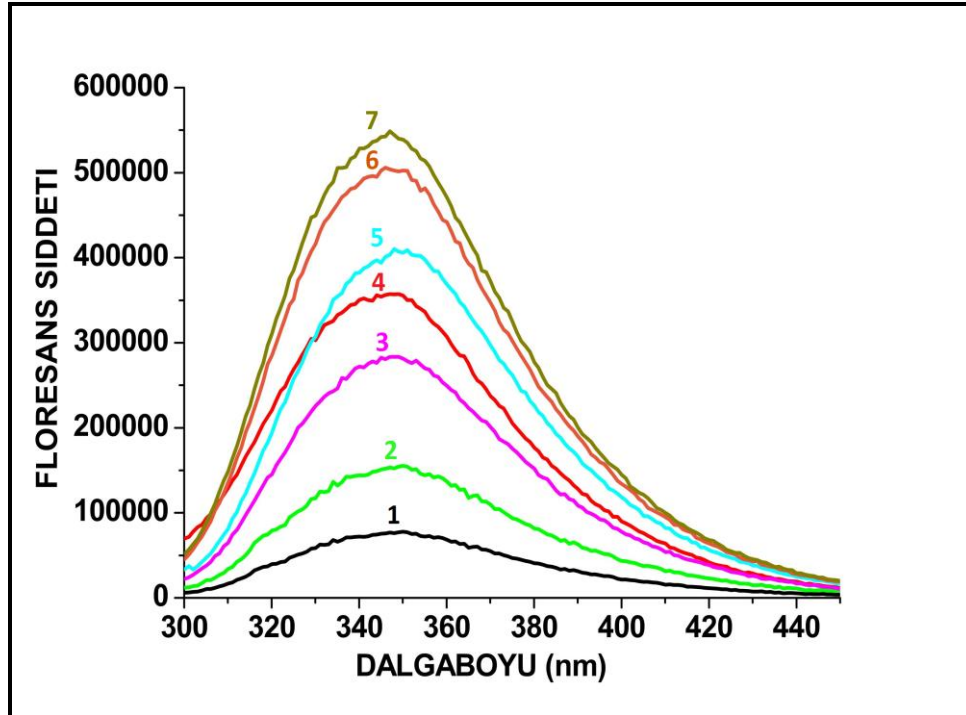
Şekil 4.63 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptidi ile PAA'nın komplekslerinin floresans spektrumları: Polimer (PAA) (1), $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (2♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 3(3♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 5(4♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 7(5♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): 9(5♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$): Serbest peptid (7♦) ($\lambda_{\text{max}}=300\text{nm}$).

4.3.3.5 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Kompleksleri

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4624 μL PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}=1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.



Şekil 4.64 İnfluenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile komplekslerine ait HPLC kromatogramları.



Şekil 4.65 İnfluenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin poliakrilik asit ile komplekslerine ait floresans spektrumları.: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$ (♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 3 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 5 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$): 7 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=345\text{nm}$): 9 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=345\text{nm}$): 11 (♦) ($\lambda_{\text{max}}=335\text{nm}$): Serbest peptid (5♦) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$).

4.4 Hücre Deneyleri

Hücre canlılığını ölçmek için kullanılan başlıca yöntemlerden birisi olan 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) testi, hücreler üzerindeki toksik etkinin incelenmesine dayanan pratik bir tekniktir. MTT testi ilk Mossmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen, hücre büyümesi veya hücre ölümünü değerlendirmeye olanak sağlayan indirekt bir testtir [144], [145]. Kültür ortamındaki hücrelere uygulanan ve hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçüldüğü kolorimetrik bir yöntemdir. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzimi ile reaksiyon girip mor renkli, suda çözünmeyen formazan kristaline indirgenen bir maddedir. Bu reaksiyon sadece canlı hücrelerde gerçekleşir. Oluşan kristaller, DMSO veya izopropanol ile çözündürülerek mikroskopik olarak gözlemlenebilir ve mor renk kolorimetrik olarak ölçülebilir. Mor renkli ürünün toplam miktarı hücre popülasyonundaki dehidrojenaz enziminin toplam aktivitesini verir ve hücre canlılığının ölçütü olarak alınır. Ölçülen optik değer hücrelerin canlılığı ile doğrudan orantılıdır [144], [145] [146].

4.4.1 MCF 7 Hücrelerinin Kültürünün Yapılması

İnvert mikroskopla incelenerek yüzey kaplamasının tamamen gerçekleştiği tespit edildikten sonra kültür pasajı yapıldı. Tek tabakalı hücre kültürünün üst kısmındaki besiyeri döküldü, 1xPBS ile yıkandı ve 1 ml tripsin eklenerek 37°C'lik %5 CO₂ etüvde bekletildi. Yaklaşık 5-10 dakika sonra hücrelerin kalkması takip edildi ve flask içersindeki hücreler 5 ml besiyeri ile santrifüj tüpüne aktararak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pellet süspanse edildi ve sayımı yapıldı. 1x10⁵ hücre 7,5 ml DMEM-F12 (%10 FCS) içersinde yeni flaska ekilip, 37°C %5 CO₂ etüvüne kaldırıldı.

4.4.2 Hücrelerin Sayılması

Toplam hücre süspanسیونunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan 1 mm²'lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip Toma lamı kullanıldı. Süspanسیونun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı/ml} = \text{Sayım Sonucu} \times 10^4 \times \text{Medyum Miktarı (ml)}$$

4.4.3 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugatının Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Canlılığı ölçülecek hücreler her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde, düztabanlı 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan veya yeterli yoğunluğa ulaştıktan, 24 saat inkübe edildikten sonra ortama Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin poliakrilik asit ile biyokonjugatı 0,05:0,5:1:2:3,5:5 mg/ml oranlarında ilave edildi. Biyokonjugatlar ile 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dakika oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözündüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm'de dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

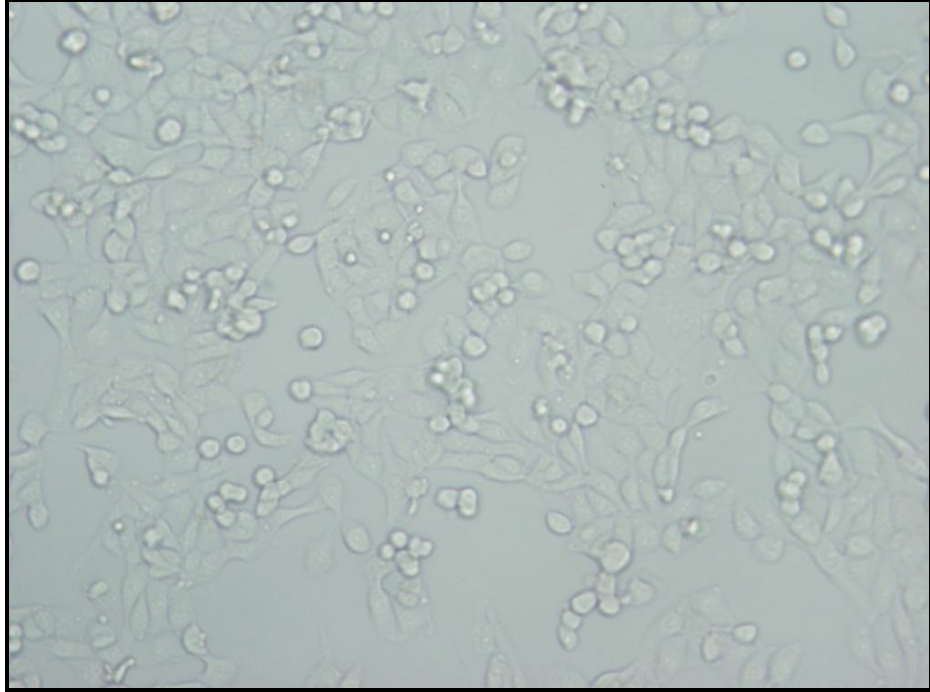
4.4.4 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugatının Flow Sitometrik Yöntem ile İncelenmesi (7-AAD boyama)

7 -Amino-Aktinomisin D (7-AAD) , DNA'nın sitozin ve guanin bazları arasına giren bir nükleik asit boyası olup canlı olan hücreleri canlı olmayanlardan ayırt edilmesinde kullanılır.

MCF-7 hücrelerinin kültüründe 6 kuyucuklu kültür plağı (TPP) kullanıldı. Thoma lamında hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 25x10⁴ hücre olacak şekilde %10 FBS içeren RPMI 1640 medyumlu hücre süspansiyonundan eklendi. Hücrelerin adhezyonu için 24 saat 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. Hücrelerin üzerine konjugatların farklı konsantrasyonları eklenerek, 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelere 7-AAD çalışma solusyonundanda 5 µl ve bağlama tamponundanda 100 µl eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 15 dakika

inkübasyondan sonra her örneğe 900 µl daha bağlama tamponundan eklendi. Son olarak tüm örnekler 1 saat içinde flow sitometride analiz edildi.

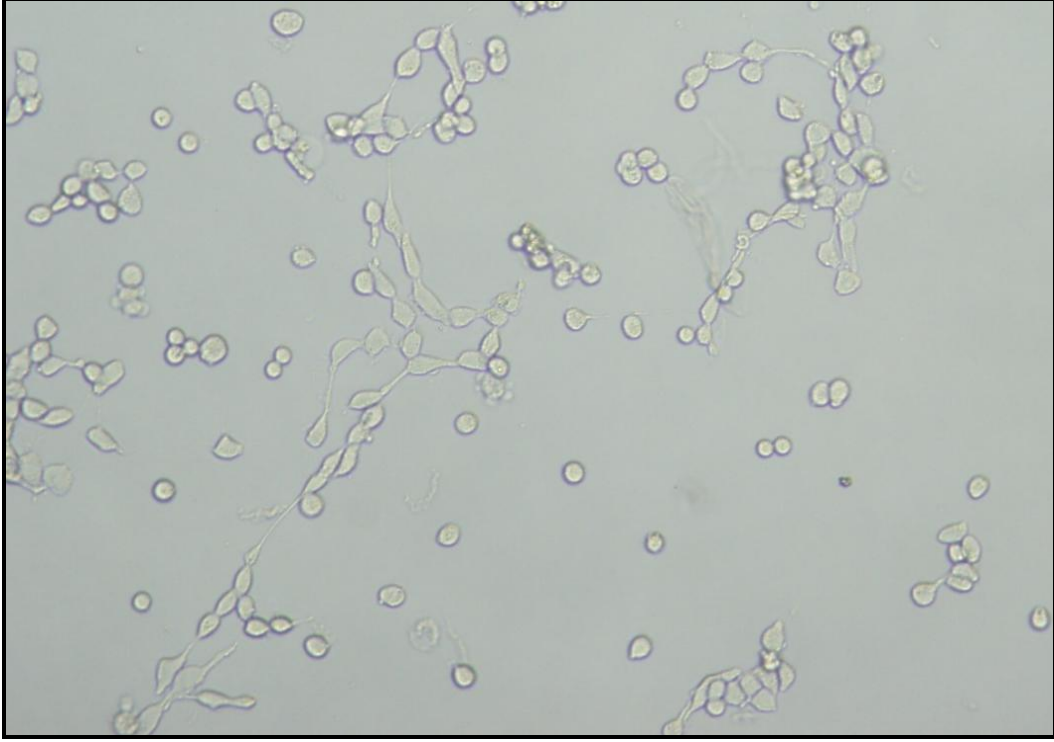
4.4.5 Sonuçlar



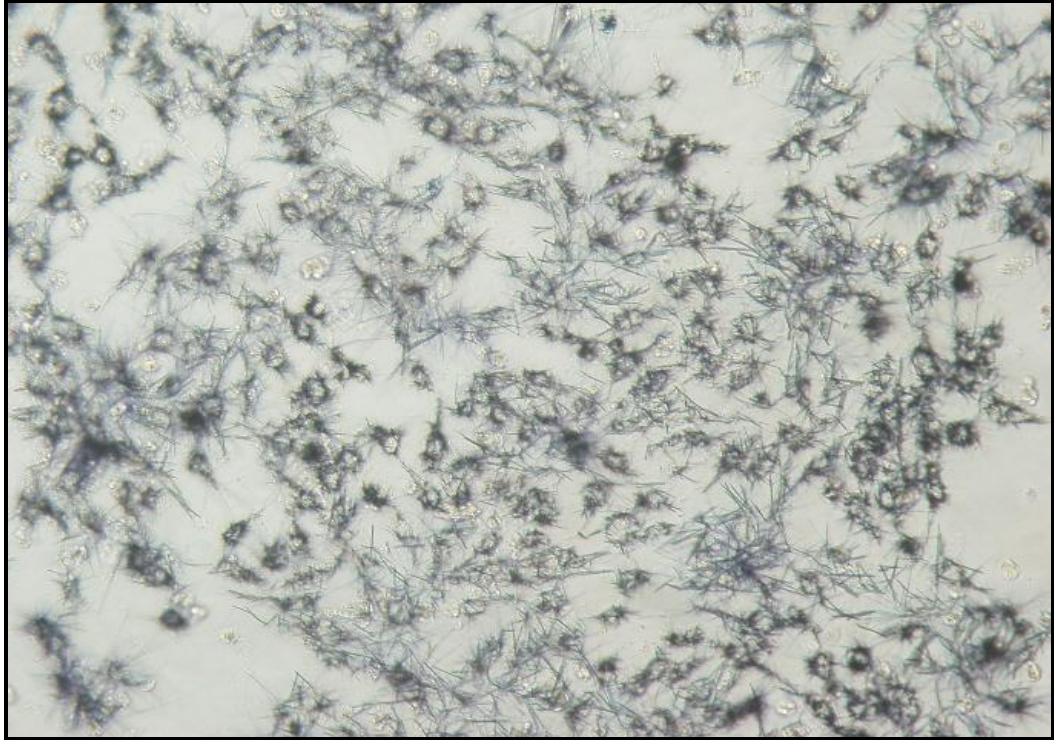
Şekil 4.66 Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü



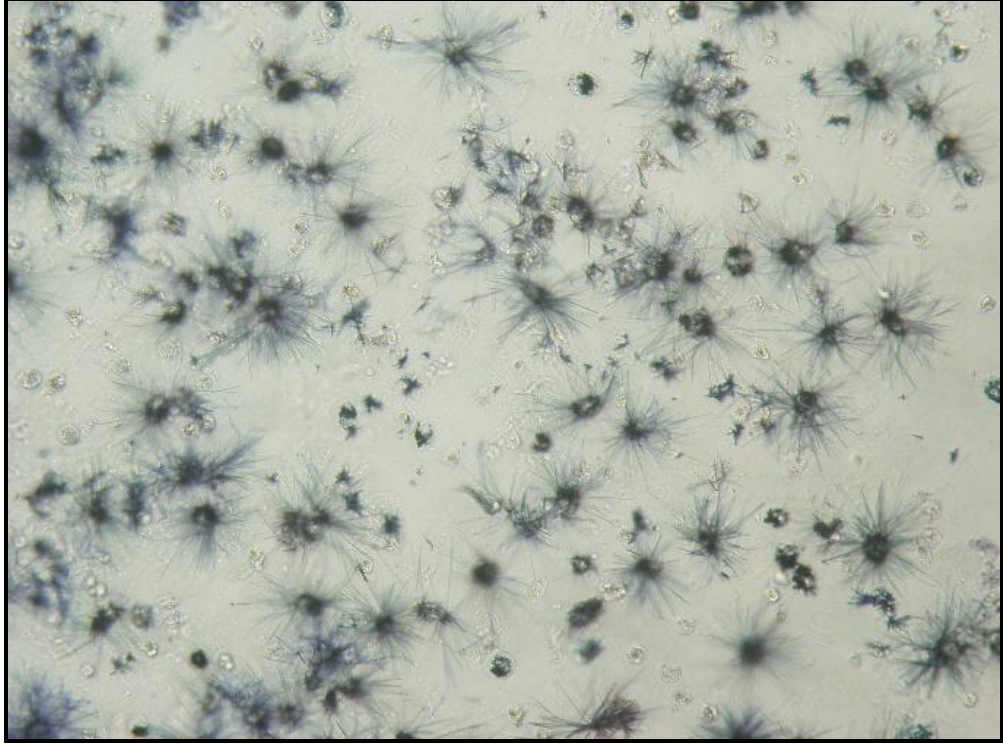
Şekil 4.67 1 mg/ml Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatının MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi



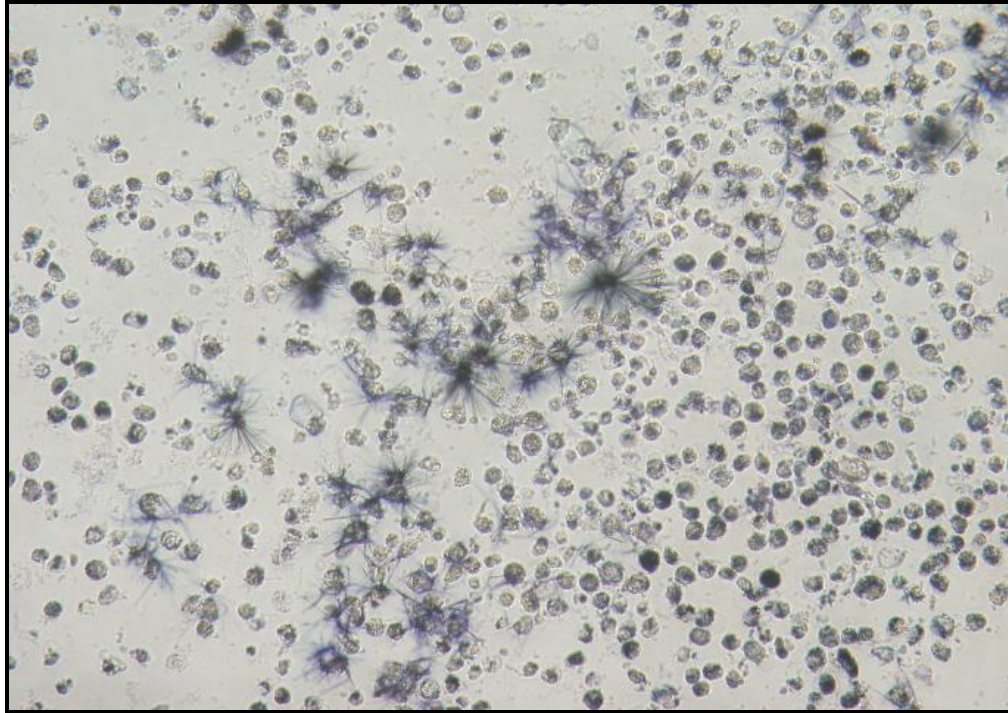
Şekil 4.685 **mg/ml** Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatının MCF 7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi



Şekil 4.69 Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu



Şekil 4.701 **mg/ml** Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatına maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu

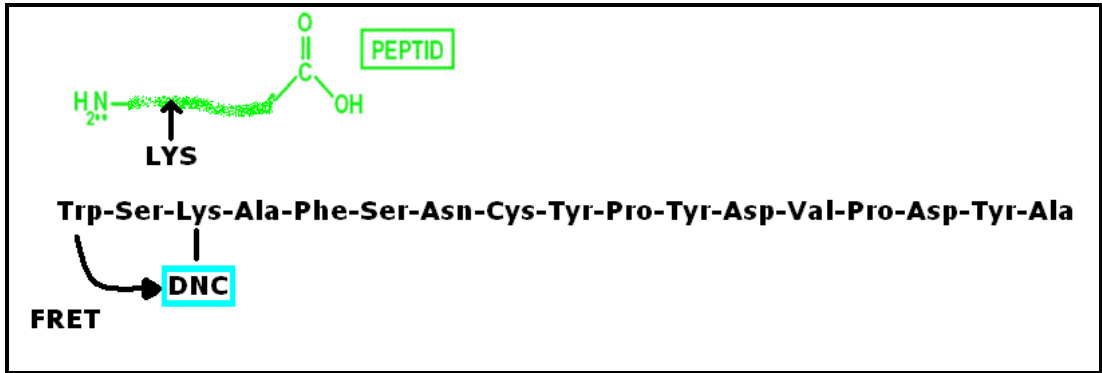


Şekil 4.715 **mg/ml** Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatına maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu

4.5 Floresans Enerji Transferi Deneyleri Ve Hesaplamaları

4.5.1 Floresans Enerji Transferi Deneyi

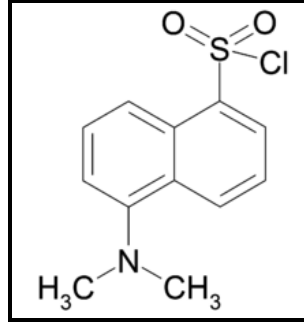
Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi biyokonjugasyon mekanizmasının sayısal değerler ile aydınlatılması için model olarak seçilmiştir. Floresans Rezonans Enerji Transferi deneylerinde bu peptid dizisinin poliakrilik asit ile biyokonjugatı kullanılmıştır. Bu peptid dizisinin en önemli özelliği N-terminal ucunda **Triptofan** amino asidinin ve üçüncü amino asit rezidüsü olarak **Lizin** amino asidinin bulunmasıdır.



Şekil 4.72 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptidinin amino asit rezidüleri

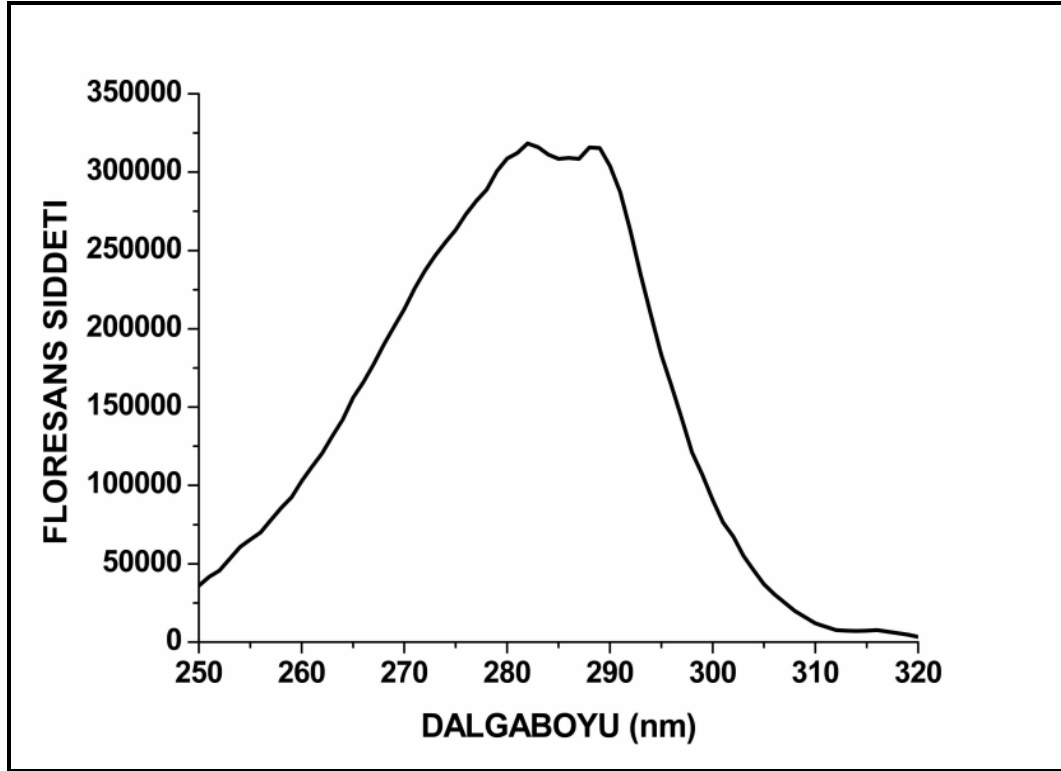
Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi için seçtiğimiz boya olan, kararlı blue yada blue-green fluorescent sulfonamid boya bileşimi üretmek için alifatik ve aromatik aminlerdeki birincil amino grupları ile reaksiyona giren, Dansyl Chloride (5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride)(DNC) kullanılmıştır.

Biyokonjugat oluşumu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile ispatlanan, Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin poliakrilik asit ile sentezlenen biyokonjugatı liyofilizatör ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra pH=9,2 borat tamponunda çözündürülmüştür. Deneyde kullanılacak boya olan DNC konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde asetonitrilde çözündürülmüştür.

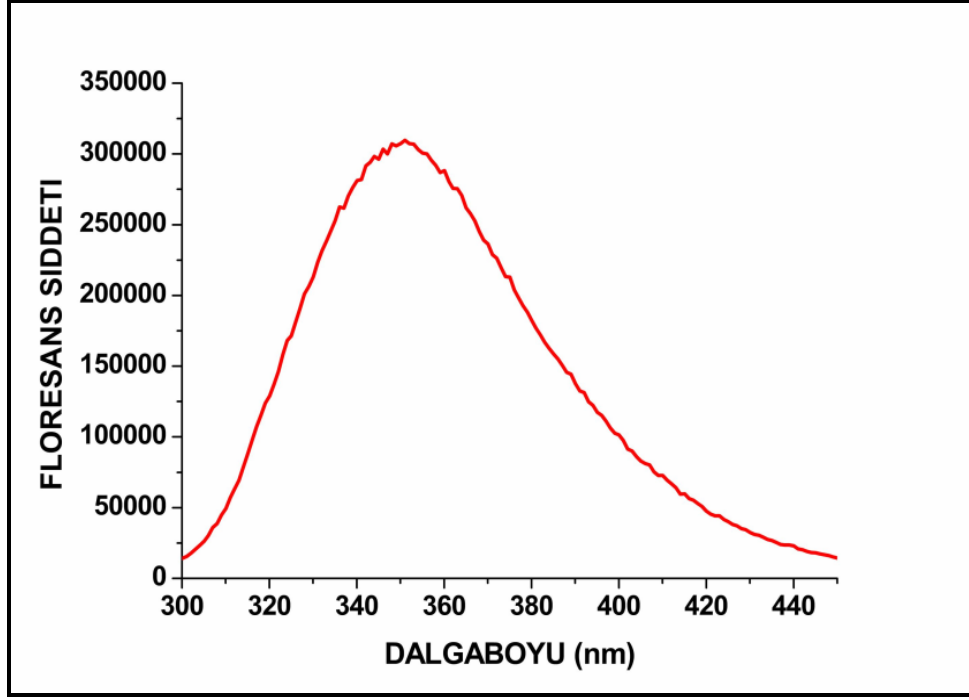


Şekil 4.73 Dansyl Chloride (5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride)

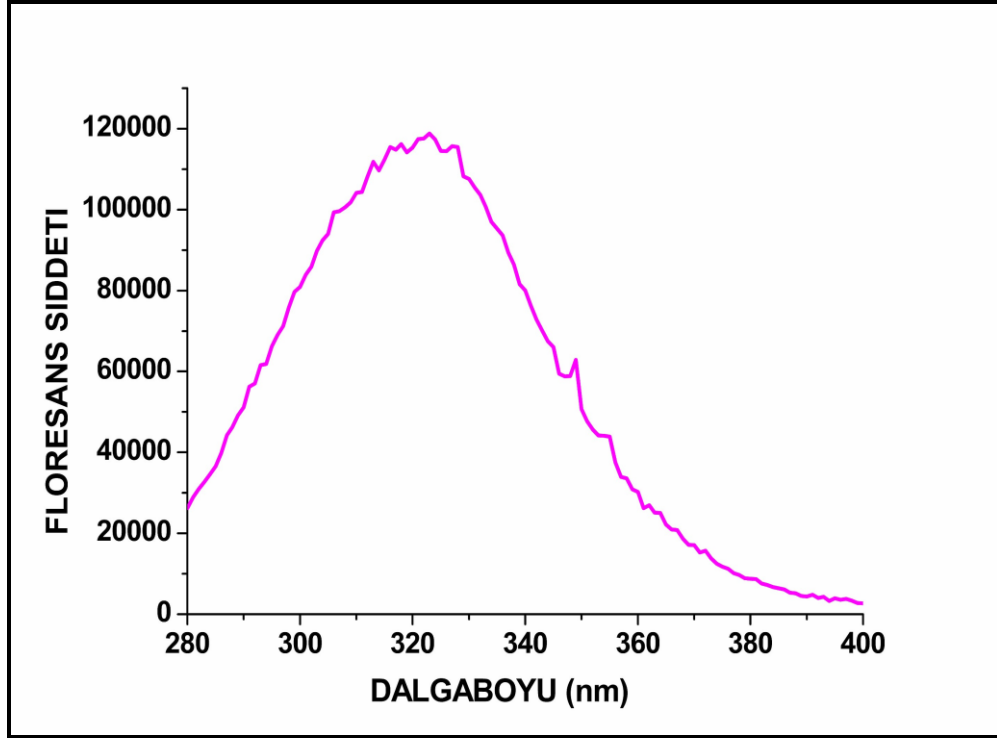
Floresans spektrometre ile yapılan ölçümler sayesinde, DNC boya molekülünün FRET deneyleri için kullanılacak optimum konsantrasyonunun 3µl olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çeşitli deneyler sonucunda boya molekülünün Lizin amino asidine bağlanması için gerekli inkübasyon süresinin de 5 dakika olduğu bulunmuştur. Optimizasyon ile ilgili deneyler sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda yapılan deneylerden aşağıdaki spektrumlar elde edilmiştir.



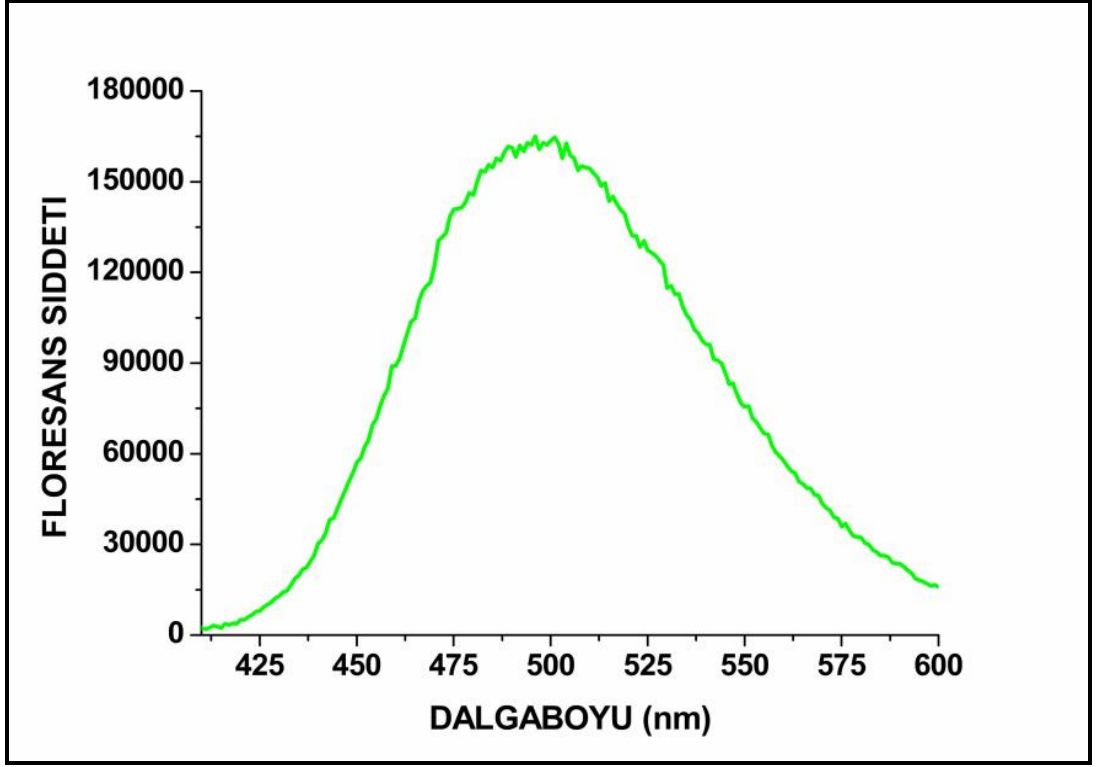
Şekil 4.74 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisine ait absorpsiyon spektrumu.



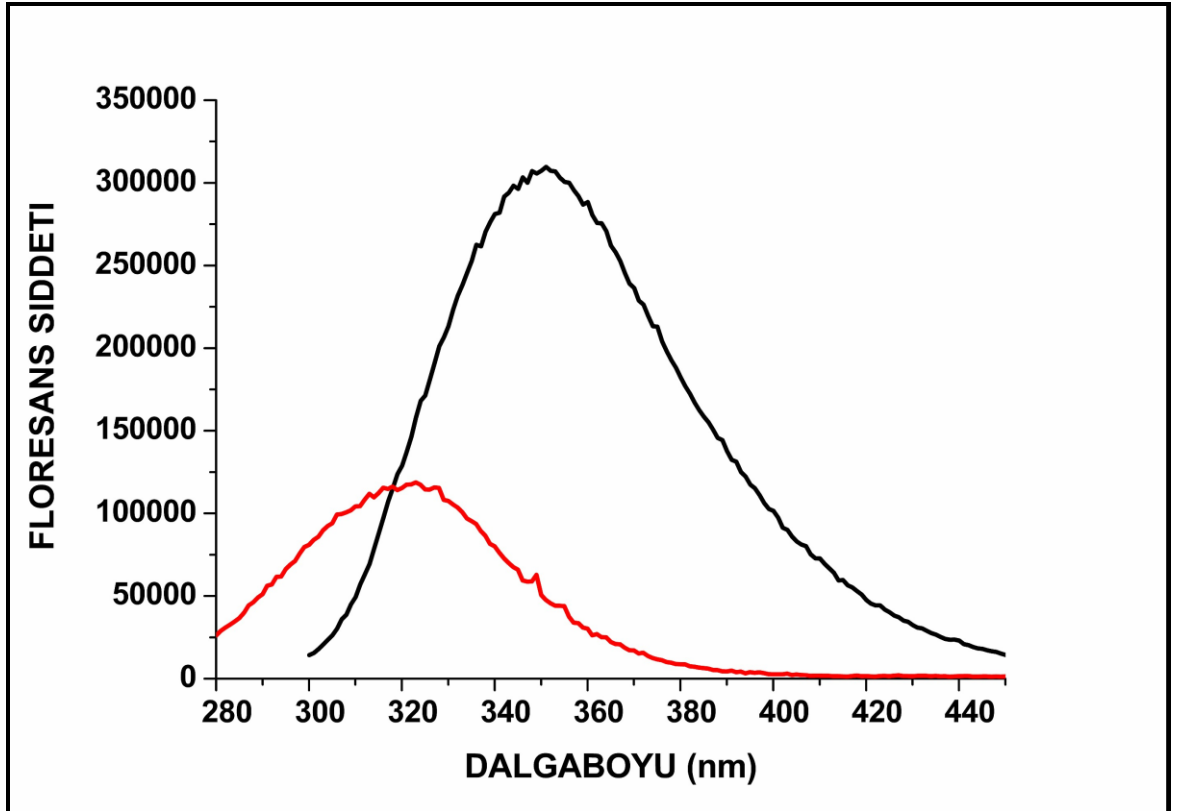
Şekil 4.75 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisine ait emisyon spektrumu.



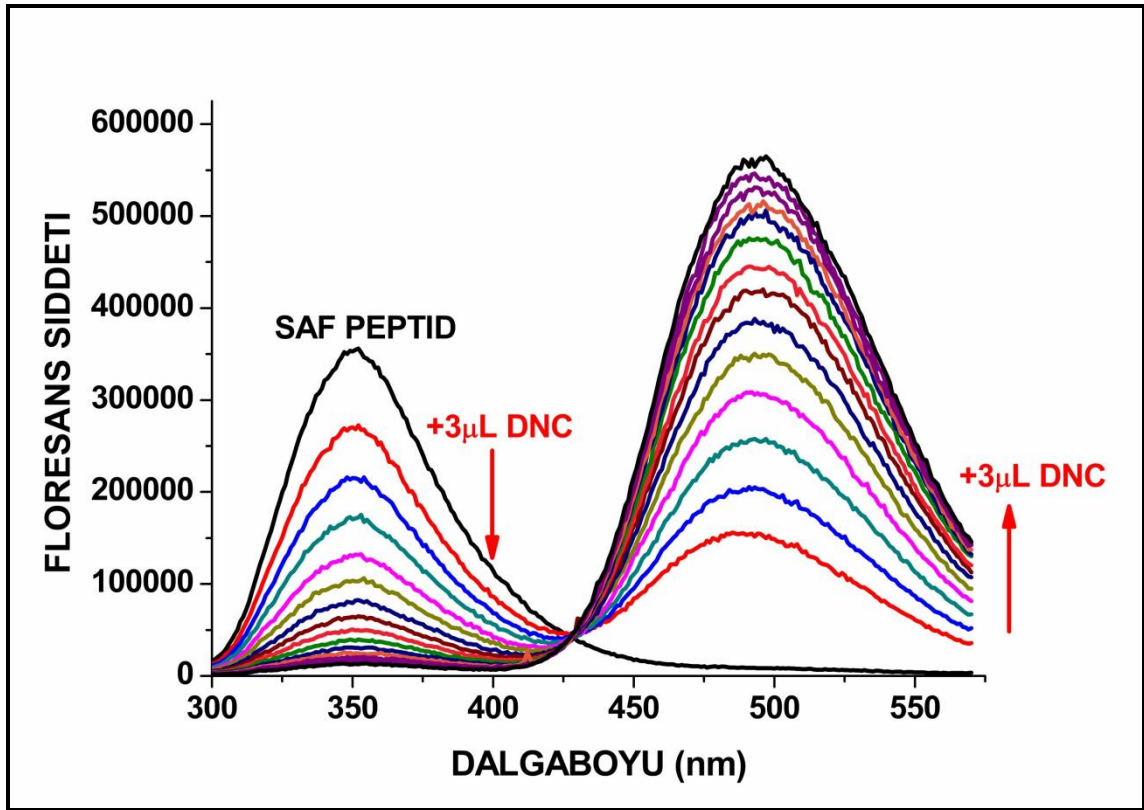
Şekil 4.76 DNC ye ait absorpsiyon spektrumu.



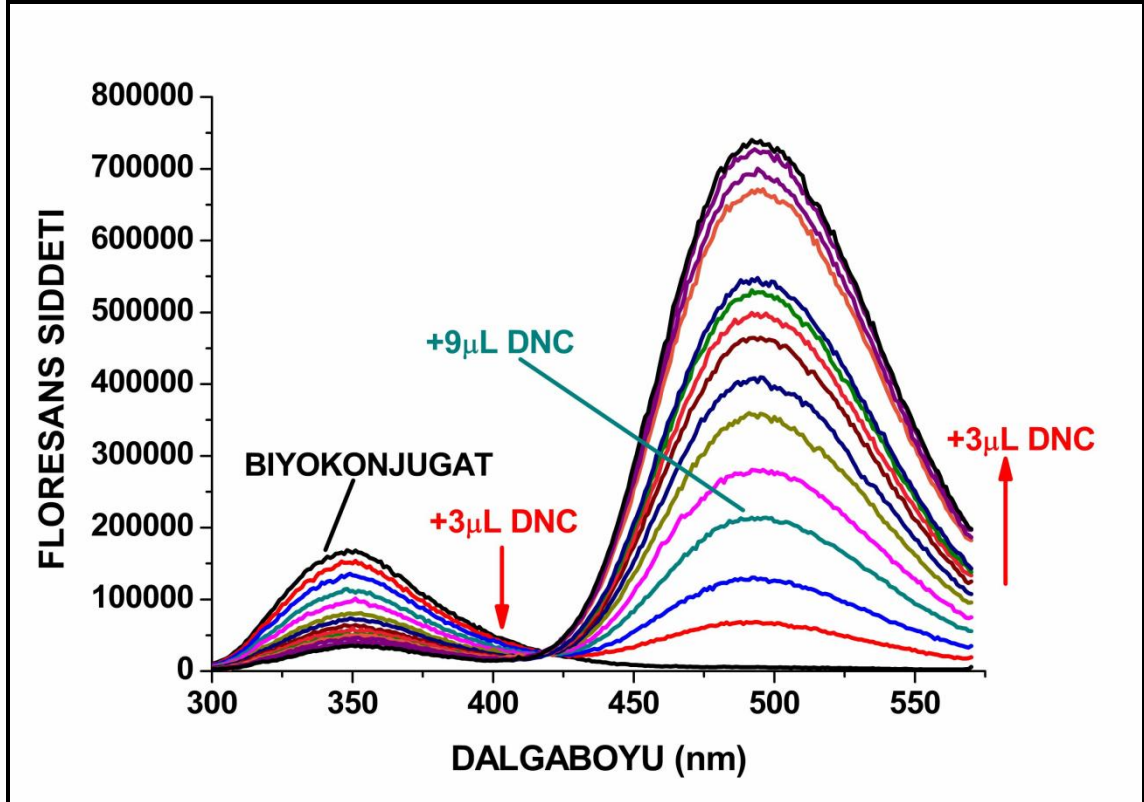
Şekil 4.77DNC ye ait emisyon spektrumu.



Şekil 4.78(◆)Donörün emisyon spektrumu ile (◆)akseptörün absorpsiyon spektrumlarının overlap grafiği.



Şekil 4.79 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC ile titrasyon spektrumu.



Şekil 4.80 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatınin DNC ile titrasyon spektrumu.

4.5.2 Saf Peptid ve Biyokonjugatların Kuantum Verimlerinin Hesaplanması

$$Q = Q_R \left(\frac{I_x}{I_R} \right) \left(\frac{A_R}{A_x} \right) \quad 4.1$$

bu denklemde I_x , peptidin veya konjugatın floresans pikinin integralini; I_R , triptofan amino asidine ait floresans pikinin integralini; A_x , peptidin veya biyokonjugatın absorbans pikinin integralini; A_R , triptofan amino asidine ait absorbans pikinin integralini ifade etmektedir. Q_R , referansımız yani bu deneyde triptofan amino asitinin kuantum verimidir. Literatürden de kontrol edildiği üzere 0,14 olarak alınmıştır [147].

4.5.2.1 Peptidin Kuantum Veriminin Hesaplanması

$$Q_{\text{peptid}} = Q_{\text{TRP}} \left(\frac{I_{\text{peptid}}}{I_{\text{TRP}}} \right) \left(\frac{A_{\text{TRP}}}{A_{\text{peptid}}} \right) \quad 4.2$$

$$Q_{\text{peptid}} = 0,14 \left(\frac{2,426 \cdot 10^7}{9,396 \cdot 10^7} \right) \left(\frac{1,459 \cdot 10^7}{9,998 \cdot 10^6} \right) \quad 4.3$$

$$Q_{\text{peptid}} = 0,052 \quad 4.4$$

17 tane amino asit rezidüsüne sahip, -N terminal ucunda Triptofan amino asidi olan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin kuantum verimi 0,052 olarak bulunmuştur.

4.5.2.2 Biyokonjugatın Kuantum Veriminin Hesaplanması

$$Q_{\text{biyokonjugat}} = Q_{\text{TRP}} \left(\frac{I_{\text{biyokonjugat}}}{I_{\text{TRP}}} \right) \left(\frac{A_{\text{TRP}}}{A_{\text{biyokonjugat}}} \right) \quad 4.5$$

$$Q_{\text{biyokonjugat}} = 0,14 \left(\frac{2,112 \cdot 10^7}{9,396 \cdot 10^7} \right) \left(\frac{1,459 \cdot 10^7}{4,59393 \cdot 10^7} \right) \quad 4.6$$

$$Q_{\text{biyokonjugat}} = 0,01 \quad 4.7$$

-N terminal ucunda Triptofan amino asiti olan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin poliakrilik asit ile EDC varlığında kovalent konjugasyonu sonucu elde ettiğimiz peptid-polimer biyokonjugatının kuantum verimi ise 0,052 olarak buuulunmuştur.

4.5.3 Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi ile İntermoleküler Mesafe Hesabı

FRET verimi D-A mesafesine son derece bağımlıdır ve Förster kritik yarıçapı R_0 ile karakterize edilir. Förster kritik yarıçapı, R_0 her D-A çifti için özgür bir parametredir. D-A mesafesi R_0 olduğunda, enerji transferi %50'dir. Eğer R_0 biliniyorsa; D-A çiftleri, etiketlenmiş D ve A arasındaki mesafeyi bulmak için moleküler bir cetvel olarak kullanılabilir.

FRET verimliliğini belirlemek için iki temel metod vardır. Birincisi akseptör varlığında donörün floresans şiddetindeki azalmayı ölçmek, ikincisi ise donörün floresans ömrünü ölçmektir.

Eğer FRET deneyinden kantitatif bilgiler isteniyorsa, R_0 değerinin bilinmesi gerekmektedir. R_0 değeri aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$R_0 = 0.2108(\kappa^2 \phi_D n^{-4} J_{DA}) \quad 4.8$$

R_0 : Förster kritik yarıçapı.

κ^2 : Oryantasyon faktörü.

ϕ_D : Akseptörün yokluğunda, donörün kuantum verimi.

n : Ortamın kırılma indeksi.

J_{DA} : Akseptörün absorbsiyon spektrumu ile donörün emisyon spektrumunun arasındaki üst üste çıkışan kısmının integraldir. J_{DA} 'nın overlap integrali, akseptörün

absorbsiyon spektrumu ile donörün floresans emisyon spektrumu biliniyorsa hesaplanabilir.

$$J_{DA} = C \int_0^{\infty} I_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 4.9$$

J_{DA} : Donörün emisyon spektrumu.

E_A : Akseptörün absorpsiyon spektrumu.

C : Denklem 4.10 ile tanımlanan normalizasyon faktörüdür.

$$C = \frac{\epsilon_{\max}}{E_A(\lambda_{\max}) \int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda} \quad 4.10$$

$\epsilon_{\max}$: Akseptörün maksimum absorpsiyonunun, molar soğurganlık katsayısı.

κ^2 değeri, donör ve akseptörün geçiş momentindeki bağıl oryantasyonuna bağlıdır. Eğer geçiş momenti sabit oryantasyonlarsa; κ^2 , 0'dan (dik geçiş momenti) 4'e (kolineer geçiş momenti) değişir. Paralel geçiş momentleri için $\kappa^2 = 1$ 'dir. A molekülleri rijit bir ortamda donör etrafında rastgele dağıldığı zaman, $\kappa^2 = 0.467$ 'dir. Eğer akseptör donör etrafında rotasyonel hareket yapıyorsa $\kappa^2 = 2/3$ olur.

Enerji transfer verimi E ; yalnız D'nin varlığında ya da A'nın varlığında D'nin ömür ölçümleri ve floresan yoğunluğu ile hesaplanabilir.

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad 4.11$$

I_D ve I_{DA} : Sırasıyla donörün akseptör yokluğundaki ve akseptör varlığındaki floresans şiddetidir.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad 4.12$$

τ_D ve τ_{DA} : Sırasıyla donörün, akseptör yokluğundaki floresans ömrü ve akseptör varlığındaki floresans ömrünün yokluğundaki floresan ömrü ve A'nın varlığındaki floresan ömrü.

Eğer R_0 ve E bilirse, donör ile akseptör arasındaki mesafe, r_{DA} hesaplanabilir.

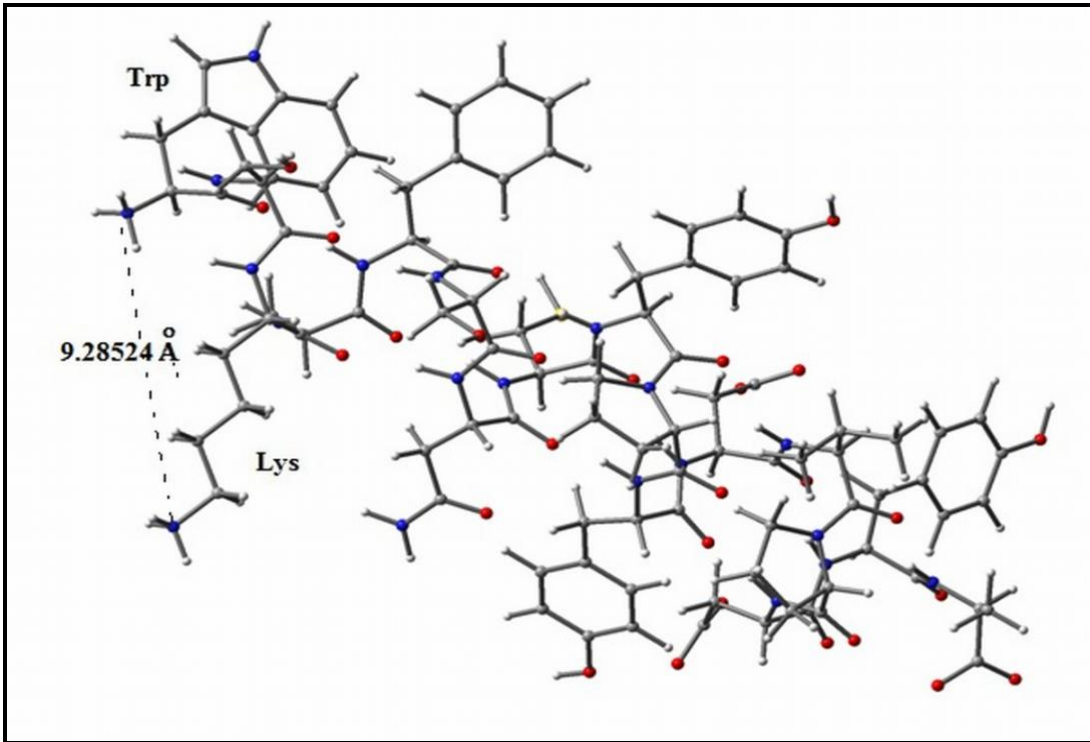
$$r_{DA} = \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} R_0 \quad 4.13$$

$$R_0 = 0,2108 \cdot \sqrt[6]{\left[\kappa^2 \phi_D n^{-4} \frac{\epsilon(\lambda_{\max})}{E_A(\lambda_{\max})} \frac{\int_0^\infty I_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda} \right]} \quad 4.14$$

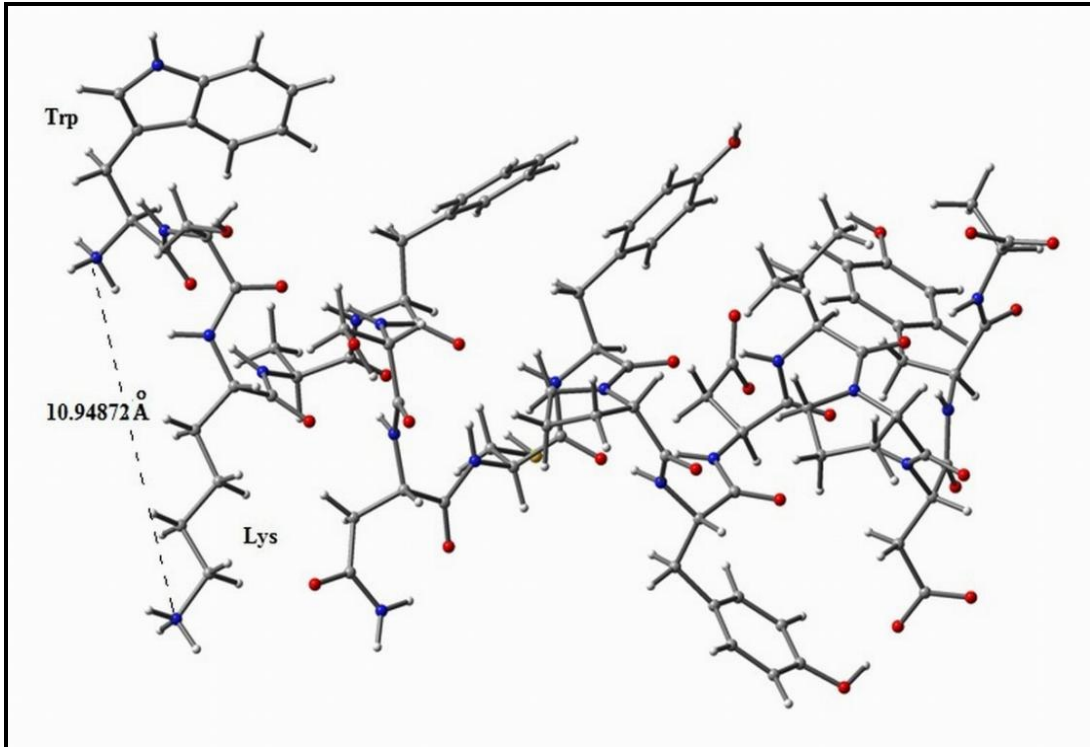
Bu çalışmada peptid ve peptid/polimer biyokonjugatına DNC eklendiğinde, akseptör molekülü olan DNC'nin rijit ortamda donör molekülü olan Triptofan etrafında rastgele dağılmıştır. Bu durumda oryantasyon faktörü K^2 'nin değerinin 0.476'dır.

Peptid ve peptid/polimer biyokonjugatı için hesaplanan kuantum verimleri kullanılarak Denklem 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14'den elde edilen sonuçlara göre; peptidimiz için R_0 değerinin 21,576Å olduğu ve donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafenin ise r_{DA} 'nın 12,704 Å olduğu bulunmuştur. Peptid poliakrilik asit biyokonjugatı için R_0 değerinin 16, 289Å olduğu ve donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafenin ise r_{DA} =9,591 Å olduğu bulunmuştur. Bu değerlerden, peptid ile konjugat arasındaki mesafe farkının, biyokonjugat oluşumunda peptidin konformasyonunun değişmesinden dolayı Triptofan ile Lizin amino asitleri arasındaki mesafenin yaklaşık olarak 3,113 Å daha kısaldığı ispatlanmıştır.

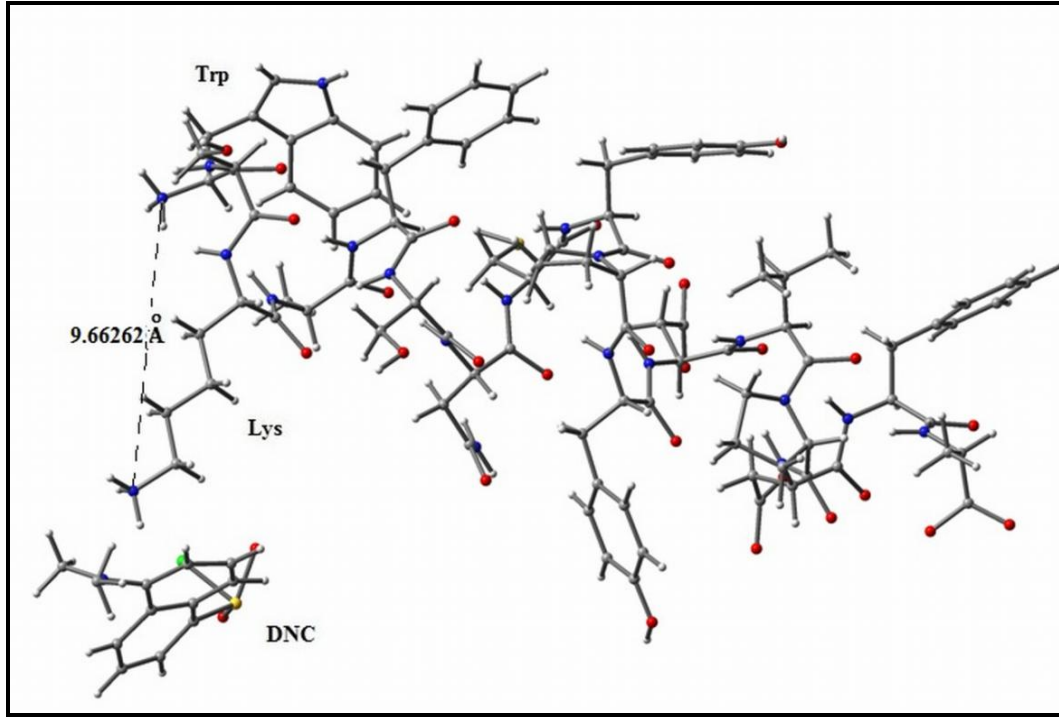
4.6 Modelleme Sonuçları



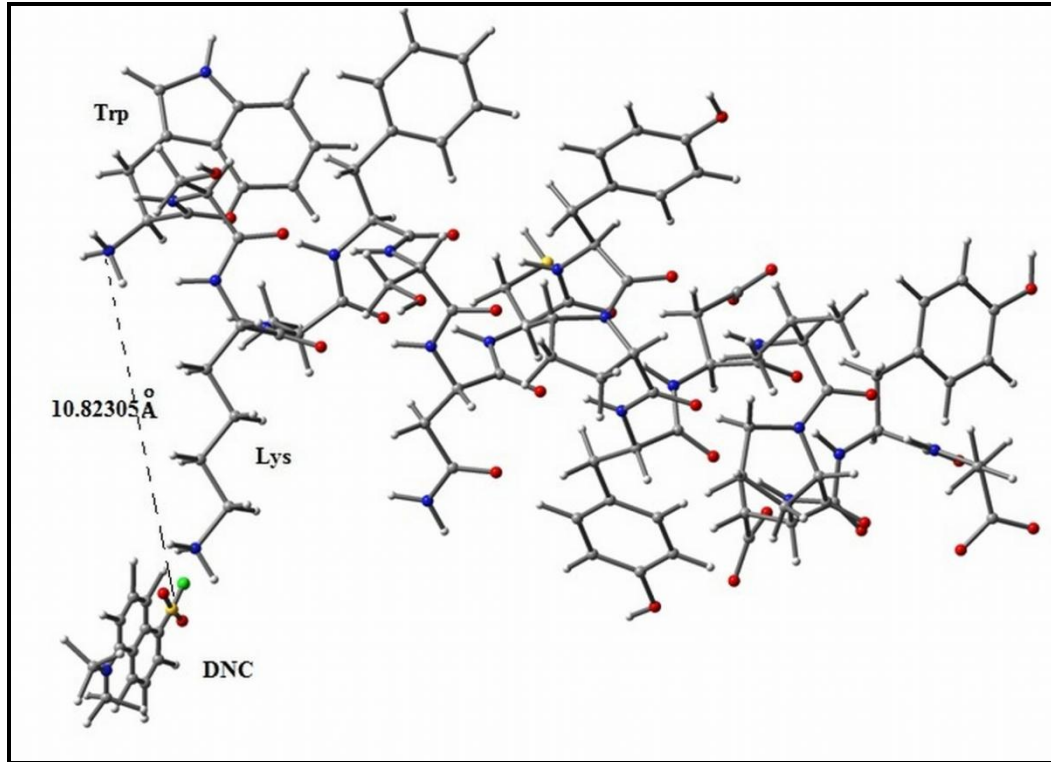
Şekil 4.81 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellenmesi.



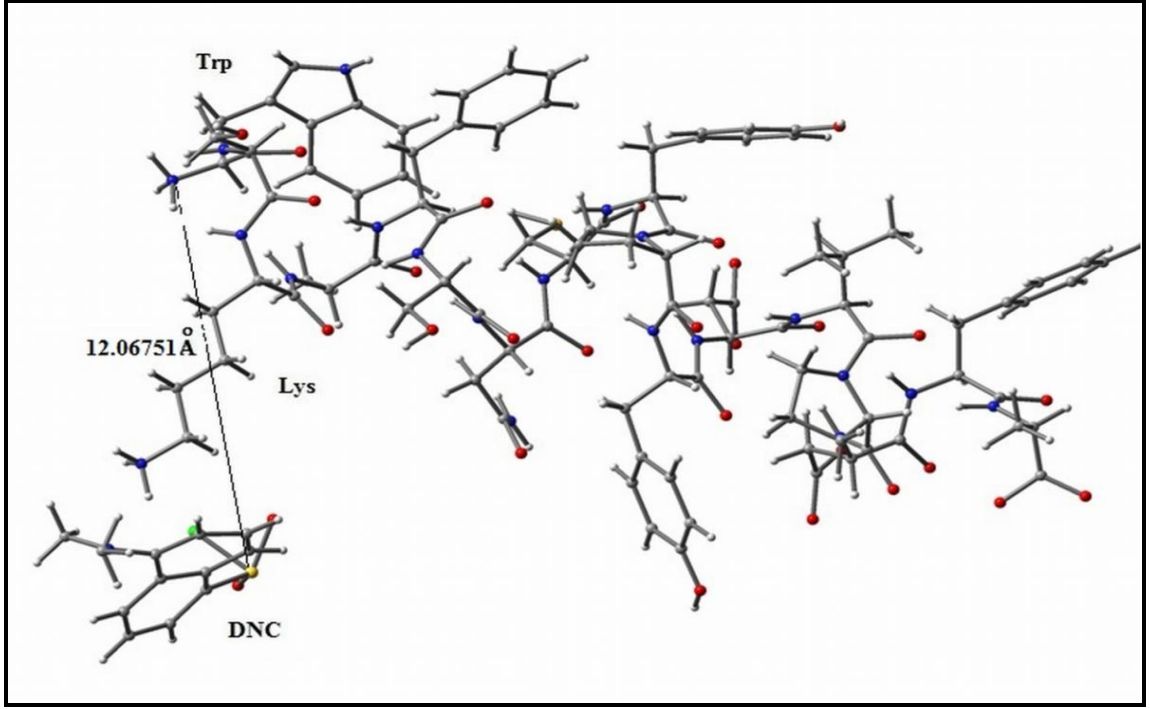
Şekil 4.82 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellenmesi.



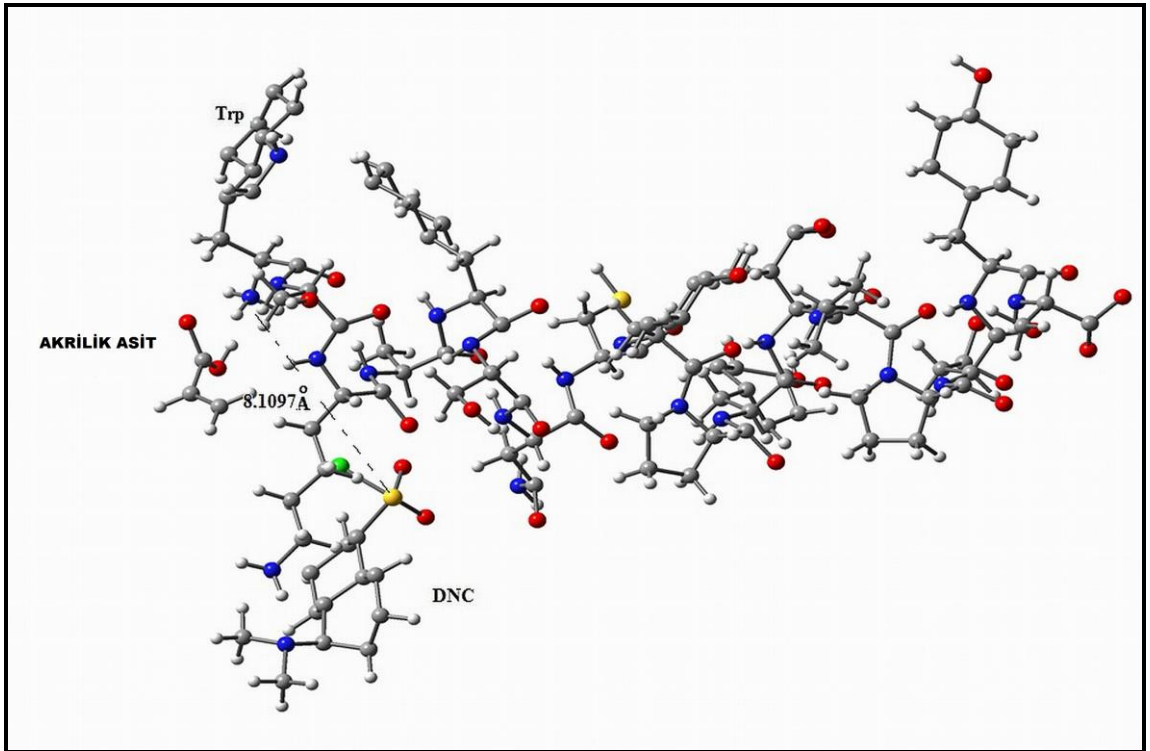
Şekil 4.83 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.



Şekil 4.84 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.



Şekil 4.85 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.



Şekil 4.86 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsü'ne ait antijenik özellikli dört farklı peptid dizisi; Influenza A Virüsü M2e Proteini peptid dizisi, Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisi, Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi ve dört farklı taşıyıcı (PAA, VP/AA, Dekstran Aldehit ve BSA) ile çalışılmıştır.

Bu dizilerden Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisi, Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisi, Hemagglutinin yüzey glikoproteinine ait olan peptid dizileridir. Son dizi olan M2e Proteini peptid dizisi ise virüsün yüzey proteinine ait iyon kanalı görevi gören M2 proteininin peptid dizisidir. Bu dört farklı amino asit dizili peptidlerin her birinin fizikokimyasal yapısı ve virüste üstlendiği görevler de farklıdır.

Bu tez çalışmasında birinci aşamada sırası ile Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 ve Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizilerinin sentezi ve sonrasında bu dizilerin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca ticari olarak satın alınan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 ve M2e Proteini peptidi dizilerinin karakterizasyonları yapılmıştır.

Taşıyıcı olarak kullanılacak olan Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) kopolimerinin ve Dekstran Aldehit'in sentezi literatürdeki bilgilere dayanarak yapılmıştır.

Bu peptid dizilerinin farklı taşıyıcılar ile (Poliakrilik asit (PAA), Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] kopolimerleri, Dekstran Aldehit ve Bovin Serum Albumin ile) biyokonjugatlarının ve komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu çalışılmıştır.

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının biyouyumluluğunun incelenmesi amacıyla da MTT analizi ve Flow Sitometri yöntemi ile sitotoksik özellikleri incelenmiştir.

Biyokonjugatların ve komplekslerin oluşturulması farklı yöntemlerle; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) varlığında kovalent bağlanma ile biyokonjugatların oluşturulması, dekstran aldehit ile biyokonjugatların oluşturulması ve üçüncü olarak elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Birinci yöntem olan EDC varlığındaki biyokonjugasyon reaksiyonunda, polimer zincirinin sahip olduğu karboksil (-COOH) grupları aktive edilir ve oluşan aktif O-açilisoüre ara ürünü peptidin yapısındaki amino (-NH₂) grupları ile bağlanmıştır. Saflaştırma ile ortamdan reaksiyon yan ürünlerinin uzaklaştırılması ile peptid polimer biyokonjugatları elde edilmiştir. Sentezlenen biyokonjugatlarının yapı işlev analizleri spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile (HPLC, Floresans Spektrofotometre, UV ve SEC cihazlarında) karakterize edilmiştir.

İkinci yöntem olan Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyon reaksiyonunda, peptidin amino (-NH₂) grubu ile Dekstran Aldehit'in karbonil grublarının kovalent bağlanması ile biyokonjugatlar elde edilmiştir.

Üçüncü yöntem olan kompleks oluşumu yönteminde ise, elektrostatik etkileşim ile peptid ve polimer kompleksleri oluşturulmuştur.

HPLC ve SEC analizi sonucu elde edilen UV kromatogramlarında; tek başına polimerler verildiğinde her bir polimerin (PAA, [P(VP-co-AA)]_{250kDa}, Dekstran Aldehit) baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği görülmüştür.

Biyokonjugatların analizinde ise saf peptidin pik vermediği bölge olan I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz yaklaşık olarak 10. dakika ile başlayan bölgede peptidin artan

molar oranı ile şiddetleri de artan pikler biyokonjugatların sentezlendiğini ve artan oranla birlikte biyokonjugat oluşumunun da arttığını göstermektedir .

Bu biyokonjugatlara ait SEC kromatogramları incelendiğinde ise; UV detektörden elde edilen kromatogramların HPLC kromatogramları ile bire bir örtüştüğü görülmektedir. Işık saçılması detektöründen elde edilen kromatogramlarda ise polimer ve peptidin birbirine bağlanması sonucu biyokonjugat oluşumuyla beraber molekülün yarıçapının arttığını yani molekül boyutunun da giderek büyüdüğü gözlenmektedir.

Biyokonjugatların Floresans Spektroskopisi ile analizlerinde ise serbest peptid molekülünün maksimum floresans şiddetini gösterdiği dalga boyu olan $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin biyokonjugatların $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinden daha büyük olduğu gözlemlendi. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptid dizisinde Triptofan amino asidi bulunan peptidlerde maksimum floresans şiddetinin 5 ila 22 nm'ye kadar blue shift yaptığı gözlenmiştir. Triptofanın spektral özelliğinden ve çözücü ile olan etkileşimlerinden dolayı, çözücü moleküllerinden izole olduğunda yani polimer zinciri tarafından peptid dizisi sarıldığında biyokonjugatlara ait floresans spektrumlarının blue shift yaptığı gözlenmiştir. Yapısında sadece Tirozin amino asidi olan peptid dizisinin biyokonjugatlarında ise, Tirozinin spektral özelliklerinden dolayı herhangi bir kayma gözlenmezken, serbest peptid molekülünün maksimum floresans şiddetinin aynı miktarda peptid içeren biyokonjugatın maksimum floresans şiddetinden daha büyük olduğu gözlemlendi.

Komplekslerin analizinde ise saf peptidin pik vermediği bölge olan I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz yaklaşık olarak 10. dakika ile başlayan bölgede yaklaşık olarak tüm oranlarda aynı şiddette, peptidin artan molar oranından bağımsız pikler gözlenmiştir. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, serbest bağlanmamış peptidi gözlemlediğimiz pik bölgesinde ise artan peptid oranıyla birlikte piklerin şiddetlerinin arttığını gördük. Bu durum bize peptid ile polimer zinciri arasında elektrostatik etkileşim ile meydana gelen kompleks oluşumunun peptid miktarından bağımsız olduğunu göstermektedir.

Komplekslerin Floresans Spektroskopisi ile analizlerinde ise serbest peptid molekülünün maksimum floresans şiddetini gösterdiği dalga boyu olan $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin komplekslerin $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinden daha büyük olduğu gözlemlendi.

Kompleks oluşumu ile beraber peptid dizisinde Triptofan amino asidi bulunan peptidlerde maksimum floresans şiddetinin çok küçük değerlerde blue shift yaptığı gözlenmiştir. Triptofanın amino asidi kompleks oluşumunda çözücü moleküllerinden yeterince izole olamadığından yani polimer zinciri ile peptid dizisi elektrostatik etkileşim ile bir arada olduğundan, komplekslere ait floresans spektrumları küçük değerlerde blue shift yaptığı gözlenmiştir. Yapısında sadece Tirozin amino asidi olan peptid dizisinin komplekslerinde ise, sadece serbest peptid molekülünün maksimum floresans şiddeti kompleksin maksimum floresans şiddetinden daha büyüktür.

Bu tez çalışmasının tartışma kısmında ilk olarak gruplar halinde her bir konjugasyon yönteminin analiz sonuçları, sonra Hücre Kültür deneylerine ait analiz sonuçları, Floresans Rezonans Enerji Transferi deneylerine ait sonuçlar ve mesafe hesabıyla ilgili sonuçlar ve en son olarak da modelleme sonuçları detaylı olarak tartışılacaktır.

5.1 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Tartışmalar

5.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteininin Biyokonjugatları

5.1.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Peptid dizisinin PAA asit ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon koşullarını belirleyebilmek için konjugasyon mekanizması üç farklı koşulda oluşturulmuş ve elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

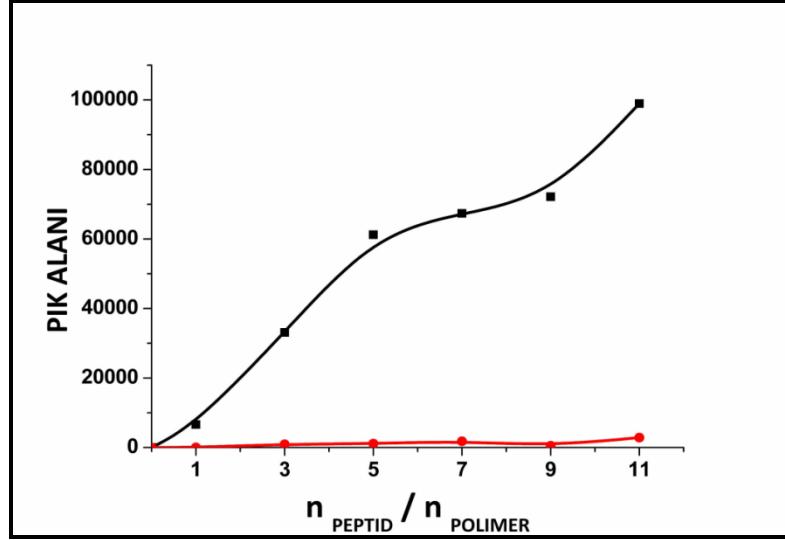
HPLC kromatogramlarından, biyokonjugasyon oluşumunu gözlemlediğimiz 10 ila 19. dakikalar arasında oluşan piklerden en yüksek şiddete sahip olan C reaksiyon koşullarına aittir (Şekil 4.21). Floresans spektrumlarına göre kıyaslandığında biyokonjugat oluşumunda en fazla dalga boyu kayması C reaksiyon koşullarında olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 10. ile 19. dakikalar arasında gözlenen ve biyokonjugasyon oluşumunu bize ifade eden pik alanı en büyük C reaksiyon koşullarına göre sentezlenen

biyokonjugatta görülmüştür (Şekil 4.24a). Aynı şekilde ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlara bakıldığında ise en büyük pik alanının C reaksiyon koşullarında sentezlenen biyokonjugata ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.24b). Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile EDC yöntemiyle biyokonjugasyonu için verimli reaksiyon koşulunun C koşulları olduğunu söyleyebiliriz.

Bu doğrultuda bu peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir biyokonjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan C koşullarına göre sentezlenmiştir.

HPLC kromatogramlardan biyokonjugat oluşumunu gözlemlediğimiz I. Pik bölgesinde, artan peptid konsantrasyonu ile polimerle kovalent olarak bağlanmış peptid miktarı da artmaktadır. II. Pik bölgesindeki bağlanmamış serbest peptidi ifade eden pikler ise görülmemektedir. Bu bize biyokonjugat oluşumunun gerçekleştiğini ve ortamda polimer zincirine bağlanmamış peptid molekülünün bulunmadığını ifade etmektedir (Şekil 4.25).

Şekil 5.1'den görüldüğü üzere, peptid polimer biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramlarının pik alanları kıyaslandığında, biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonu arttıkça biyokonjugatlara ait piklerin alanları orana bağlı olarak artmıştır ve serbest yani polimer zincirine bağlanmamış peptidlere ait alanları ise neredeyse görülmemektedir.



Şekil 5.1 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda (♦) **biyokonjugat** ve (♦) **bağlanmamış peptidlere** ait pik alanı grafiği.

SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, I. Pik bölgesinde (10 ve 17. dakikalar arasında) biyokonjugatdaki peptid konsantrasyonunun artması ile değişen mol oranlarında belirgin bir şekilde piklerin şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonu arttığında, polimer ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı artmaktadır (Şekil 4.26a). Serbest yani polimer zinciri ile etkileşime girmemiş, bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.26a).

SEC cihazının ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, sentezlenen farklı mol oranlarındaki biyokonjugatların peptid ve polimere ait ışık saçılması pikleri ile kıyaslaması yapıldığında oluşan biyokonjugatların moleköl boyutlarının peptid ve polimer ile kıyaslandığında çok daha büyük olduğu görülmektedir (Şekil 4.26b).

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 353 nm'de gözlenmekte iken etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 347 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 6 nm'lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki dramatik azalış net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.27'deki 5. pik n=7 oranındaki biyokonjugatı ve 8. pik ise n=7 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen

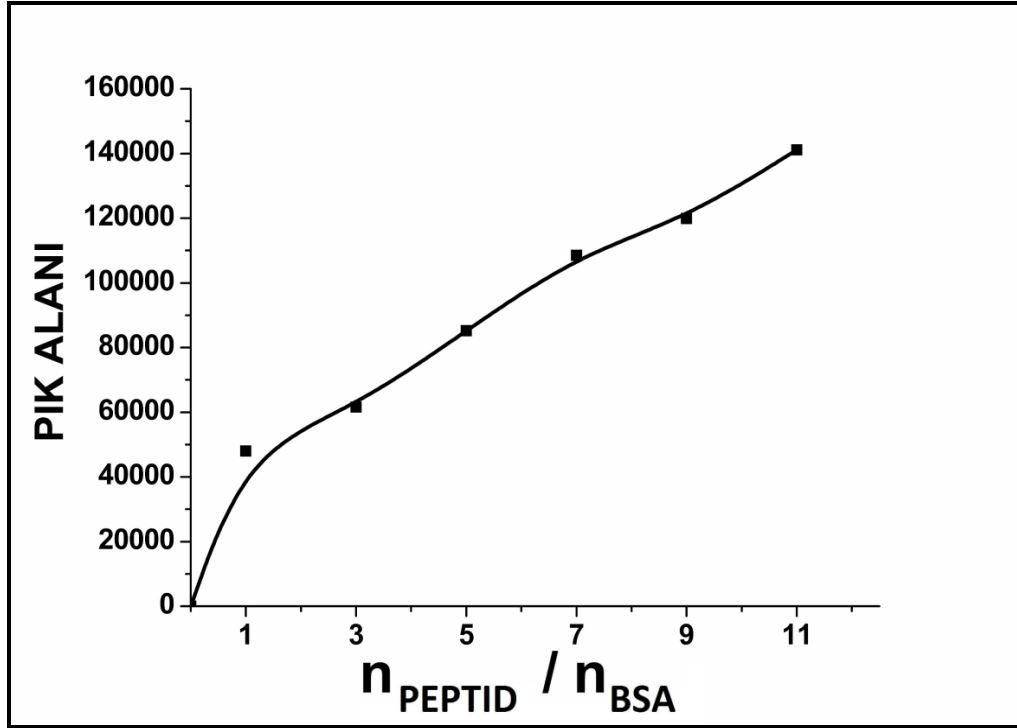
kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugata ait spektrumda, peptidin polimer zinciri tarafından sıkı bir şekilde sarılmış olmasından dolayı spektral dalga boyunda 6 nm'lik kayma ve floresans şiddetinde çok ciddi bir azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir (şekil 4.27).

5.1.1.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Bovine Serum Albumin ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile olan konjugasyonu da PAA ile konjugasyonunda olduğu gibi C reaksiyon koşullarına göre yapılmıştır. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu şeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz ve 16. ve 20. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında peptid/BSA biyokonjugatları görölmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı piklerin şiddetlerinden anlaşılmaktadır. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, 22. ile 28. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında görölen, BSA proteinine bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden pikler görölmemektedir. HPLC kromatogramlarından elde edilen veriler doğrultusunda peptid ile BSA'nın kuvvetli bir şekilde bağlandığını ifade edebiliriz (şekil 4.28).

Peptid konsantrasyonunun artması ile ortamda oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı pik alanı grafiğinde açık olarak görölmektedir (şekil 5.2).



Şekil 5.2 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin BSA ile (■)biyokonjugatlarının HPLC cihazından elde edilen kromatogramlarının pik alanları.

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidi dizisi üç tane Triptofan rezidüsü içermektedir. BSA proteini de iki tane Triptofan rezidüsüne sahiptir. Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidi/BSA biyokonjugatı spektrofotometrik olarak incelendiğinde, her iki bileşenin de yapısındaki floresans özellikli amino asitlerden dolayı farklı spektral özellikler gösterdiği bilinmektedir. Serbest peptide ait floresans spektrumunun maksimum dalgaboyu 353 nm’de ve BSA’ya ait floresans spektrumunun maksimum dalgaboyu 335 nm’de gözlenmekte iken konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri mol oranına bağlı olarak yaklaşık olarak 331 nm ile 338 nm arasında izlenmektedir. Saf peptide göre peptid/BSA biyokonjugatlarının farklı mol oranlarında 22 ila 15 nm’lik dalga boyu kayması gözlenmektedir. Peptid konsantrasyonunun en az olduğu, en küçük mol oranı olan 1 oranında bu rakam 22 nm iken, peptid konsantrasyonunun en fazla olduğu mol oranı olan 11 oranında ise bu 15 nm’lik dalga boyu kaymasına denk gelmektedir. Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’daki mor renk ile gösterilen spektrum $n=5$ oranındaki serbest peptidi, kırmızı ile gösterilen spektrum ise $n=5$ oranındaki biyokonjugatı ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere aynı miktarda serbest peptid içermesine rağmen, EDC yöntemi ile C reaksiyon koşullarına göre

yapılan, kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugatta serbest peptide kıyasla, 17 nm'lik spektral kayma ve floresans şiddetinde azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir. Biyokonjugat oluşumu floresans spektroskopisi ile de spektral olarak ispatlanmaktadır (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).

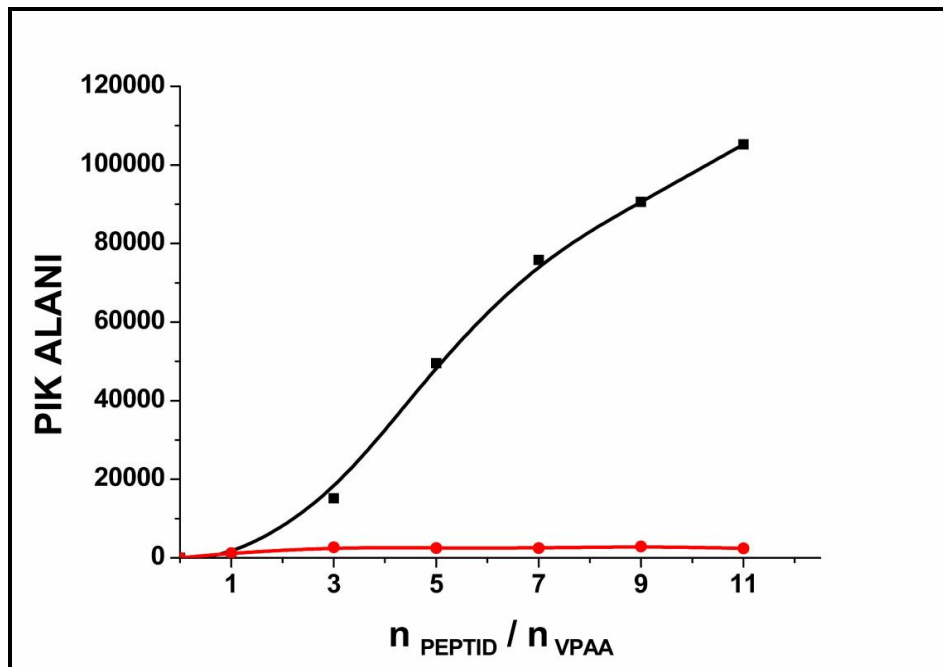
Biyokonjugatların SEC cihazı ile analizinde, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan görüldüğü üzere, I. Pik bölgesinde (15 ve 18. dakikalar arasında) konjugatdaki peptid konsantrasyonunun artması ile, belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonu arttığında, BSA ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı artmaktadır. Serbest yani BSA ile bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise hiçbir mol oranında pik gözlenmemektedir. Sonuç olarak, HPLC kromatogramlarından ve Floresans spektrumlarından ispat edildiği üzere SEC cihazından elde edilen kromatogramlardan da her bir mol oranı için kovalent konjugasyonda reaksiyona giren tüm peptid molekülleri BSA molekülleri ile tamamen bağlanmıştır (Şekil 4.31a). Işık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlardan ise, peptid/BSA biyokonjugatlarının peptid ve BSA moleküllerine ait olan kromatogramlar ile kıyaslaması yapıldığında; oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarındaki artış mol oranına bağlı olduğu gözlenmektedir. Her bir artan mol oranında artan peptid konsantrasyonu nedeniyle, BSA ile bağlanan peptid molekülleri sayesinde oluşan biyokonjugatın yarıçapı büyümektedir (Şekil 4.31b).

5.1.1.3 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) ($M_w=250000$ Da) ile Biyokonjugasyonu

Molekül ağırlığı 250.000 Da olarak sentezlenen VP/AA kopolimeri antijenik peptidimiz ile biyokonjugasyonda daha önce PAA ile yapılan ve en verimli reaksiyon koşulu olarak belirlediğimiz C reaksiyon koşulları kullanılmıştır. Elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelendi.

Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP/AA kopolimeri ile olan biyokonjugatlarının UV spektrometre ile incelenmesinde, absorbans değerlerinin mol oranı arttıkça arttığı gözlenmiştir. Biyokonjugatlara eklenen peptid miktarı (mg/ml) artıkça VP/AA (250.000 Da) kopolimerine bağlanan peptid miktarının da arttığı anlaşılmaktadır (Şekil 4.32).

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP/AA kopolimeri ile sentezlediğimiz biyokonjugatlarının HPLC kromatogramları incelendiğinde, I. Pik bölgesinde oluşan biyokonjugatlar ve II. Pik bölgesinde ise polimer zincirine bağlanmamış yani reaksiyona girmemiş serbest peptid görülmektedir (Şekil 4.33). Elde edilen kromatogramların pik alanlarından da anlaşılacağı üzere, biyokonjugatların mol oranı arttıkça konjugat oluşumu da aynı oranda artmakta ve I. Pik bölgesindeki piklerin alanları büyümektedir. Buna karşılık polimer zincirine bağlanmamış serbest peptid miktarını ifade eden II. Pik bölgesindeki piklerin alanlarının ise değişmediği ve biyokonjugatların pik alanları ile kıyaslandığında çok deneyecek küçük olduğu görülmektedir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP/AA (Mw=250.000 Da) kopolimeri ile (◆)biyokonjugatlarının ve her bir biyokonjugat oranındaki polimer ile bağlanmamış (◆) serbest peptidlerin pik alanlarının kıyaslamalı grafiği.

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP/AA kopolimeri ile biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 353 nm’de gözlenmekte iken konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 348 nm civarında izlenmektedir. 5 nm’lik dalga boyu kayması net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.34’deki 4. pik n=5 oranındaki biyokonjugatı ve 6. pik ise n=5 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden

görüldüğü üzere aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugat, VP/AA kopolimeri tarafından sıkı bir şekilde sarılmıştır ve çözücü ortamında uzaklaştığı için spektral olarak dalga boyunda 5 nm'lik kayma ve floresans şiddetinde azalma gibi değişiklikler göstermiştir. Biyokonjugattaki floresans şiddetindeki azalmanın ($\approx \Delta I_{\max}=75.000$ sayım/sn. ve $\approx I_{\max}=125.000$ sayım/sn.) ise kompleksle ($\approx \Delta I_{\max}=50.000$ sayım/sn. ve $\approx I_{\max}=150.000$) kıyaslandığında çok daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.34).

Sentezlenen biyokonjugatlara ait SEC cihazı ile incelenmesinde ise, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda, I. Pik bölgesinde (9.5 ve 14. dakikalar arasında) biyokonjugatdaki peptid konsantrasyonunun artmasıyla belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonu arttığında, VP/AA kopolimeri ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı artmaktadır. Serbest yani VP/AA kopolimeri ile etkileşime girmemiş, polimer zincirine bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise hiçbir mol oranında pik gözlenmemektedir (Şekil Şekil 4.35a). Işık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlardan ise, oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarındaki artışın mol oranına bağlı olarak arttığı gözlenmektedir (Şekil Şekil 4.35b).

Sonuç olarak, UV spektrumlarından, HPLC kromatogramlarından ve Floresans spektrumlarından ispat edildiği üzere SEC cihazından elde edilen kromatogramlardan da her bir mol oranı için karbodiimid varlığında kovalent konjugasyonda peptid moleküllerinin VP/AA **kopolimeri** ile kuvvetli bir şekilde bağlandığı ispatlanmıştır.

5.1.2 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu

5.1.2.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Dizisinin PAA İle Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106_Peptid dizisinin PAA asit ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon koşullarını belirleyebilmek için konjugasyon mekanizması dört farklı koşulda oluşturulmuş ve elde edilen

biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenerek en verimli reaksiyon koşulları araştırılmıştır.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106_Peptid dizisinin PAA asit ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramları incelendiğinde I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz biyokonjugat oluşumunu gözlemlediğimiz 10 ila 18. dakikalar arasında oluşan piklerden en yüksek şiddete sahip olan C reaksiyon koşullarına aittir (Şekil 4.36). kromatogramlardaki piklerin alanları incelendiğinde ise en büyük pik alanının C reaksiyon koşullarına ait olduğu görülmektedir.

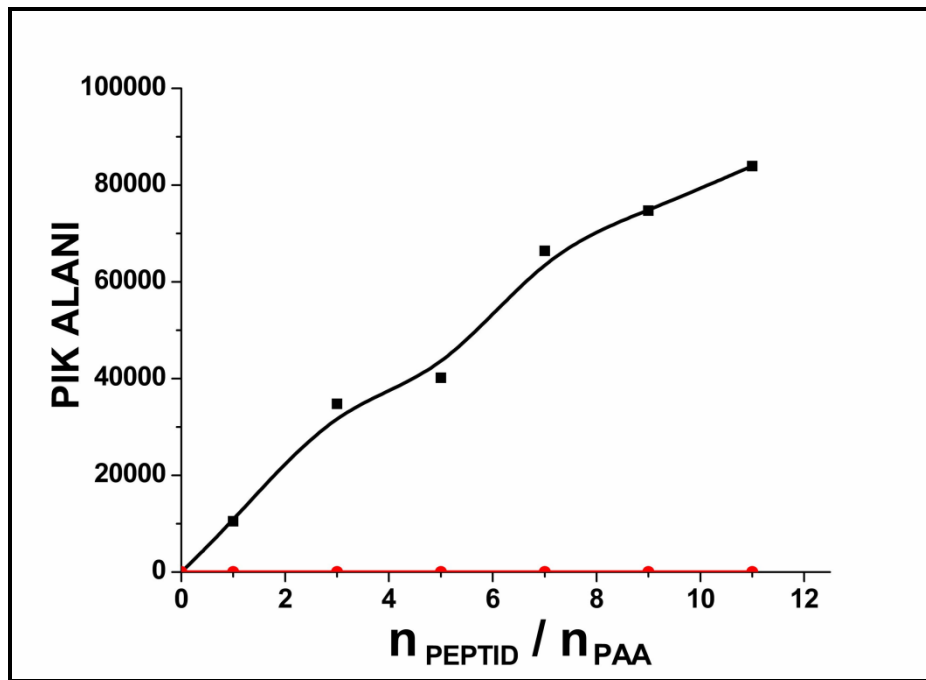
Floresans spektrumlarına göre kıyaslandığında biyokonjugat oluşumunda en fazla dalga boyu kaymasının ve en düşük floresans şiddetinin C koşullarında olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.37).

SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 9,5 ile 16. dakikalar arasında gözlenen ve biyokonjugasyon oluşumunu bize ifade eden pik şiddetinin en büyük C reaksiyon koşullarına göre sentezlenen biyokonjugata ait görülmüştür (Şekil 4.38a). Aynı şekilde ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlara bakıldığında ise en büyük pik alanının C reaksiyon koşullarında sentezlenen biyokonjugata ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.38b). Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile EDC yöntemiyle biyokonjugasyonu için verimli reaksiyon koşulunun C koşulları olduğunu tespit edilmiştir.

Bu doğrultuda bu peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir biyokonjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan C koşullarına göre sentezlenmiştir. Çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile analizleri yapılmıştır.

Farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatların UV spektrumlarından elde edilen absorbans değerleri konsantrasyonları ile kıyaslandığında, peptid konsantrasyonu arttıkça, biyokonjugatlara ait absorbans değerlerinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.39).

Biyokonjugatların HPLC analizlerinden elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, I. Pik bölgesinde artan peptid konsantrasyonu ile polimer ile kovalent olarak bağlanmış peptid miktarı da artmaktadır. II. Pik bölgesindeki bağlanmamış serbest peptidi ifade eden pikler ise görülmemektedir. Bu bize kovalent konjugasyon sonucunda hiç bağlanmamış peptid bulunmadığını ifade etmektedir (Şekil 4.40). Kromatogramların pik alanları incelendiğinde ise, artan peptid konsantrasyonu ile polimer zinciri ile etkileşim sonucunda biyokonjugatların pik alanlarındaki artış çok net gözlenmektedir. Serbest yani polimer zincirine bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden piklerin alanlarının değeri ise sıfır olarak kalmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği:

(■) biyokonjugatlara ait pik alanı değişimi, (◆) serbest peptid moleküllerine ait pik alanı değişimi.

Biyokonjugatların SEC cihazı ile analizinden UV dedektöründen elde edilen kromatogramlar incelendiğinde ise, I. Pik bölgesini ifade eden 9,5 ve 16. dakikalar arasındaki piklerin şiddetleri, biyokonjugatdaki peptid konsantrasyonunun artması ile belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonu arttığında, polielektrolit ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı artmaktadır. Serbest yani polimer zinciri ile reaksiyona girmemiş peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde, 20 ile 23. dakikalar arasında ise serbest peptide ait herhangi bir pik gözlenmemektedir (Şekil

4.41a). Işık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarının polielektrolit molekülleriyle kıyaslandığında çok daha büyük olduğu ve biyokonjugattaki peptid konsantrasyonu arttıkça molekül boyutunun orantılı bir şekilde büyüdüğü görülmektedir (Şekil 4.41b).

Biyokonjugatlara ait floresans spektrumları incelendiğinde ise serbest peptide ait floresans spektrumu 350 nm’de gözlenmekte iken etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 341 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 9 nm’lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki azalma net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.42’deki 4. pik n=7 oranındaki biyokonjugatı ve 7. pik ise n=7 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugata ait spektrumda, peptidin polimer zinciri tarafından sıkı bir şekilde sarılmış olmasından dolayı spektral dalga boyunda 9 nm’lik kayma ve floresans şiddetinde azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.42).

Kullandığımız spektroskopik ve kromatografik yöntemlerin her biri ile biyokonjugat oluşumu ispat edilmiştir.

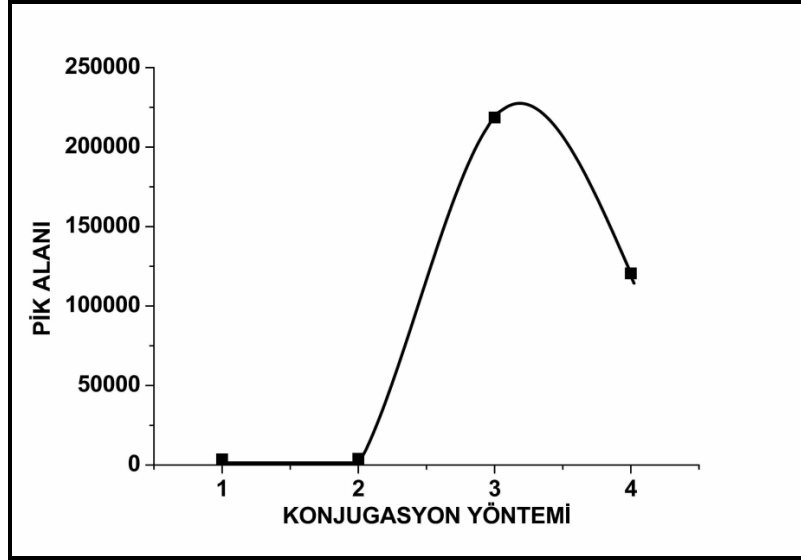
5.1.3 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu

5.1.3.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA asit ile EDC yöntemi ile biyokonjugasyonu için en verimli konjugasyon koşullarını belirleyebilmek için konjugasyon mekanizması dört farklı koşulda oluşturulmuş ve elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenerek, en verimli reaksiyon koşulları belirlenmiştir.

Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA asit ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarından, biyokonjugasyon oluşumunu gözlemlediğimiz 10 ila 14. dakikalar arasında oluşan piklerden en yüksek şiddete sahip olan C reaksiyon

koşullarına aittir (Şekil 4.43b). Farklı aktivasyon yöntemlerine ait HPLC kromatogramlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda çizilen pik alanı grafiğinden de anlaşıldığı üzere, I. Pik bölgesindeki en büyük pik alanının C reaksiyon koşullarında elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle peptid/PAA biyokonjugatları için en verimli reaksiyon koşullarının C reaksiyon koşulları olduğu anlaşılmıştır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5 Farklı yöntemlere göre sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan konjugatlarına ait HPLC kromatogramlarındaki 10-14. dakikalar arasındaki pik alanları.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile olan konjugatlarının floresans spektrumları serbest peptid ile kıyaslandığında en düşük floresans şiddetine sahip olan konjugatın C reaksiyon koşullarına göre sentezlenen biyokonjugat olduğu görülmektedir. Peptidin polimer ile kovalent konjugasyonu sonucunda, peptid dizisinde bulunan floresans özelliğe sahip amino asit rezidüleri polimer zinciri tarafından en fazla C reaksiyon koşullarında sarılmıştır ve çözücü molekülleri ile etkileşimleri azalmıştır (Şekil 4.44).

SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 9 ile 12. dakikalar arasında gözlenen ve biyokonjugasyon oluşumunu bize ifade eden pik şiddetinin en büyük C reaksiyon koşullarına göre sentezlenen biyokonjugata ait görülmüştür (Şekil 4.45a). Aynı şekilde ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlara bakıldığında ise en büyük pik alanının C reaksiyon koşullarında sentezlenen biyokonjugata ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.45b).

Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile EDC yöntemiyle biyokonjugasyonu için verimli reaksiyon koşulunun C koşulları olduğunu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda bu peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9$ oranlarında, her bir biyokonjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan C koşullarına göre sentezlenmiştir. Çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile analizleri yapılmıştır.

Farklı mol oranlarında hazırlanan Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları incelendiğinde, biyokonjugat oluşumunu gözlemlediğimiz I. Pik bölgesinde artan peptid konsantrasyonu ile peptid/polimer biyokonjugatlarına ait pik şiddetlerinin de arttığı, polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden II. Pik bölgesinde ise hiç pik gözlenmediği görülmektedir (Şekil 4.46).

Biyokonjugat oluşumunu Floresans spektroskopisi ile incelediğimizde, diğer peptid dizilerinin analizinde karşılaşmadığımız farklı bir durum söz konusu olmuştur. Bu peptid dizisinde floresans özellik gösteren sadece Tirozin amino asidi mevcuttur ve bu amino asidin spektral özelliklerinden dolayı biyokonjugat oluşumunda spektral kayma gözlenmemiştir. Biyokonjugat oluşumu her mol oranındaki biyokonjugatın sadece maksimum floresans şiddetlerindeki değişimler ile gözlenmiştir. Şekil 4.47'deki 5 nolu spektrum $n=7$ oranındaki biyokonjugatı, 7 nolu spektrum ise $n=7$ oranındaki saf peptidi ifade etmektedir. Aynı konsantrasyonda peptid içermelerine rağmen iki spektrum arasındaki floresans şiddeti farkı bize biyokonjugat oluşumunu çok net ifade etmektedir (Şekil 4.47).

Biyokonjugatlara ait SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda, biyokonjugat oluşumunu ifade eden 10,5 ve 13. dakikalar arasındaki I. Pik bölgesinde, biyokonjugatların mol oranı arttıkça içerisinde bulunan peptid konsantrasyonu da artmakta ve polimer zinciri ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı arttığı için piklerin şiddetleri de artmaktadır. Polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden II. Pik bölgesinde ise neredeyse herhangi bir pik gözlenmemektedir (Şekil

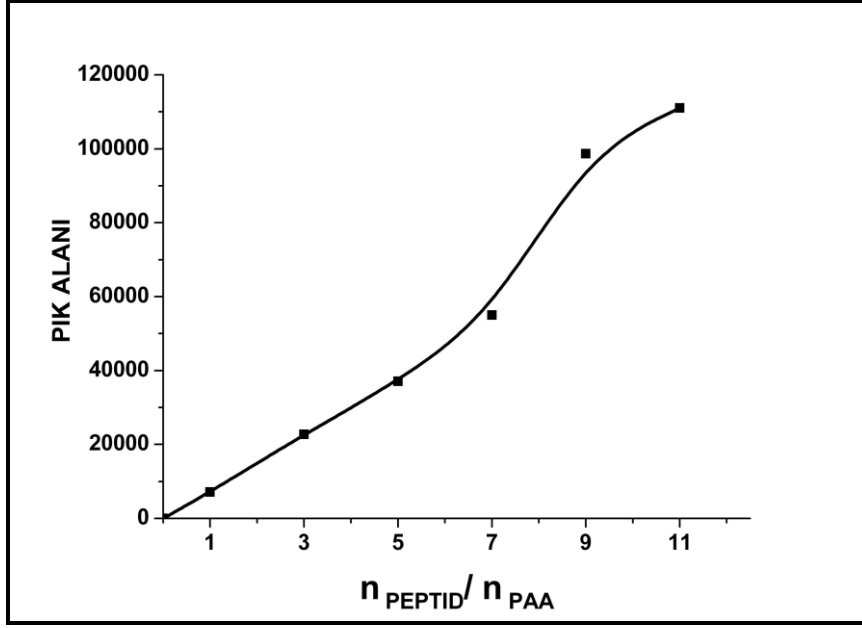
4.48a). Işık saçılması dedektöründen ise mol oranı arttıkça oluşan biyokonjugatların yarıçaplarının büyüdüğü anlaşılmaktadır (Şekil 4.48b).

5.1.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin Biyokonjugasyonu

5.1.4.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid dizisinin PAA asit ile biyokonjugasyonu, 91-106 Peptid dizisi için en verimli konjugasyon koşullu olarak belirlenen C reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Peptid polimer biyokonjugatları, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir biyokonjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan C koşullarına göre sentezlenmiştir. Çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile analizleri yapılmıştır.

Farklı mol oranlarında hazırlanan Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları incelendiğinde, biyokonjugat oluşumunu gözlemlediğimiz I. Pik bölgesinde artan peptid konsantrasyonu ile peptid/polimer biyokonjugatlarına ait pik şiddetlerinin de arttığı, polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden II. Pik bölgesinde ise hiç pik gözlenmediği görülmektedir (Şekil 4.49). Kromatogramların pik alanları incelendiğinde ise, artan peptid konsantrasyonu ile polimer zinciri ile etkileşim sonucunda biyokonjugatların pik alanlarındaki artış çok net gözlenmektedir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 peptid dizisinin PAA ile olan biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■)biyokonjugatlara ait pik alanı değişimi.

Biyokonjugat oluşumunu Floresans spektroskopisi ile incelediğimizde, biyokonjugatlara ait floresans spektrumları incelendiğinde ise serbest peptide ait floresans spektrumu 348 nm’de gözlenmekte iken etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 335 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 13 nm’lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki azalma net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.50’deki turuncu renkteki pik n=7 oranındaki biyokonjugatı ve yeşil renkteki pik ise n=7 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugata ait spektrumda, peptidin polimer zinciri tarafından sıkı bir şekilde sarılmış olmasından dolayı spektral dalga boyunda 13 nm’lik kayma ve floresans şiddetinde gözle görülür bir azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.50).

Biyokonjugatlara ait SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda, biyokonjugat oluşumunu ifade eden 10,5 ve 17. dakikalar arasındaki I. Pik bölgesinde, biyokonjugatların mol oranı arttıkça içerisinde bulunan peptid konsantrasyonu da artmakta ve polimer zinciri ile bağlanan peptid moleküllerinin miktarı arttığı için piklerin şiddetleri de artmaktadır. Polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden II. Pik bölgesinde ise neredeyse herhangi bir pik gözlenmemektedir (Şekil

4.51a). Işık saçılması dedektöründen ise mol oranı arttıkça oluşan biyokonjugatların yarıçaplarının büyüdüğü anlaşılmaktadır (Şekil 4.52b).

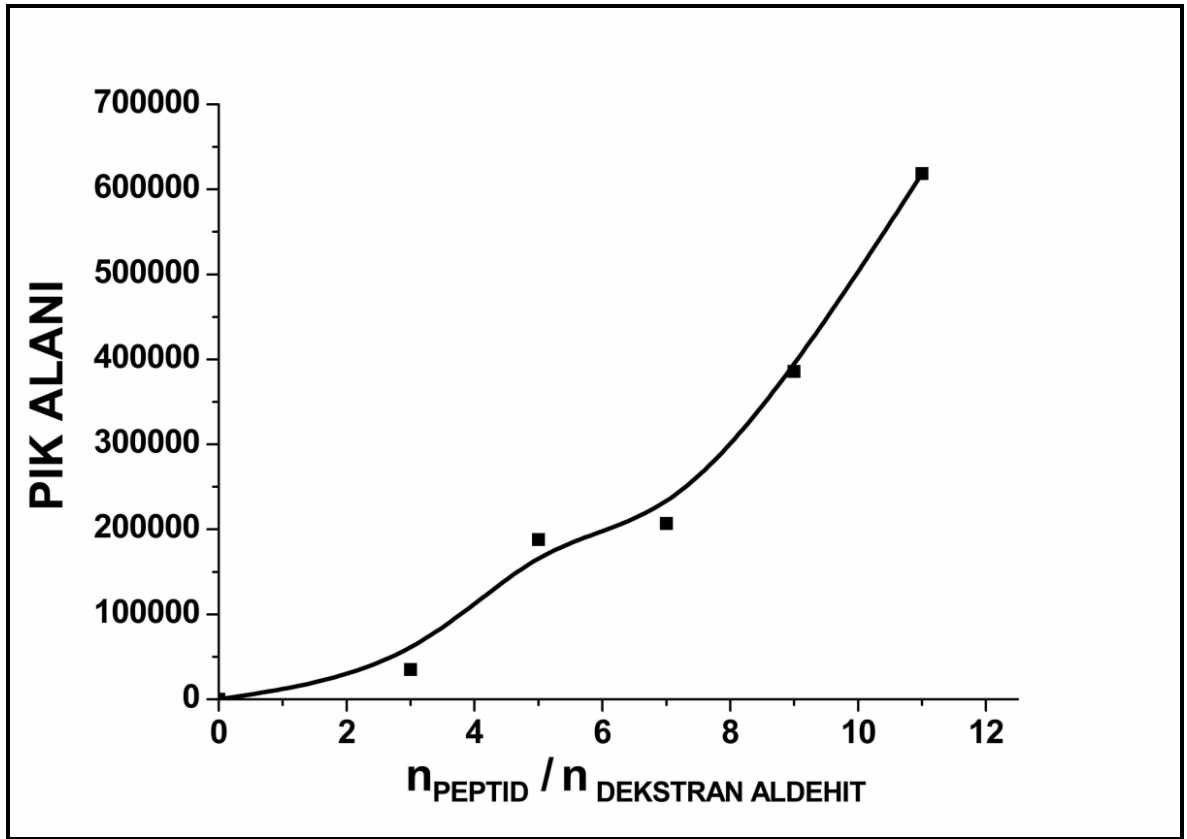
5.2 Dekstran Aldehit İle Konjugasyon Yöntemi

5.2.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Dekstran Aldehit ile Konjugasyonu

Şekil 4.52’de gösterilen yöntem uygulanarak, Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin dekstran aldehit ile olan konjugatları $n = 3, 5, 7, 9, 11$ mol oranlarında sentezlenmiştir.

Biyokonjugatların UV spektrometre ile analizinden elde edilen absorbands değerlerinin konsantrasyonla olan değişimi incelendiğinde biyokonjugat içerisindeki peptid miktarının artması ile absorbands değerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.53).

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugasyonunun HPLC cihazında analizinde elde edilen kromatogramlardan, konjugasyon reaksiyonu sonucunda peptid ile Dekstran Aldehitin kuvvetli bir şekilde konjuge olduğu anlaşılmaktadır. Farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatların hiçbirinde, 24 ile 27. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında yer alan bağlanmamış serbest peptid molekülünü ifade eden 2. Pik bölgesinde herhangi bir pik gözlenmemektedir. Oluşan biyokonjugatlar 18 ile 21. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında yer alan 1. Pik bölgesinde görülmektedir (Şekil 4.54).



Şekil 5.7 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin Dekstran Aldehit ile biyokonjugatlarının HPLC cihazından elde edilen kromatogramlarının pik alanları.

HPLC cihazından elde edilen peptid/Dekstran Aldehit biyokonjugatlarına ait kromatogramlardan, her bir mol oranında peptid konsantrasyonunun artması ile ortamda oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı pik alanı grafiğinde açık olarak görülmektedir (Şekil 5.7).

Biyokonjugatlarına ait floresans spektrumları incelendiğinde ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 353 nm’de gözlenmekte iken konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 348 nm civarında gözlemlendiği farkedilmektedir. Yaklaşık olarak 5 nm’lik dalga boyu kayması net bir şekilde görülmektedir. Şekildeki 4. pik $n=7$ oranındaki biyokonjugatı ve 6. pik ise $n=7$ oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere aynı miktarda peptid içermesine rağmen biyokonjugat ile serbest peptide ait pikler arasında maksimum floresans şiddetlerinde yaklaşık olarak 100000 sayım/sn ve maksimum dalga boylarında ise 5 nm lik kayma olduğu izlenmektedir. Dekstran Aldehit tarafından peptid moleküllerinin sıkı bir şekilde sarılmış olması, peptid dizisi içindeki floresans

özellikli amino asit rezidülerinin sulu ortamdan uzaklaşmasına neden olmaktadır ve bu da bize spektral kayma ve floresans şiddetlerinde azalma olarak sonuç vermektedir (Şekil 4.55).

5.3 Kompleks Oluşumu Yöntemi

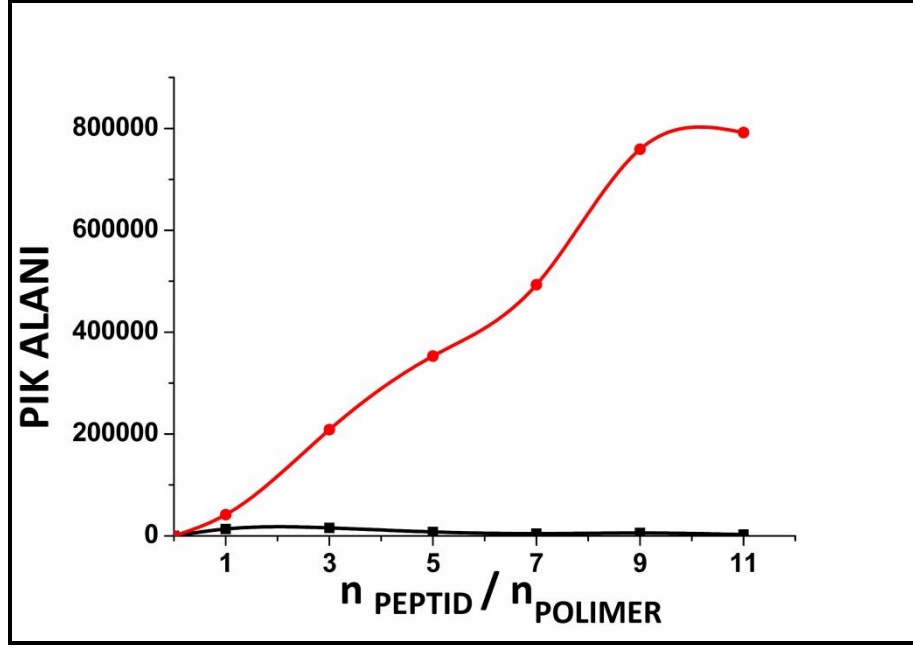
5.3.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidi Kompleksleri

5.3.1.1 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin Poliakrilik Asit ile Komplekslerine Ait Tartışma

2,5 mg poliakrilik asit (PAA $M_w=100000$ Da) PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}=1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.

Hazırlanan komplekslere ait HPLC kromatogramlarından da anlaşıldığı üzere, komplekslerdeki peptid konsantrasyonu arttıkça, yani $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranı arttıkça, 9,5 ile 16. Dakikalar arasındaki I. Pik bölgesinde fiziksel etkileşimi ifade eden piklerin yaklaşık olarak aynı kaldığı, ancak 23 ile 28. dakikalar arasındaki II. Pik bölgesindeki serbest yani bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden piklerin orana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Kromatogramdan çıkarılan sonuç, oluşan peptid molekülleri ile polimer zinciri arasında oluşan etkileşimin artan peptid konsantrasyonundan bağımsız olduğunu ifade ettiğidir. Yani peptid miktarı arttıkça değişmemektedir (Şekil 4.56).

Peptid polimer komplekslerine ait HPLC kromatogramlarının pik alanları kıyaslandığında, komplekslerdeki peptid konsantrasyonu arttıkça bağlanmamış peptidlere ait piklerin alanlarının orana bağlı olarak arttığı ve komplekslere ait piklerin alanları ise oldukça küçük olduğu ve $n=5$ oranından sonra daha da azalmıştır (Şekil 5.8).



şekil 5.8 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile kompleks oluşumunda (■) komplekslere ve (●) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.

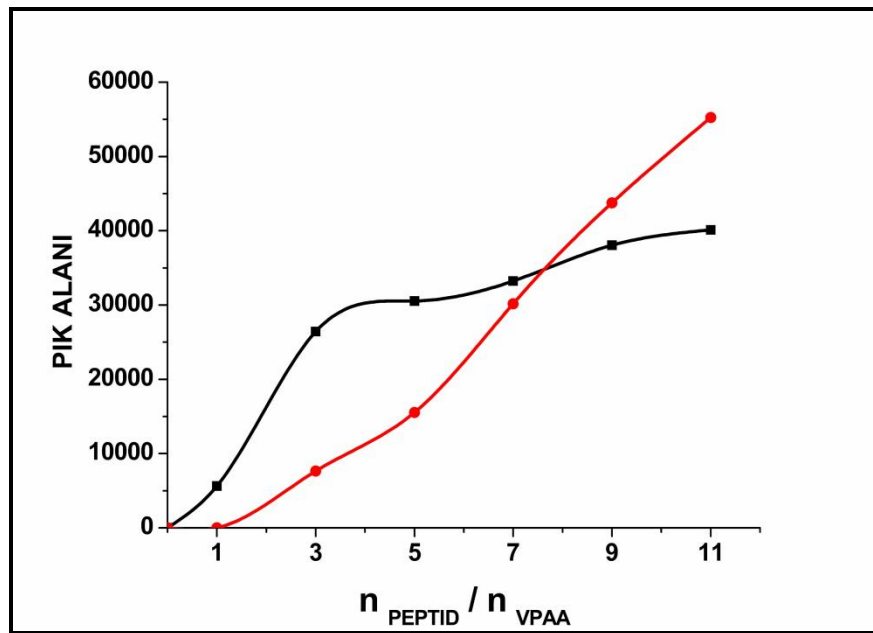
Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile komplekslerine ait floresans spektrumları incelendiğinde, serbest peptide ait floresans spektrumu 353 nm’de gözlenmekte iken, etkileşim sonucunda komplekslere ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 350 nm civarında gözlenmektedir. 5. pik n=7 oranındaki kompleksi ve 6. pik ise n=7 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. şekilden de anlaşıldığı üzere, oluşan kompleksde bulunan bağlanmamış peptid molekülleri nedeniyle, aynı mol oranında olan, serbest peptid ile komplekse ait pikler yaklaşık 3 nm’lik dalgaboyu kayması ile neredeyse aynı floresans şiddetinde görölmektedir. n=11 oranındaki kompleksi ifade eden pik, bu mol oranında daha yüksek konsantrasyonda peptid bulunduğundan dolayı, n=7 mol oranındaki serbest peptid pikinden daha yüksek floresans şiddeti göstermektedir (şekil 4.57).

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin izoelektrik noktası 6,4’dür. Kompleks oluşum reaksiyonun gerçekteştiği pH=5’de pozitif yüklü halde bulunmaktadır. Polimer zincirimiz olan PAA anyonik özellikli bir polimer olduğundan, polimer zinciri üzerindeki negatif yükler ile peptid molekülleri elektrostatik kuvvetler ile etkileşime girerler. HPLC kromatogramlarından ve Floresans spektrumlarından da anlaşıldığı üzere, şiddetli

iyonik etkileşim ve bunun yanı sıra gerçekleşen hidrofobik etkilerin ve hidrojen bağlarının katkısı ile Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile kompleks oluşturduğu ispatlanmıştır.

5.3.1.2 Influenza A Virüsü M2e Proteini Peptidinin [P(VP-co-AA)] ($M_w=250.000$ Da) Kopolimeri ile Komplekslerine Ait Tartışma

Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin P(VP-co-AA) ($M_w=250.000$ Da) kopolimeri sentezlediğimiz komplekslerinin HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesinde oluşan kompleksler ve II. Pik bölgesinde ise polimer zincirine bağlanmamış serbest peptid moleküllerini ifade eden pikler görülmektedir. I. Pik bölgesinde peptid konsantrasyonu arttıkça, $n=1$ oranından sonra kompleks oluşumunda herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Polimer zincirine bağlanan peptid miktarı yaklaşık olarak aynı kaldığı anlaşılmaktadır. Buna karşılık II. Pik bölgesinde ise, artan mol oranları ile birlikte polimer zinciri ile reaksiyona girmemiş serbest peptid miktarının da orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir (Şekil 4.58).



Şekil 5.9 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin VP-co-AA kopolimeri ile komplekslerinin HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■) bağlanmış (Pik I bölgesi), (●) serbest peptidlerin (Pik II bölgesi) pik alanlarının kıyaslamalı grafiği.

Komplekslere ait HPLC kromatogramlarının pik alanı grafikleri incelendiğinde, komplekslerin mol oranı arttıkça bağlanmamış serbest peptid miktarı da arttığı görülmektedir. Kompleks oluşumu ise $n=1$ oranından sonra çok küçük bir değişim göstermiştir. Bu sonuçlardan polimer zincirine bağlanan peptid miktarının peptidin artan mol oranından bağımsız bir şekilde yaklaşık olarak aynı kaldığı anlaşılmaktadır (Şekil 5.9).

Komplekslerine ait floresans spektrumları incelendiğinde, serbest peptide ait floresans spektrumu 353 nm’de gözlenmekte iken etkileşim sonucunda komplekslere ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 348 nm civarında olduğu gözlenmiştir. Şekildeki 4. pik $n=5$ oranındaki kompleksi ve 6. pik ise $n=5$ oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden de anlaşıldığı üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen kompleksleşme sonucunda komplekse ait pikin maksimum floresans şiddeti serbest peptide göre daha düşük ve maksimum dalga boyu ise serbest peptide göre 5 nm mavi bölgeye kaymıştır (Şekil 4.59).

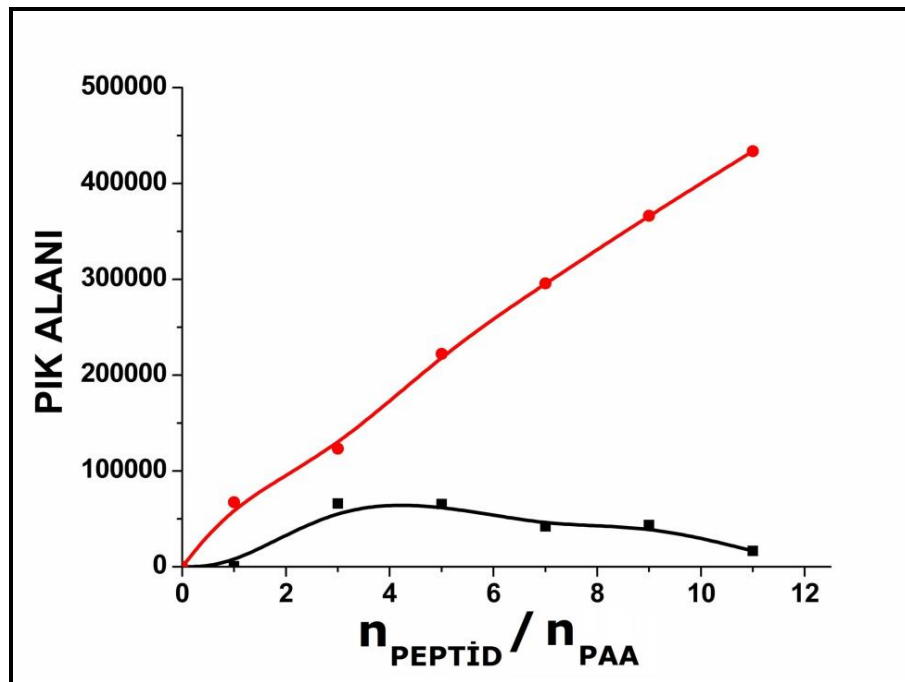
[P(VP-co-AA)] kopolimeri anyonik özellikli bir kopolimer olduğundan, polimer zinciri üzerindeki negatif yükler ile peptid molekülleri elektrostatik kuvvetler ile etkileşime girerler. HPLC kromatogramlarındaki pik alanlarından ve Floresans spektrumlarındaki kayma miktarlarından da anlaşıldığı üzere, kompleks oluşumunda, [P(VP-co-AA)] kopolimeri peptid molekülünü zincirine bağlamıştır.

5.3.2 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptidi Kompleksleri

5.3.2.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptidinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4261.5 μ l PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH’sı 5’e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH’sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.

Komplekslere ait HPLC kromatogramlardan da anlaşıldığı üzere, fiziksel komplekslerdeki peptid konsantrasyonu arttıkça, yani $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranı arttıkça, I. Pik bölgesinde fiziksel etkileşim ile oluşan kompleksleri ifade eden piklerin yaklaşık olarak aynı kaldığı, ancak II. Pik bölgesindeki serbest yani bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden piklerin orana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Yani peptid molekülleri ile polimer zinciri arasında oluşan etkileşimin artan peptid konsantrasyonundan bağımsız olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.60). Kromatogramların pik alanı grafiğinden de görüldüğü gibi sadece bir miktar peptid molekülü polimer zinciri ile etkileşim oluşturmakta ve peptid konsantrasyonunun artışı kompleks oluşumunu etkilememektedir (Şekil 5.10).



Şekil 5.10 Farklı mol oranlarında sentezlenen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA ile olan HPLC kromatogramlarına ait pik alanları grafiği: (■) komplekslere ait pik alanı değişimi, (●) serbest peptid moleküllerine ait pik alanı değişimi.

Komplekslere ait floresans spektrumları incelendiğinde ise elektrostatik etkileşim ile oluşturulan peptid/polimer komplekslerine ait herhangi bir dalgaboyu kayma gözlenmemektedir. Serbest peptide ait floresans spektrumu da komplekslere ait floresans spektrumları da 350 nm’de maksimum floresans şiddetlerini göstermektedir. Kompleks oluşumu sadece maksimum floresans şiddetindeki azalma ile ifade edilmektedir. Şekil 4.61’deki 3. pik $n=5$ oranındaki kompleksi ve 4. pik ise $n=5$ oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden de anlaşıldığı üzere, aynı miktarda peptid

içermesine rağmen kompleksleşme sonucunda komplekse ait pikin maksimum floresans şiddeti serbest peptide göre daha düşüktür. Serbest peptide göre azalmıştır (Şekil 4.61).

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin izoelektrik noktası 3,9'dur. PAA ise anyonik bir polimerdir. Komplekslerin hazırlandığı pH=5'de her iki molekül de negatif yük içermesine rağmen, H-bağı ve diğer zayıf etkileşimler sayesinde peptid/polimer komplekslerinin oluşumu gözlenmiştir.

5.3.3 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptidi Kompleksleri

5.3.3.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin HA1 Fragmenti 98-106 Peptid Dizisinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4874.35 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH'sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.

Hazırlanan komplekslere ait HPLC kromatogramlardan da anlaşıldığı üzere, fiziksel komplekslerdeki peptid konsantrasyonu arttıkça, yani $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}$ oranı arttıkça, I. Pik bölgesinde kompleks oluşumunu ifade eden piklerin yaklaşık olarak aynı kaldığı, ancak II. Pik bölgesindeki serbest yani polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden piklerin orana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Komplekslere ait HPLC kromatogramlarından peptid molekülleri ile polimer zinciri arasında oluşan etkileşimin artan peptid konsantrasyonundan bağımsız olduğunu anlaşılmaktadır. Reaksiyona eklenen peptid miktarı ne kadar fazla olursa olsun, polimer zinciri ile etkileşime giren peptid molekülü miktarı yaklaşık olarak aynı kalmaktadır (Şekil 4.62).

Bu peptid dizisinin spektral özellikleri diğer peptid dizilerinden farklıdır. Dizide hiç Triptofan rezidüsü yoktur. Tirozin rezidülerinin de bağlanma gerçekleştiğindeki davranışları farklıdır. Spektral olarak dalga boyunda kayma görülmez. Sadece floresan şiddetlerinde azalma şeklinde bağlanma reaksiyonları ifade edilir.

Komplekslere ait floresans spektrumları incelendiğinde ise, kompleksin farklı mol oranlarıyla birlikte peptid konsantrasyonu arttıkça, komplekslere ait floresans spektrumlarının şiddeti de polimer ile bağlanmamış (reaksiyona girmemiş), çözücü moleküllerine tamamen erişebilen serbest peptid moleküllerinin varlığından dolayı artmaktadır. Şekil 4.63’de 5. ve 8. spektrumlardaki peptid miktarı (mg/ml) aynıdır. Ancak, peptid-polimer etkileşiminden dolayı herhangi bir spektral kayma söz konusu değildir. Kompleksin floresans şiddeti azalmıştır ve bu azalma polimer zincirlerinin kompleks oluşturmasıyla Tirozin rezidülerinin çözücü moleküllerinden uzaklaşmasının sonucudur (Şekil 4.63).

Bu peptid dizisinin izoelektrik noktası 2,9’dur. PAA ise anyonik bir polimerdir. Komplekslerin hazırlandığı pH=5’de her iki molekül de negatif yük içermesine rağmen, başta H-bağı olmak üzere diğer zayıf etkileşimler sayesinde peptid/polimer komplekslerinin oluşumu gözlenmiştir.

5.3.4 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptidi Kompleksleri

5.3.4.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-108 Peptid Dizisinin PAA ile Komplekslerine Ait Tartışma

2,5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$ Da) 4624 μ L PBS tamponunda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH’sı 5’e ayarlandı. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{polimer}}= 1:3:5:7:9:11$ oranlarında, her bir kompleks için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine pH’sı 5 olarak hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve peptid/polimer kompleksleri oluşturuldu.

Hazırlanan komplekslere ait HPLC kromatogramlardan da anlaşıldığı üzere, fiziksel komplekslerdeki peptid konsantrasyonu arttıkça, yani $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{Polimer}}$ oranı arttıkça, I. Pik bölgesinde kompleks oluşumunu ifade eden piklerin yaklaşık olarak aynı kaldığı, ancak II. Pik bölgesindeki serbest yani polimer zinciri ile bağlanmamış peptid moleküllerini ifade eden piklerin orana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Komplekslere ait HPLC kromatogramlarından peptid molekülleri ile polimer zinciri arasında oluşan etkileşimin artan peptid konsantrasyonundan bağımsız olduğunu anlaşılmaktadır. Reaksiyona

eklenen peptid miktarı ne kadar fazla olursa olsun, polimer zinciri ile etkileşime giren peptid molekülü miktarı yaklaşık olarak aynı kalmaktadır (Şekil 4.64).

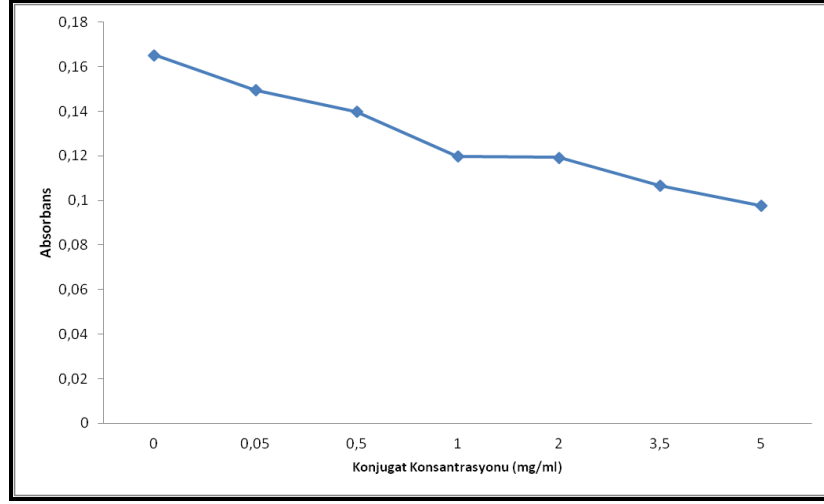
Komplekslere ait floresans spektrumları incelendiğinde ise, kompleksin farklı mol oranlarıyla birlikte peptid konsantrasyonu arttıkça, komplekslere ait floresans spektrumlarının şiddeti de polimer ile bağlanmamış (reaksiyona girmemiş), çözücü moleküllerine tamamen erişebilen serbest peptid moleküllerinin varlığından dolayı artmaktadır. Şekil 4.65’de 5. ve 7. spektrumlardaki peptid miktarı (mg/ml) aynıdır. Ancak, peptid-polimer etkileşiminden dolayı maksimum dalga boyundaki 3 nm’lik bir kayma ve floresans şiddetindeki azalma polimer zincirlerinin kompleks oluşturmasıyla Triptofan rezidülerinin çözücü moleküllerinden uzaklaşmasının sonucudur (Şekil 4.65).

Bu peptid dizisinin izoelektrik noktası 3,9’dur. PAA ise anyonik bir polimerdir. Komplekslerin hazırlandığı pH=5’de her iki molekül de negatif yük içermesine rağmen, başta H-bağı olmak üzere diğer zayıf etkileşimler sayesinde peptid/polimer komplekslerinin oluşumu gözlenmiştir.

5.4 Hücre Deneylerine Ait Tartışma

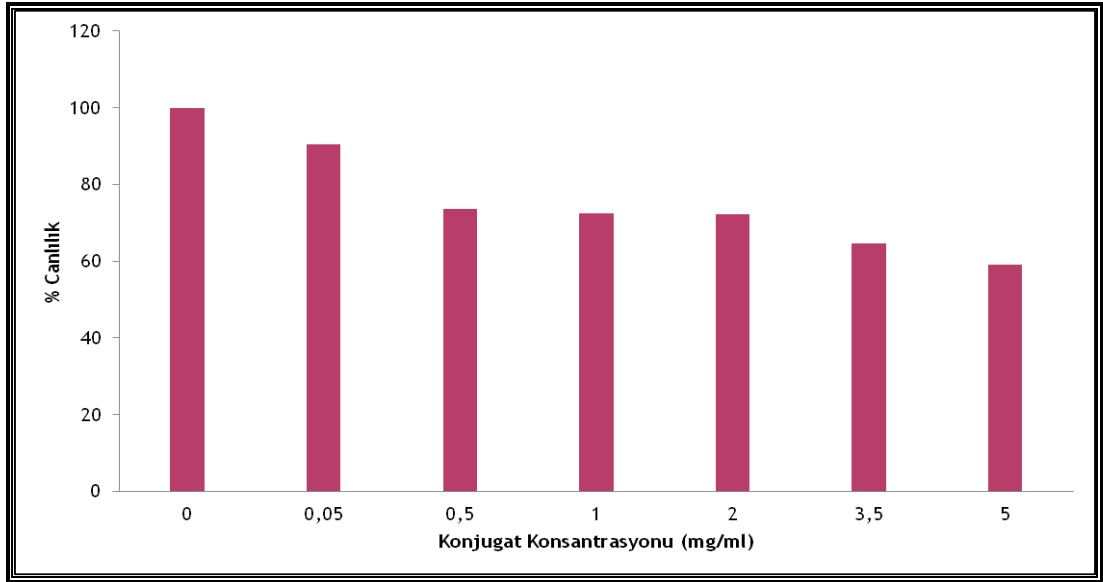
5.4.1 Hücre Sonuçları

Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin Poliakrilik asit (PAA) konjugatının farklı konsantrasyonlarda toksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmesi sonucunda, yüksek konjugat konsantrasyonlarında hücre canlılığının kontrole göre en fazla düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak incelenen düşük konsantrasyonlarda (0,05 ve 0,5 mg/ml) hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamaktadır. En yüksek konsantrasyon olan 5 mg/ml’de ise hücre canlılığı kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre en az seviyededir.



Şekil 5.11 Influenza A Virüsü M2 Proteinini peptidinin PAA ile konjugatının hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi

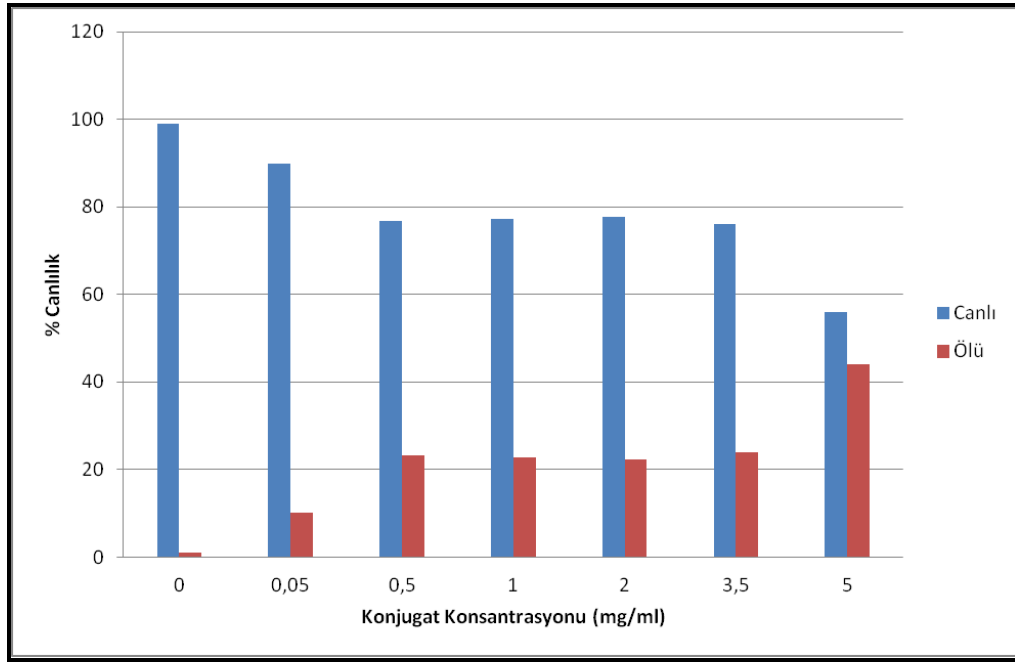
Şekil 5.11’de ise MTT yönteminde absorbans olarak okunan değerlerin % canlılık olarak ifadesi gösterilmiştir. Konjugat konsantrasyonu arttıkça hücrelerin canlılığının azalmakta olduğu tespit edilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 0,05mg/ml’de hücre canlılığı %90,46 iken bu değer değer artan konsantrasyonlarda sırasıyla %73.67, %72.46 %72.16, %64.59 ve % 59.15 şeklinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.12 Influenza A Virüsü M2 Proteinini peptidinin PAA ile biyokonjugatının hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile kontrole göre % canlılık olarak ifade edilmesi.

Şekil 5.12’de ise konjugatın aynı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi flow sitometrik olarak ölü ve canlı hücrelerin tespiti ile ölçülmüştür. Flow sitometrik incelemelerin de MTT yöntemini destekler nitelikte olduğu ve hücrelerin 0,05 ve 0,5

mg/ml konjugat konsantrasyonunda yüksek bir toksik etki görmezken, 5 mg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığının yaklaşık %55 seviyesine kadar düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 5.13 Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile konjugatının hücre canlılığına etkisinin Flow Sitometrik olarak analizi. (Konsantrasyon : %Canlılık = 0:100 – 0.05:80.91 – 0.5:76.83 – 1:77.28 – 2:77.69 – 3,5:78.11 – 5:55.88)

Şekil 4.67’de kontrol hücrelerinin morfolojileri gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü hücreler, intakt ve tutunmuş normal morfolojiye sahiptir.

1 mg/ml Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin PAA ile konjugatına maruz kalmış MCF 7 hücrelerinin morfolojileri incelendiğinde morfolojileri kontrole benzer intakt hücrelerle beraber uzantılarını kaybetmiş, yuvarlak hücreler de bulunmaktadır (Şekil 4.68).

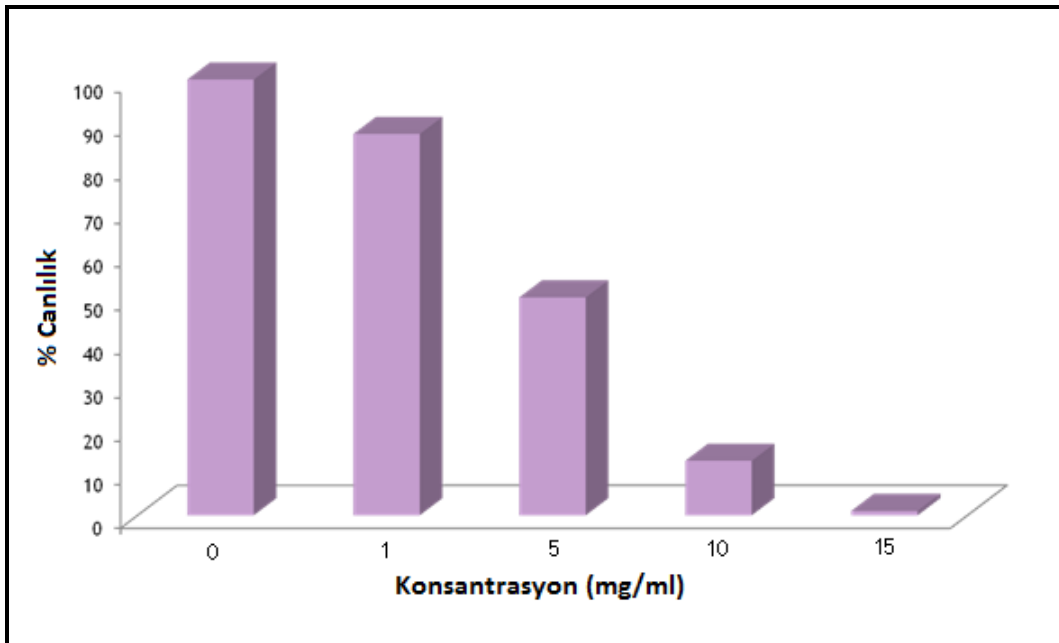
Influenza A Virüsü M2e Proteini peptidinin PAA ile konjugatının en yüksek konsantrasyonu (5 mg/ml) bulunan kültür ortamında hücrelerin mikroskopik görüntüleri verilmiştir. (Şekil 4.69). Şekil 4.69’da atipik forma dönüşmüş, büzülüp küçülmüş, yüzey uzantılarını kaybetmiş hücre sayısının oldukça fazla olduğu görülmektedir.

Canlılığı yüksek olan hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi MTT reaktantını mor renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir. Şekil 4.70’de MTT reaktanı eklenmiş kontrol grubundaki hücrelerdeki formazan kristali oluşumları

gösterilmiştir. Hücrelerin neredeyse tamamında formazan kristalleri oluşmuş olması hücrelerin canlılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.70’da ise 1 mg/ml konsantrasyonda bulunan hücrelerde formazan kristali oluştuğu ancak kontrol kadar yoğun olmadığı görülmektedir. Bazı hücrelerde kristal oluşumunun olmaması morfolojisi de bozuk olan bu hücrelerin canlılıklarının olmadığını göstermektedir.

Şekil 4.71’de ise konjugatın incelenen en yüksek konsantrasyonunda (5 mg/ml) formazan kristali oluşumu en düşük seviyededir. Ancak bu konsantrasyonda da canlı ve formazan kristali oluşturan hücreler bulunmaktadır.



Şekil 5.14Poliakrilik asitin 0.1-5-10-15 mg/ml konsantrasyonlarında toksisitesi [148].

Sonuç olarak,

Influenza A Virüsü M2 peptidi-polielektrolit biyokonjugatlarının bulunduğu kültür ortamında hücrelerin mikroskopik görüntülerinden ve MTT yöntemi ile incelenmesinden:

- Hücre canlılığının kontrole göre anlamlı bir fark olmağı,
- Düşük konsantrasyonda kontrole göre morfolojik olarak fark görülmeğı,

- Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre morfolojilerinin değiştiği, hücrelerin uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak forma geçen hücre sayısının arttığı; bu da canlılığın düştüğünün göstergesi olduğu,
- Hücre canlılığı etkisi flow sitometrik olarak ölü ve canlı hücrelerin tespiti ile de ölçülüp, MTT yöntemini desteklediği ortaya konulmuştur.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda poliakrilik asitin tek başına toksisitesi 0.1-5-10-15 mg/ml konsantrasyonlarında incelenmiş ve toksik etkisinin 15mg/ml konsantrasyonunda olduğu ortaya konmuştur [135]. Bizim çalışmamızda ise en yüksek poliakrilik asit konsantrasyon 5mg/ml'dir. İlerleyen çalışmalarda hayvan deneylerinde kullanılacak olan konsantrasyon ise çok daha düşüktür. Sonuç olarak, Influenza A Virüsü M2 Proteini peptidinin poliakrilik asit ile biyokonjugatlarının toksisitesi incelenmiş ve toksik olmadığı görülmüştür.

Çalışmalarımızın bir sonraki aşaması olan canlı sisteme verilecek olan bir preparatın toksik etkisinin olmaması gerekmektedir.

Sentetik aşı modeli olarak tasarladığımız Influenza A Virüsü M2 peptidi-polielektrolit biyokonjugatları için; *in vivo* uygulamalarda kullanılan düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde kayda değer bir toksik etki göstermediği: hem MTT deneyleri ile, hem de Flow Cytometry yöntemi ile hücre canlılığı kontrol edilerek birbirini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışma, elde ettiğimiz biyokonjugatların deney hayvanları üzerinde kullanabilirliğini ortaya koymuştur.

5.5 Floresans Rezonans Enerji Transferi Deneylerine ve İntermoleküler Mesafe Hesabına Ait Tartışma

Peptid/polimer biyokonjugasyon mekanizmasını sayısal değerler ile ifade etmek için model olarak seçilen Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin PAA asit ile biyokonjugatı n=9 mol oranı için sentezlenmiştir. Floresans spektrometre ile yapılan ölçümler sayesinde, DNC boya molekülünün FRET deneyleri için kullanılacak

optimum konsantrasyonunun 3µl olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çeşitli deneyler sonucunda boya molekülünün Lys amino asitine bağlanması için gerekli inkübasyon süresinin de 5 dakika olduğu bulunmuştur. Deney için optimum koşullar belirlendikten sonra yapılan çalışmalardan FRET deneyine ait spektrumlar elde edilmiştir.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin 91-106 peptid dizisine ait absorpsiyon spektrumu incelendiğinde maksimum dalga boyunun 290 nm olduğu bulunmuştur (Şekil 4.75). Emisyon spektrumu incelendiğinde ise maksimum dalga boyunun 350 nm olduğu bulunmuştur (Şekil 4.76).

FRET deneyleri için akseptör olarak görev yapacak, olan seçtiğimiz peptidimizin üçüncü amino asit rezidüsü olan Lizin amino asidinden bağlanan DNC'nin spektral özellikleri incelendiğinde, absorpsiyon spektrumunda maksimum dalga boyu 340 nm. (Şekil 4.77), emisyon spektrumunda ise maksimum dalga boyunun 500 nm olduğu görülmektedir (Şekil 4.78).

FRET deneyleri için donör olarak görev yapacak, seçtiğimiz peptidin –N terminal ucunda bulunan Triptofan'ın emisyon spektrumu ile akseptörümüz olan DNC'nin absorpsiyon spektrumlarının üst üste bindiği görülmektedir (Şekil 4.79).

n=9 mol oranında Borat tamponunda hazırlanan saf peptid çözeltisi DNC ile titre edildiğinde elde edilen spektrumlardan, her bir boya eklemesi sonrasında donör molekülümüz olan Triptofan'a ait piklerin maksimum floresans şiddetlerinin orantılı bir şekilde azalırken, akseptör molekülümüz olan DNC'e ait piklerin ise orantılı bir şekilde arttığı izlenmektedir (Şekil 4.80).

n=9 mol oranında Borat tamponunda hazırlanan peptid/polimer biyokonjugat çözeltisi DNC ile titrasyon spektrumları incelendiğinde, her bir boya eklemesi sonrasında polimer ile kovalent olarak bağlanmış peptidimizin –N terminal ucundaki donör molekülümüz olan Triptofan'a ait piklerin maksimum floresans şiddetlerinin orantılı bir şekilde azalırken, akseptör molekülümüz olan DNC'e ait piklerin ise orantılı bir şekilde arttığı izlenmektedir (Şekil 4.81).

Literatürden Triptofan amino asitinin kuantum veriminin 0.14 olduğu bilinmektedir. Bu bilgiyi referans değer olarak kullanıp hem saf peptid hem de biyokonjugatımızda floresans özelliğe neden olan bu amino asitin bu konformasyonlardaki kuantum

verimleri Floresans spektrometreden elde edilen spektrumların integralleri kullanılarak sırasıyla Denklem 4.2 ve Denklem 4.5 ile tek tek hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda peptidin kuantum veriminin 0,052 ve biyokonjugatın kuantum veriminin 0,01 olduğu bulunmuştur.

Akseptör molekülümüz olan DNC, rijit ortamda donör molekülü olan Triptofan etrafında rastgele dağılmıştır. Bu durumda oryantasyon faktörü K^2 'nin değerinin 0.476'dır.

Denklem 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ile elde edilen sonuçlara göre;

Saf peptidimiz için Triptofan amino asitinin –N terminal ucundan DNC'e olan mesafe, yani floresans enerji transferinin %50 verimle gerçekleştiği mesafe (Förster Mesafesi) $R_0=21,576\text{\AA}$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde ise proteinlerde ve peptidlerde Triptofan ile DNC arasındaki Förster mesafesinin 21-24 $\text{\AA}$ olduğu daha önceden ispat edilmiştir [149]. Donör ile akseptör arasındaki mesafe $r_{DA}=12,704\text{\AA}$ olarak hesaplanmıştır.

Aynı şekilde biyokonjugatlarımıza ait spektrumlardan da, biyokonjugat içinde konformasyonu değişmiş olan donör akseptör çifti arasındaki mesafe hesaplanmıştır. Enerji transferinin %50 verimle gerçekleştiği mesafe olan Förster Mesafesi $R_0=16,289\text{\AA}$ olarak hesaplanmıştır. Biyokonjugat oluşumundan sonra donör ile akseptör arasındaki mesafe ise $r_{DA}=9,591\text{\AA}$ olduğu hesaplanmıştır.

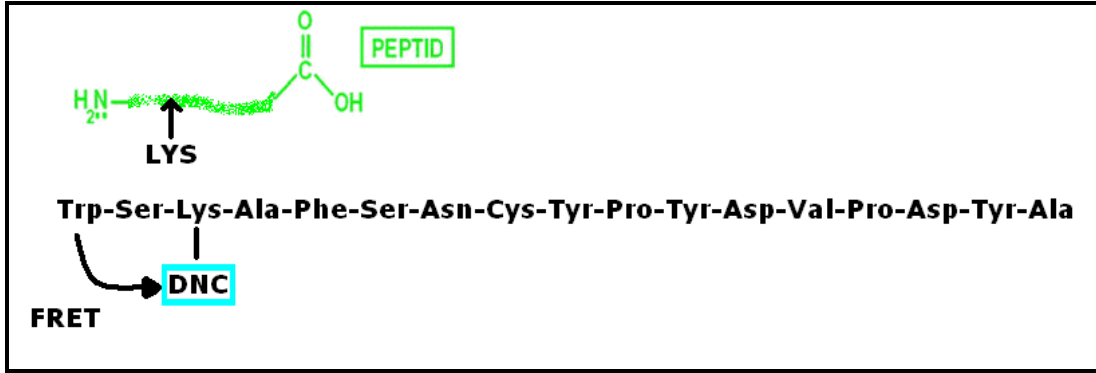
Elde edilen bu değerlerden, biyokonjugat oluşumunda donör ile akseptör arasındaki mesafenin 3,113 $\text{\AA}$ daha kısaldığı ispatlanmıştır. Bu sayısal değerler bize biyokonjugat oluşumunda peptid dizisinin konformasyonunun değiştiğini peptid dizisinin büküldüğünü göstermektedir.

5.6 Modelleme Sonuçları ve Tartışması

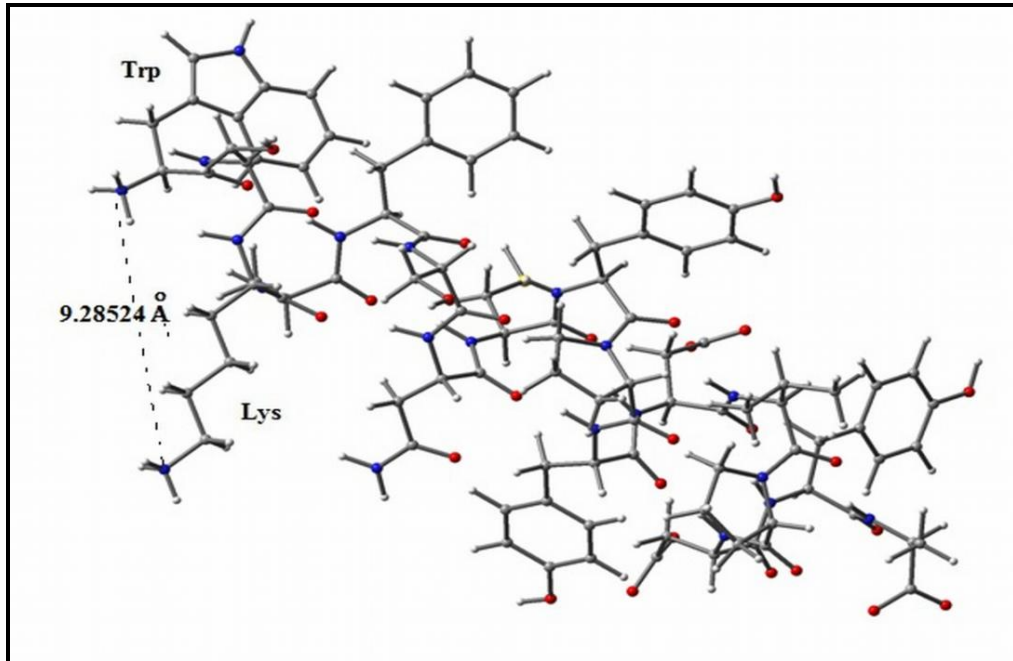
Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi ve peptid/polimer biyokonjugatı FRET yöntemi ile incelenmiş ve intermoleküler mesafe hesabı yapılmıştır. Teorik olarak da konformasyon analizi ile deneysel sonuçlar karşılaştırılmıştır. Peptid, DNC eklenmiş peptid için Gaussian 03 ve HYPERCHEM paket programları ile geometri optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Donör molekülü olan peptid dizisinin ilk amino asit

rezidüsü Triptofan'ın –N terminal ucundan üçüncü amino asit rezidüsü olan Lizin amino asitinin yan zincirinin en son noktasına olan mesafe hesabı teorik olarak yapılmıştır.

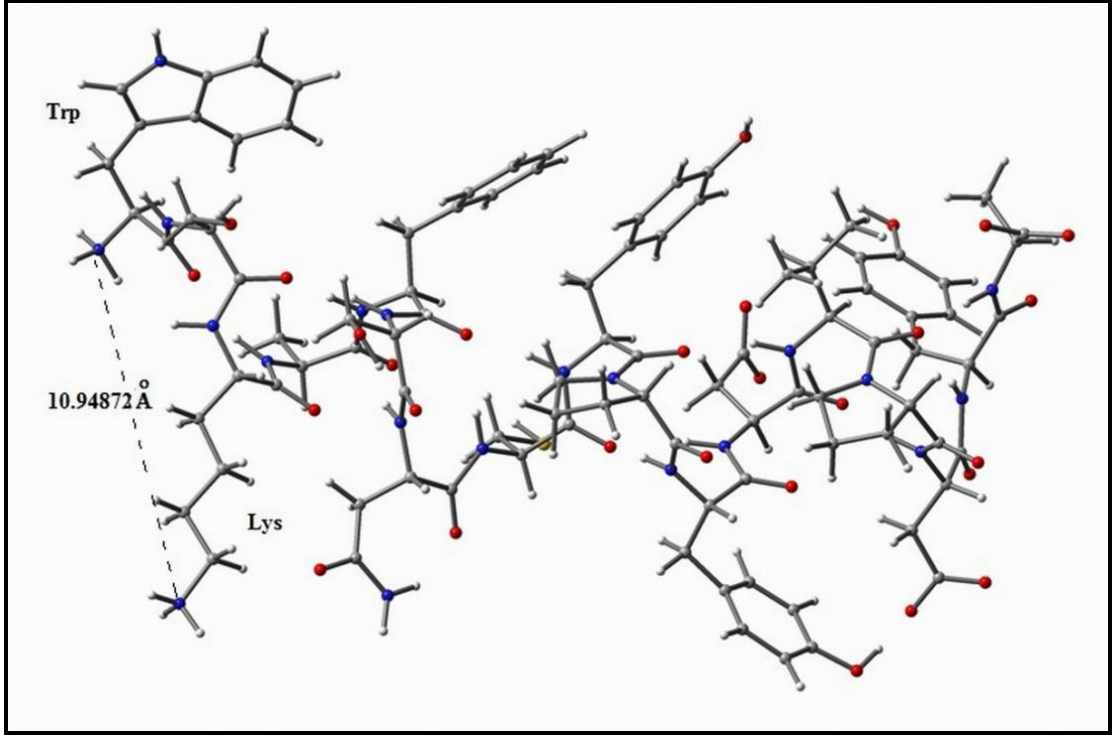
5.6.1 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 Peptid Dizisi İçin Modelleme Çalışmaları



Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin yan zincirlerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda bu peptid dizisinin α -helix yapıdaki konformasyonunun optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon öncesi ve sonrasında peptid dizisinin –N terminal ucundaki Triptofan rezidüsünün amin grubundan, üçüncü amino asit rezidüsü olan Lizin amino asitinin yan zincirindeki amin grubuna olan uzaklıklar hesaplanmıştır.



Şekil 5.15 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.

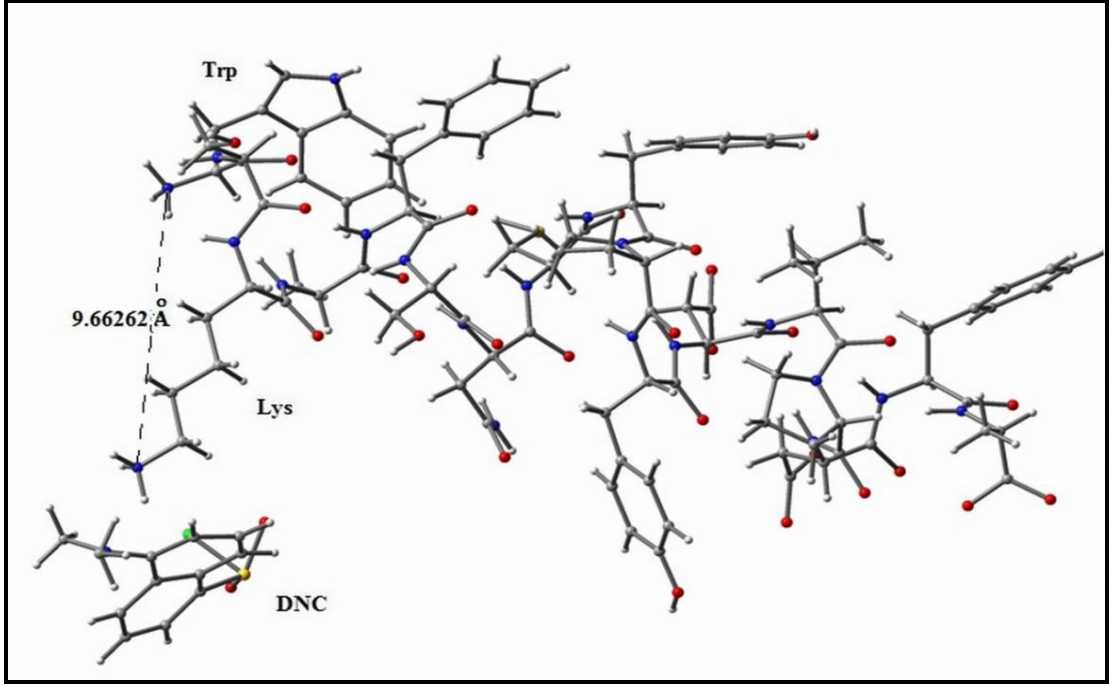


Şekil 5.16 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellenmesi.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin en kararlı olduğu hali modellenmiştir ve optimize geometrisi ortaya konulmuştur. Optimizasyon sonrasındaki enerjisi 34.664179 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Peptid dizisinin optimizasyon öncesinde, birinci amino asit rezidüsü Triptofan'ın –N terminal ucu ile Lizin amino asitinin yan zincirindeki amino grubu arasındaki mesafe 9,28524 Å'dür (Şekil 5.14).

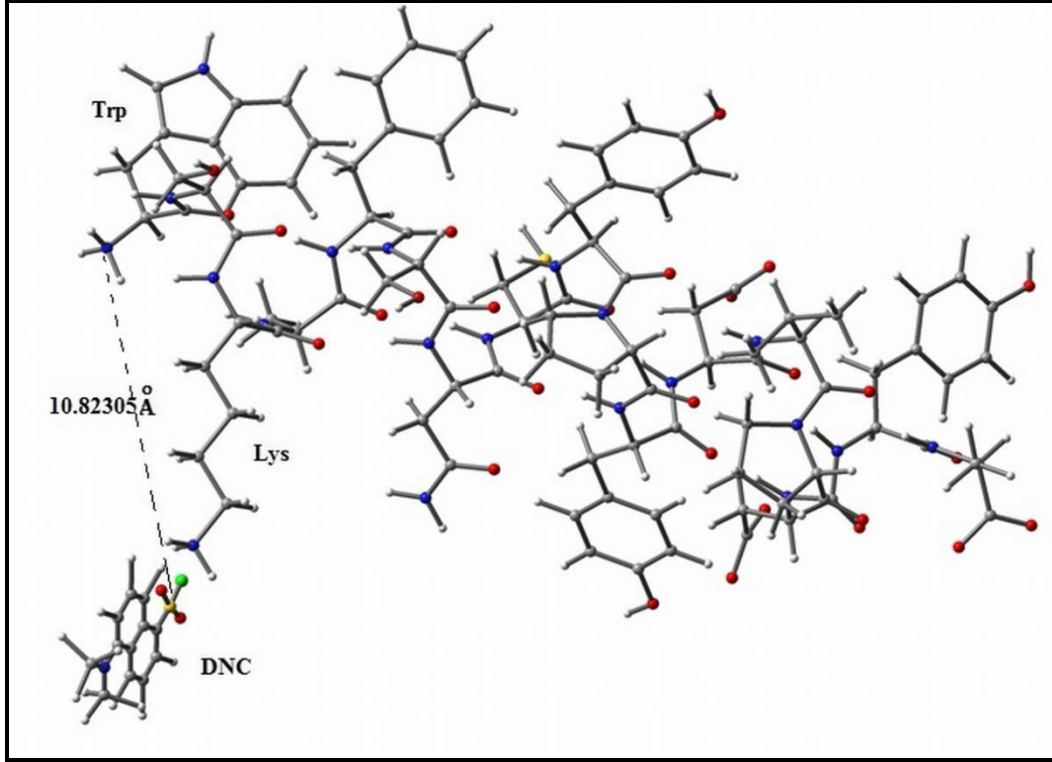
Peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinde Trp amino asitinin –N terminal ucu ile Lys amino asitinin yan zincirindeki amino grubu arasındaki mesafenin 10,94872 Å olduğu bulunmuştur (Şekil 5.15).



Şekil 5.17 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.

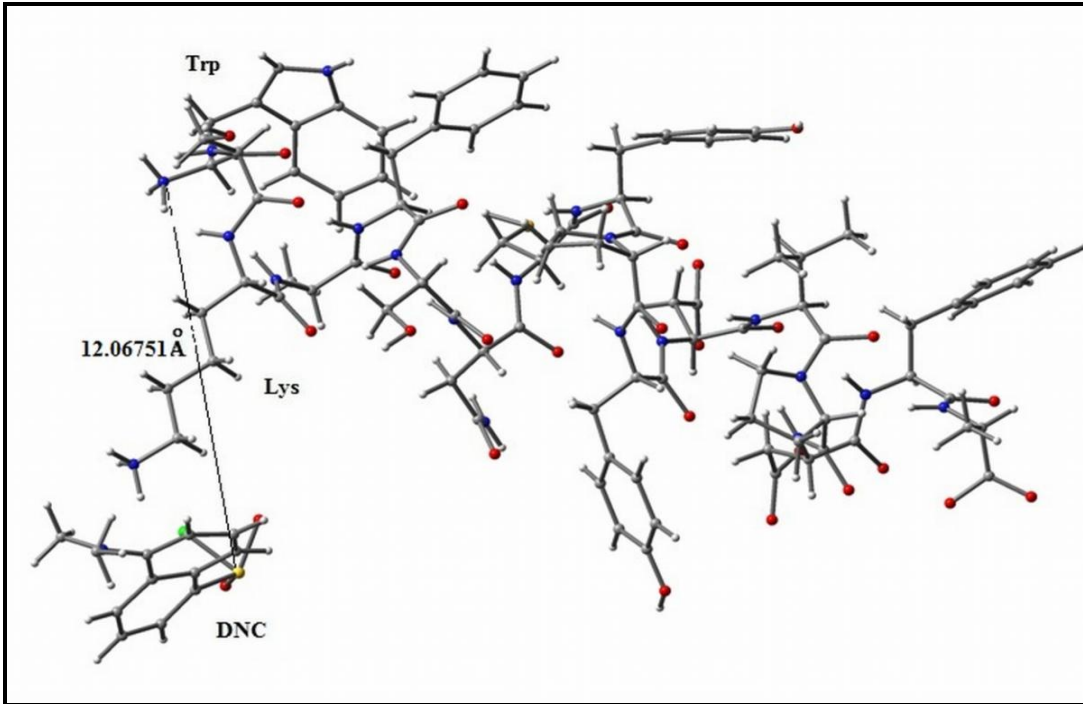
Trp amino asitinin –N terminal ucu ile Lys amino asitinin yan zincirinin en son noktası arasındaki mesafe 9,66262 Å'dür.

DNC eklenmiş peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinde Trp amino asitinin –N terminal ucu ile Lizin amino asitinin yan zincirindeki amino grubu arasındaki mesafenin 9,66262 Å olduğu bulunmuştur (Şekil 5.16).

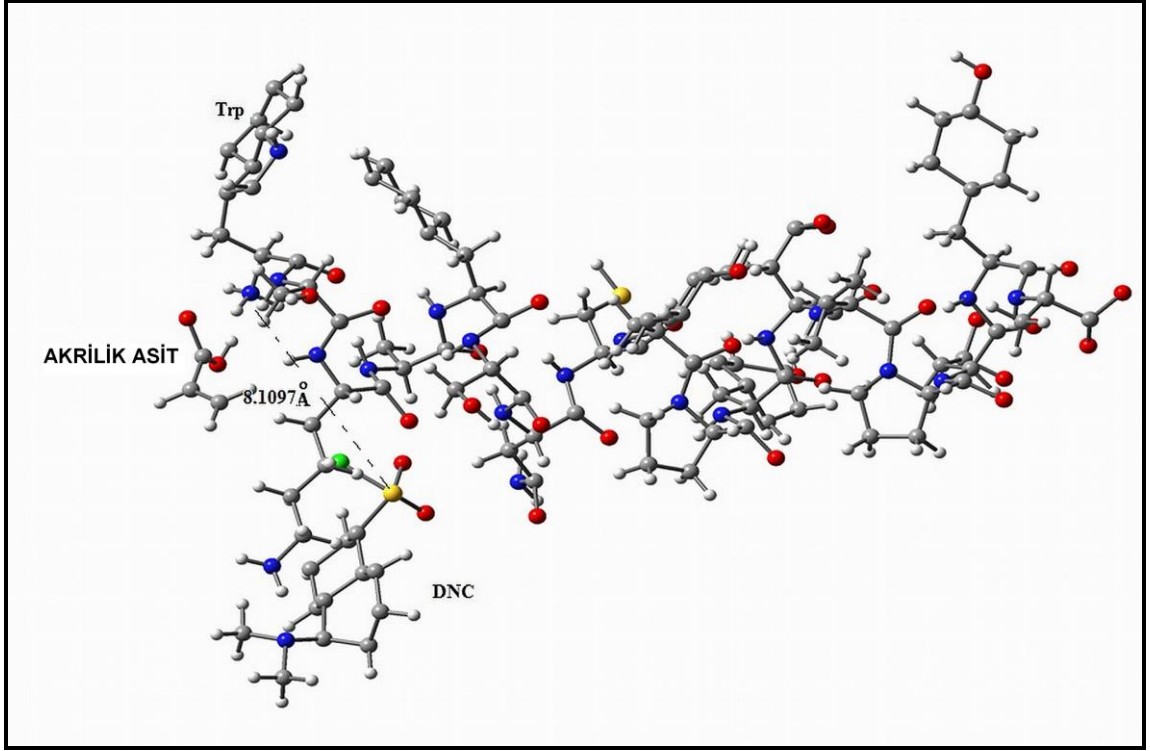


Şekil 5.18 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.

Trp amino asitinin –N terminal ucu ile DNC sülfür atomu arasındaki mesafe 10,8230 Å'dür.



Şekil 5.19 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.



Şekil 5.20 Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.

Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisine DNC boya molekülü eklendiğinde en kararlı olduğu hali modellenmiştir ve optimize geometrisi ortaya konulmuştur. Optimizasyon sonrasındaki enerjisi 116.948321 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

DNC eklenmiş peptid dizisinin optimizasyon öncesinde, birinci amino asit rezidüsü Triptofan'ın –N terminal ucu ile DNC molekülünün peptide bağlanma noktası arasındaki mesafe 10,82305 Å'dür (Şekil 5.17).

DNC eklenmiş peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinde Trp amino asitinin –N terminal ucu ile DNC molekülünün peptide bağlanma noktası arasındaki mesafenin HyperChem programı ile 12,06751 Å olduğu bulunmuştur (Şekil 5.18). Floresans Enerji Transferi yöntemi ile hesaplanan deneysel olarak bulunan donör molekülümüz olan Triptofan amino asidinin –N terminal ucu ile akseptör molekülümüz olan peptid dizimizdeki üçüncü amino asit olan Lizin amino asidinin yan zincirindeki amin grubundan diziye bağlanan DNC arasındaki mesafenin ise $r_{DA}=12,704$ Å olarak

bulunmuştur. Yapılan deneysel ve teorik çalışmalar sonucunda, deneysel olarak elde edilen donör akseptör çifti arasındaki mesafenin % 5,27 hata ile ispat edilmiştir. Biyokonjugatta ise donör ile akseptör arasındaki mesafe FRET yöntemi ile $r_{DA}=9,591 \text{ Å}$ olarak bulunmuştur. HyperChem programında ise poliakrilik asitin tek bir monomeri için yapılabilmektedir ve mesafe $8,1097 \text{ Å}$ olarak hesaplanmıştır. İlerleyen çalışmalarda polimer zinciri için teorik hesaplamalara devam edilecektir.

Bu tez çalışmasında Influenza A Virüsüne ait farklı peptid epitopları kullanılarak değişik taşıyıcılar ile biyokonjugatları ve kompleksleri oluşturulmuştur. Biyokonjugatların ve komplekslerin oluşumu farklı spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında karbodiimid varlığında kovalent bağlar ile oluşan biyokonjugatların daha verimli bağlanma gösterdiği görülmüştür. Literatürde ilk kez Influenza A Virüsü Hemagglutinin H3N2 91-106 peptid dizisi modellenmiş ve peptid polimer biyokonjugatlarının üç boyutlu konformasyonunun nasıl değişime uğradığı sayısal değerlerle ispat edilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen bilgiler, farklı zaman ve yerlerde epidemilere ve dünya çapında pandemilere neden olmuş ve gelecekte de olması yüksek ihtimal olan Influenza A Virüsü'nün oluşturduğu halk arasında Domuz gribi olarak da bilinen salgın hastalığa karşı spesifik antikorların elde edilmesi, nanobiyosensörlerin oluşturulması, tanı kitlerinin ve sentetik aşılarda geliştirilmesi için yapılacak araştırmalar için önemli bir ön çalışmadır. Floresans Enerji Transferi Yöntemi ile biyokonjugattaki donör ve akseptör arasındaki intermoleküler mesafe hesabının yapılması, merhum Hocamız değerli bilim insanı Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'nin hedefi olan aynı polimer matriksine birden fazla hastalığın antijeninin bağlanarak multifonksiyonel biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesine ışık tutacak bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

- [1] Reid, A.H. Fanning, T.G. Hultin, J.V. ve Taubenberger, J.K., (1999). "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1651-1656.
- [2] Wright PF, W.R., (2001). *Orthomyxoviruses*, H.P. Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott, 1533-1579.
- [3] Potter, C.W., (2001). "A history of influenza", *J Appl Microbiol*, 91: 572-579.
- [4] Chi, X.S. Bolar, T.V. Zhao, P. Tam, J.S. Rappaport, R. ve Cheng, S.M., (2005). "Molecular evolution of human influenza A/H3N2 virus in Asia and Europe from 2001 to 2003", *Journal of clinical microbiology*, 43: 6130-6132.
- [5] Aslan, S.S., (2006). *İnfluenza Virusunun Tanısında Hücre Kültürü, Hızlı Test, Real Time Pcr Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve İzole Edilen Virusların Tiplendirilmesi*, İTF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [6] Beignon, A.-S. Brown, F. Eftekhari, P. Kramer, E. Briand, J.-P. Muller, S. ve Partidos, C.D., (2005). "A peptide vaccine administered transcutaneously together with cholera toxin elicits potent neutralising anti-FMDV antibody responses", *Veterinary immunology and immunopathology*, 104: 273-280.
- [7] Fischer, D. Rood, D. Barrette, R. Zuwallack, A. Kramer, E. Brown, F. ve Silbart, L., (2003). "Intranasal immunization of guinea pigs with an immunodominant foot-and-mouth disease virus peptide conjugate induces mucosal and humoral antibodies and protection against challenge", *Journal of virology*, 77: 7486-7491.
- [8] Ben-Yedidia, T. ve Arnon, R., (1998). "Synthetic peptide-based vaccines against influenza", *Letters in Peptide Science*, 5: 341-344.
- [9] Gottfried, B., Bitterlich, G.B., Looney, D.J. ve Altman, A., (1995). "Society for Microbiology Immunogenic Targeting of Recombinant Peptide Vaccines to Human Antigen-Presenting Cells by Chimeric Anti-HLA-DR and Anti-Surface Immunoglobulin D Antibody Fab Fragments In Vitro", *Journal of virology*, 69: 2357-2365

- [10] Jacob, C.O. Sela, M. ve Arnon, R., (1983). "Antibodies against synthetic peptides of the B subunit of cholera toxin: crossreaction and neutralization of the toxin", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 7611-7615.
- [11] Audibert, F. Jolivet, M. Chedid, L. Alouf, J.E. Boquet, P. Rivaille, P. ve Siffert, O., (1981). Active Anti-Toxic Immunization By A Diphtheria-Toxin Synthetic Oligopeptide, *Nature*, 289: 593-594.
- [12] Richman, S.J., Vedvick, T.S. ve Reese, R.T., (1989). Peptide-Mapping Of Conformational Epitopes In A Human Malarial Parasite Heat-Shock Protein, *Journal of Immunology*, 143: 285-292.
- [13] Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov, A.Sh., (1992). Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes, UK.
- [14] 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.
- [15] Mustafaev, M.I., (1996a). Biyopolymerler (Biopolymers), Gebze/Kocaeli.
- [16] Mustafaev, M., (2004). Functionally biopolymer systems, *Sigma*, 4: 1-200.
- [17] Eroglu Iscani B., Kılınç Budama, Y., Mustafaeva, Z., (2011). Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry, *Turkish Journal of Biochemistry*, 36: 222-229.
- [18] Karahan M., M.Z., Koç Çakır R., Bağirova M., Allahverdiyev M. A., (2012). Investigation of Metal- Polyelectrolyte complexes b Toxicity, *Toxicology and Industrial Healty*, first published on August 22, DOI:10.1177/0748233712457446),.
- [19] Petrov, R.V. Khaitov, R.M. Zhdanov, V.M. Sinyakov, M.S. Norimov, A.S. Nekrasov, A.V. Podchernyaeva, R.Y. Kharitononkov, I.G. ve Shchipanova, M.V., (1985). Influenza virus antigens conjugated with a synthetic polyelectrolyte: a novel model of vaccines, *Vaccine*, 3: 392-400.
- [20] Chen, J. Skehel, J.J. ve Wiley, D.C., (1999). N-and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA2 subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 8967-8972.
- [21] Bui, M. Whittaker, G. ve Helenius, A., (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins, *Journal of virology*, 70: 8391-8401.
- [22] Martin, K. ve Helenius, A., (1991). Nuclear Transport Of Influenza-Virus Ribonucleoproteins - The Viral Matrix Protein (M1) Promotes Export And Inhibits Import, *Cell*, 67: 117-130.
- [23] O'Neill, R.E. Talon, J. ve Palese, P., (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins, *Embo Journal*, 17: 288-296.
- [24] Garcia-Sastre, A. Egorov, A. Matassov, D. Brandt, S. Levy, D.E. Durbin, J.E. Palese, P. ve Muster, T., (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems, *Virology*, 252: 324-330.

- [25] Staeheli, P. ve Haller, O., (1987). Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus, *Interferon*, 8: 1.
- [26] Taubenberger, J.K. Reid, A.H. Krafft, A.E. Bijwaard, K.E. ve Fanning, T.G., (1997). Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus, *Science*, 275: 1793-1796.
- [27] Talon, J. Salvatore, M. O'Neill, R.E. Nakaya, Y. Zheng, H. Muster, T. García-Sastre, A. ve Palese, P., (2000). Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 4309-4314.
- [28] Palese, P. ve García-Sastre, A., (2002). Influenza vaccines: present and future, *Journal of Clinical Investigation*, 110: 9-14.
- [29] Fodor, E. Devenish, L. Engelhardt, O.G. Palese, P. Brownlee, G.G. ve García-Sastre, A., (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA, *Journal of virology*, 73: 9679-9682.
- [30] Neumann, G. Watanabe, T. Ito, H. Watanabe, S. Goto, H. Gao, P. Hughes, M. Perez, D.R. Donis, R. ve Hoffmann, E., (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 9345-9350.
- [31] García-Sastre, A. ve Palese, P., (1995). "The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes", *Virus research*, 37: 37-47.
- [32] Öner, A.F., (2007). "Grip ve Kuş Gribi", *Türkiye'de Sık Karşılaşılan Hastalıklar: Enfeksiyon Hastalıklar, Romatizmal Hastalıklar, Afetlerde Ezilme Yaralanmalar Sempozyum Dizisi* 125-138.
- [33] Lamb RA, K.R., (2001). *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication.*, H.P. Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1487-1532.
- [34] Cox NJ, K.Y., Mahy BWJ, Collier L, editors. Topley and Wilson's (1998). "Microbiology and Microbial Infections", New York: Oxford University Pres.
- [35] Webby, R. ve Webster, R., (2001). "Emergence of influenza A viruses", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356: 1817-1828.
- [36] Pandemik Influenza Ulusal Faaliyet Planı, (2006).T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara: 78.
- [37] Horimoto, T. ve Kawaoka, Y., (2005). "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents", *Nature Reviews Microbiology*, 3: 591-600.
- [38] Arnon, R. ve Ben-Yedidia, T., (2003). "Old and new vaccine approaches", *International immunopharmacology*, 3: 1195-1204.
- [39] Yeğen, O., (1990). *Temel İmmünoloji ve İmmün Eksikli Hastalıkları*, Ankara: Palme Tıp Kitabevi.
- [40] Anadolu Üniversitesi, Ünite 14-Aşılar ve Serumlar, <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1213/unite14.pdf>, 18.10.2012
- [41] Abbas, A. Lichtman, A. ve Pober, J., (1994). "Regulation of immune responses", *Cellular and molecular immunology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co: 206-207.
- [42] Akan, E., (1992). *Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*.

- [43] Bilgehan, H., (1993). Temel Mikrobiyoloji ve Başıklık Bilimi İzmir: Baris Fakulteler Kitabevi.
- [44] Aşı Danışma Merkezi, Aşıların Sınıflandırılması, http://asidanisma.com/genel_bagisiklama_06p.asp, 21.10.2012
- [45] Kılıcturgay, K., (1994). İmmunolojiye Giriş, Bursa: Gunes ve Nobel Tıp Kitabevleri.
- [46] Mustafaev M.I., Sarac A.S., Erkol A.Y., (1996c). "Effects of Cu²⁺ on stability and composition of water soluble ternary polyacrylic acid-Cu²⁺-protein complexes against radiation damage", Polymer Bulletin, 36: 623-627.
- [47] Mustafaev M., Osada Y., Matsukata M., Basalp A., Cirakoglu B., Bermek E., (1996d). "New amphiphilic immunogens by poly(N-isopropylacrylamide)-modified bovine serum albumin", Polymer Gels and Networks, 4: 363-372.
- [48] Mustafaev, M., Yücel F., Ozturk S., Cirakoglu B., Bermek E., (1996e). "Cu²⁺-mediated complex formation between polyacrylic acid (PAA) and bovine serum albumin", Journal of Immunological Methods, 197: 31-37.
- [49] Mustafaev, M. Cirakoglu, B. Sarac, S. Ozturk, S. Yucel, F. ve Bermek, E., (1996). "Soluble and insoluble ternary complexes of serum proteins with polyanions in the presence of Cu²⁺ in water", Journal of Applied Polymer Science, 62: 99-109.
- [50] Mustafaev, M.I., (1996). "Polyelectrolytes in immunology: Fundamentals and perspectives", Turkish Journal of Chemistry, 20: 126-138.
- [51] Basalp, A. Bermek, E. Cirakoglu, B. Coka, V. Mustafaev, M.I. ve Sarac, A.S., (1996). "Immune response to 17 beta-estradiol in polyelectrolyte complex: Antigen specificity and affinity of hybridoma clones", Hybridoma, 15: 233-238.
- [52] Özeroglu, C. Güney, O. Sarac, A.S. ve Mustafaev, M.I., (1996). "The polymerization of acrylamide initiated with Ce(IV) and KMnO₄ redox systems in the presence of glycine", Journal of Applied Polymer Science, 60: 759-765.
- [53] Güney, O. Sarac, A.S. ve Mustafaev, M.I., (1997). "Fluorescence and turbidimetry study of complexation of human serum albumin with polycations", Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 12: 231-244.
- [54] Sarac S., Yavuz O., Sezer E., Mustafaev M.I., (1997a). "Spectrophotometric study of Cu²⁺- mediated complex formation of bovine serum albumin with copolymers of acrylic acid and vinyl pyrrolidone", Polymer News, 22: 258-261.
- [55] Sarac, A.S. Sonmez, G. Ustamehmetoglu, B. ve Mustafaev, M.I., (1997). "Water-soluble polypyrroles by matrix polymerization: Interpolymer complexes", Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 35: 1255-1263.
- [56] Özeroğlu, C. Güney, O. ve Mustafaev, M.I., (2003). "Oxidative polymerization of acrylamide in the presence of L - threonine", Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 249: 1-9.
- [57] Mustafaev, M., Osada Y., Basalp A., Mustafaeva Z., Cirakoğlu B., Bermek E., (1998). "New temperature-responsive immunogens by poly (N-isopropyl-acryamide)-modified bovine serum albumin", Recent Advances in Peptide and Protein Delivery: 145-162.
- [58] Gürhan Deliloglu 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-polymer conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine".
- [59] Mustafaev, M. Mustafaeva, Z. Ergen, E. Uraki, Y. ve Sano, Y., (2002). "Novel betulin-containing polyelectrolyte conjugates", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 17: 251-269.
- [60] Hoffman, A.S., (2000). "Bioconjugates of intelligent polymers and recognition proteins for use in diagnostics and affinity separations", *Clinical Chemistry*, 46: 1478-1486.
- [61] Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötzt, J. , (1994). *Polyelectrolytes: formation, characterization and application*, Munich: Hanser Publishers.
- [62] Budama Y., (2006). Anyonik polielektrolitlerin sığır serum albuminle etkileşiminin floresans yöntemi ile incelenmesi, ed^eds. Biyomühendislik Bölümü. Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [63] Wikipedia, Protein Primary Structure, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein-primary-structure.png>, 24.12.2012
- [64] Wikipedia, Amino Asitler, http://tr.wikipedia.org/wiki/Amino_asit, 15.11.2012
- [65] Champe Pamela, Harvey R., (1997). *Biyokimya*, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.
- [66] Wikipedia, Peptide Formation Ball, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Peptidformationball.svg>, 23.02.2013
- [67] Nelson L.N., Cox M.M. , *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Ankara: Palme Yayınları.
- [68] Solomons G., Fryhle C., (2004). *Organic Chemistry*, United States of America.
- [69] Cumhuriyet Üniversitesi Ders Notları, Proteinlerin üç boyutlu yapısı, www.tippedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem1/.../Pro3.doc, 05.11.2012
- [70] Miami Üniversitesi, Protein Folding, <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/protein/sf3x11a.jpg>, 18.12.2012
- [71] Polar Biology, Proteins, <http://yushang-sbi4u.blogspot.com/2011/03/protein.html>, 20.10.2012
- [72] Akron Global Polymer Academy, Science Education, http://www.agpa.uakron.edu/p16/lesson.php?id=hold_on_tight&pg=content, 08.07.2012
- [73] McDonald, I.K. ve Thornton, J.M., (1994). "Satisfying Hydrogen-Bonding Potential In Proteins", *Journal of Molecular Biology*, 238: 777-793.
- [74] Pace, C.N. Shirley, B.A. McNutt, M. ve Gajiwala, K., (1996). "Forces contributing to the conformational stability of proteins", *The FASEB journal*, 10: 75-83.
- [75] Arizona University, Chemistry Tutorial-The Chemistry of Water, <http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/tutorials/chemistry/page3.html>, 14.01.2013
- [76] Tübitak, Bilim ve Teknik Dergisi, http://biltek.tubitak.gov.tr/merak ettikleriniz//index.php?kategori_id=6&soru_id=2870, 26.04.12
- [77] Virtual Chembook, Tertiary Protein - Structure <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/567tertprotein.html>, 19.11.2012
- [78] Patthy, L., (2009). *Protein evolution*: Wiley-Blackwell.

- [79] Ucdavis Chemwiki, Hydrophobic Interactions, [http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical Chemistry/Physical Properties of Matter/Intermolecular Forces/Hydrophobic interactions](http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/Intermolecular_Forces/Hydrophobic_interactions), 01.10.2012
- [80] Professor John Blamire http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b_weakforces.html, 01.01.2013
- [81] Hermanson, G.T., (1996). Bioconjugate techniques, USA: Elsevier Science.
- [82] Sheehan, J.C., Cruickshank, P.A., Boshart, G.L., (1961). "A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides", J. Org. Chem, 26: 2525-2528.
- [83] Sheehan, J.C., Preston, J., Cruickshank, P.A., (1965). "A rapid synthesis of Aoligonucleotide derivatives without isolation of intermediates", J. Am. Chem. Soc, 87: 2492-2493.
- [84] Staros, J.V., (1982). "N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis (N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers", Biochemistry, 21: 3950-3955.
- [85] Kotite, N.J. Staros, J.V. ve Cunningham, L.W., (1984). "Interaction of specific platelet membrane proteins with collagen: evidence from chemical crosslinking", Biochemistry, 23: 3099-3104.
- [86] Denney, J.B., and Blobel, G, (1984). "125I-Labeled cross-linking reagent that is hydrophilic, photoactivatable, and cleavable through an azo linkage", Proc. Natl. Acad. Sci, 81: 5286 - 5290 .
- [87] Beth, A.H., Conturo, T.E., Venkataramu, S.D., and Staros, J.V., (1986). "Dynamics and interactions of the anion channel in intact human erythrocytes: An electron paramagnetic resonance spectroscopic study employing a new membrane-impermeant bifunctional spin-label", Biochemistry, 25: 3824 - 3832.
- [88] Donovan, J.A. ve Jennings, M.L., (1986). "N-hydroxysulfosuccinimido active esters and the L-(+)-lactate transport protein in rabbit erythrocytes", Biochemistry, 25: 1538-1545.
- [89] Jennings, M. ve Nicknisch, J., (1985). "Localization of a site of intermolecular cross-linking in human red blood cell band 3 protein", Journal of Biological Chemistry, 260: 5472-5479.
- [90] Ludwig, F.R. ve Jay, F.A., (1985). "Reversible chemical cross - linking of the light - harvesting polypeptides of Rhodospseudomonas viridis", European Journal of Biochemistry, 151: 83-87.
- [91] Anjaneyulu, P. ve Staros, J.V., (1987). "Reactions of N - hydroxysulfosuccinimide active esters*", International Journal of Peptide and Protein Research, 30: 117-124.
- [92] Sheehan, J.C. ve Hess, G.P., (1955). "A new method of forming peptide bonds", Journal of the American Chemical Society, 77: 1067-1068.
- [93] Demchenko, A.P., (2008). Introduction to fluorescence sensing: Springer.
- [94] Lakowicz, J.R., (2006). Principles of fluorescence spectroscopy: Springer.
- [95] Cheung, H., (2002). "Resonance energy transfer", Topics in fluorescence spectroscopy: 127-176.
- [96] Makarov, D.E. ve Plaxco, K.W., (2009). "Measuring distances within unfolded biopolymers using fluorescence resonance energy transfer: The effect of polymer chain dynamics on the observed fluorescence resonance energy transfer efficiency", The Journal of chemical physics, 131.

- [97] Hebert, B. ve Braslavsky, I., (2007). "Single-Molecule Fluorescence Microscopy and its Applications to Single-Molecule Sequencing by Cyclic Synthesis", *Perspectives in Bioanalysis*, 2: 209-244.
- [98] Dewey, T.G., (1991). "Excitation-Energy Transport In Fractal Aggregates", *Chemical Physics*, 150: 445-451.
- [99] Förster, T., (1948). *Intermolecular energy migration and fluorescence*, Rochester: Department of Physics and Astronomy, University of Rochester.
- [100] Held, P., (2005). *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience*, Bio-Tek Application Note, ed^eds.
- [101] Lakowicz, J.R. Gryczynski, I. Wicz, W. Laczko, G. Prendergast, F.C. ve Johnson, M.L., (1990). "Conformational distributions of melittin in water/methanol mixtures from frequency-domain measurements of nonradiative energy transfer", *Biophysical chemistry*, 36: 99-115.
- [102] Cai, K., and Schircht, V., (1996). "Structural studies on folding inter-mediate of serine hydroxymethyltransferase using fluorescence resonance energy transfer", *J. Biol. Chem*, 271: 27311-27320.
- [103] Kosarev, E. ve Muranov, K., (2003). "Chromatography+ Recovery= superresolution chromatography", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 502: 764-767.
- [104] Çimen, N.S., (2006). *Proteinlerin Poliakrilik Asit İle Suda Çözünmeyen Kompleksleri*, ed^eds. Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [105] Acibadem LabMed, Kanıta Dayalı Laboratuar Tıbbi http://www.acibademlabmed.com.tr/lab_bulten_200509.pdf, 20.10.2013
- [106] Prof. Dr. Mehmet Yaman, Enstrumental Analiz Ders Notları, http://www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens.pdf, 16.12.2013
- [107] Lakowicz, J.R., (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [108] Bell, J.E., (1981). *Spectroscopy in Biochemistry*, Raton, FL.: CRC Press.
- [109] Campbell, I.D. ve Dwek, R.A., (1984). *Biological spectroscopy*: Benjamin/Cummings Menlo Park, CA.
- [110] Greve, J., Puppels, G.J. and Otto, C. , (1999). *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions*, Boston, MA: Kluwer.
- [111] Hammes, G.G., (2005). *Spectroscopy for the biological sciences*: Wiley-Interscience.
- [112] AP, D., (1986). *Ultraviolet spectroscopy of proteins*, Heidelberg: Springer Verlag.
- [113] Righetti, P.G., (2007). "Biomacromolecules: Introduction to structure, Function and Informatics. By C. Stan Tsai", *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 1: 1333-1334.
- [114] Skoog, D.A. Holler, F. ve Nieman, T., (1992). *"Principles of Instrumental Analysis, 1998"*, Saunders College of Publishing, Philadelphia, London.
- [115] Sharma A., S.S.G., (1999). *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, New York.: John Wiley & Sons, Inc.

- [116] Budama Y., Karahan M., Mustafaeva Akdeste Z., (2010). "Moleküler Floresans Spektroskopisi ve Spektrofluorimetreler", Chemistry and Industry, 43.
- [117] İşcanı, B., (2007). Hepatit B yüzey antijeni 95-109 peptid dizisinin sentezi ve polielektrolitler ile suda çözünebilen biyokonjugatlarının geliştirilmesi, ed^eds. Biyomühendislik Bölümü. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [118] Nijkamp, F.P. ve Parnham, M.J., (2005). Principles of immunopharmacology: Birkhauser.
- [119] Wnek, G.E., Bowlin, G.L., , (2008). Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical engineering, Vanderbilt Avenue New York.
- [120] Loupy, A., (2006). Microwaves in Organic Synthesis, Weinheim: Wiley-Vch,.
- [121] Fischer, E., (2006). "Synthese von polypeptiden. XVII", Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 40: 1754-1767.
- [122] Kimmerlin, T., Seebach, D., (2005). "100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies", J. Peptide Res., 65: 229-260.
- [123] Jakubke, H.-D. ve Sewald, N., (2008). Peptides from A to Z: Wiley Online Library.
- [124] Atherton, E., Sheppard, R.C, (1989). Solid Phase Synthesis; A Practical Approach.
- [125] Merrifield, R., (1964). "Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin*", Biochemistry, 3: 1385-1390.
- [126] Merrifield, B., (1985). "Solid phase synthesis. Nobel lecture, 8 December 1984", Bioscience reports, 5: 353.
- [127] Carpino, L.A. ve Han, G.Y., (1972). "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group", The Journal of Organic Chemistry, 37: 3404-3409.
- [128] Eliel, E. Allinger, N. Angyal, S. ve Morrison, G., (1955). "Conformational Analysis, Interscience, New York, 1965", M. Hanack,'Conformation Theory,'Academic Press, New York.
- [129] Keçel, S., (2009). Pro-Tyr, Glu-Asn ve Ala-Gln Dipeptidlerinin Konformasyon Analizi ve Ab-Initio Dft Yöntemleri ile Titreşim Frekans Ve Kiplerinin İncelenmesi, ed^eds. Fizik Anabilim Dalı, Atom ve Molekül Fiziği Programı. İstanbul Üniversitesi.
- [130] Liu, W. Li, H. ve Chen, Y.-H., (2006). "N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication", FEMS Immunology & Medical Microbiology, 35: 141-146.
- [131] Zou, P. Liu, W. ve Chen, Y.-H., (2005). "The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection", International immunopharmacology, 5: 631-635.
- [132] Özdemir, Z.Ö., (2008). Sentetik Viral Peptidler Kullanılarak Polielektrolit Esaslı Biyokonjugatların Geliştirilmesi, ed^eds. FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [133] Uelzmann, H., (1958). "Copolymers of acrylic acid and N-vinylpyrrolidone-2", Journal of Polymer Science, 33: 377-379.
- [134] Kızılbey K. Mansuroglu B. Derman S. Budama Y. Mustafaeva, Z., (2009). "Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers", International Journal of Natural and Engineering Sciences, 3: 36-40.

- [135] Taylor, R., (1991). Protein Immobilization: Fundamentals and Applications, New York, NY: Marcel Dekker Inc.: .
- [136] Zhang, R., (2005). "Synthesis, characterization and reversible transport of thermo-sensitive carboxyl methyl dextran/poly (< i> N</i>-isopropylacrylamide) hydrogel", Polymer, 46: 2443-2451.
- [137] Betancor, L. López-Gallego, F. Hidalgo, A. Alonso-Morales, N. Fuentes, M. Fernández-Lafuente, R. ve Guisán, J.M., (2004). "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", Journal of biotechnology, 110: 201-207.
- [138] Altikatoglu, M. Arioz, C. Basaran, Y. ve Kuzu, H., (2009). "Stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran aldehyde against temperature and pH changes", Central European Journal of Chemistry, 7: 423-428.
- [139] Invitrogen, Molecular Probes, <http://molecularprobestechnologynetwork.community.invitrogen.com/docs/DOC-1051>, 17.01.2013
- [140] Sciencefic Psychic, Carbohydrates, <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html>, 13.11.2012
- [141] Friedli, G.-L., (1996). Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals, ed^eds.: University of Surrey.
- [142] Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., and Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", Biomaterials, 22: 2383-2392.
- [143] Khandare, J. ve Minko, T., (2006). "Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs", Progress in Polymer Science, 31: 359-397.
- [144] Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", J Immunol methods, 65: 55-63.
- [145] Alley, M.C. Scudiero, D.A. Monks, A. Hursey, M.L. Czerwinski, M.J. Fine, D.L. Abbott, B.J. Mayo, J.G. Shoemaker, R.H. ve Boyd, M.R., (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay", Cancer research, 48: 589-601.
- [146] Kirkpatrick, C.J. Peters, K. Hermanns, M. Bittinger, F. Krump-Konvalinkova, V. Fuchs, S. ve Unger, R.E., (2005). "In vitro methodologies to evaluate biocompatibility: status quo and perspective", Itbm-Rbm, 26: 192-199.
- [147] Pokalsky, C. Wick, P. Harms, E. Lytle, F.E. ve Van Etten, R.L., (1995). "Fluorescence resolution of the intrinsic tryptophan residues of bovine protein tyrosyl phosphatase", Journal of Biological Chemistry, 270: 3809-3815.
- [148] Çakır, R., (2008). Polimerlerin toksisitesinin incelenmesinde yeni kültür modelinin geliştirilmesi, ed^eds. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [149] Wu, P. ve Brand, L., (1994). "Resonance energy transfer: methods and applications", Analytical biochemistry, 218: 1.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Yasemin BUDAMA KILINÇ
Doğum Tarihi ve Yeri :18.10.1977/İstanbul
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :yaseminbudama@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Fizik	Yıldız Teknik Üniversitesi	1999
Lise	Dış Ticaret	İstanbul Ticaret Odası Ana. Tic. Mes. Lisesi	1995

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2005-	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2002-2005	İstanbul Tic. Odası Anadolu Tic. Meslek Lisesi	Fizik Öğretmenliği (Ücretli)
2003	Yıldız Teknik Üniversitesi	Öğrenci Asistanlık
2002	Yıldız Teknik Üniversitesi	Öğrenci Asistanlık
1999	TC MEB Asrın Dersanesi	Fizik Öğretmenliği (Stajyer)

YAYINLARI

- **Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**
 1. İscani Eroğlu B., **Budama Kılınç Y.**, Mustafaeva Z., Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry, Turkish Journal of Biochemistry, Issue 3, Vol. 36, pp. 222-229, 2011.
- **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**
 1. Kızılbey K., Mansuroglu B., Derman S., **Budama Y.**, Mustafaeva Akdeste Z. "Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers", International Journal of Natural and Engineering Sciences 3(2):36-40, 2009
- **Ulusal Hakemli Dergi**
 1. **Budama Y.**, Karahan M., Mustafaeva Akdeste Z., , Moleküler Floresans Spektroskopisi ve Spektrofluorimetreler, Chemistry and Industry , Issue 231, Vol. 43, 28-33,(2010).
 2. Karahan M., **Budama Y.**, Mustafaeva Akdeste Z., Metal İçeren Biyopolimer Sistemler, Chemistry and Industry , Issue 231, Vol. 43, 23-27, (2010).
- **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**
 1. **(SCI) Budama Kılınç Y.**, Eroğlu İşcanı, B., Mustafaeva Akdeste, Z., Investigation of Behavior of the Conjugates Between Antigenic Peptide from Influenza A Virus M2 Protein and Polyelectrolyte, 36th FEBS CONGRESS, (2011).
 2. **(SCI) Eroğlu İşcanı, B., Budama Kılınç Y.**, Mustafaeva Akdeste, Z., The Synthesis Of Bioconjugates Of Different Carrier Macromolecules With Amyloid Beta Peptides In Alzheimer Disease, 36th FEBS CONGRESS, (2011).
 3. **Budama Kılınç Y.**, Özçimen D., Mustafaeva Akdeste Z., The Characterization of Bovine Serum Albumin Using Capillary Electrophoretic and Spectrofluorimetric Methods, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).
 4. **Budama Kılınç Y.**, Özdemir Z.O., Karabulut E., Mustafaeva Akdeste Z.,, Characterization of Bioconjugates of Antigenic Peptide-Polyelectrolyte by Spectroscopic Methods, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).
 5. **Budama Kılınç Y.**, Özçimen D., Mustafaeva Akdeste Z., Applicability of Capillary Electrophoresis for Proteins and Peptides, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).

6. Eroğlu İşcanı B., **Budama Kılınç Y.**, Mustafaeva Akdeste Z., Determination of Bioconjugation Mechanism Between Hepatitis B Surface Antigenic Peptide and Different Polyelectrolytes Using Spectrophotometric Method, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).
7. **Budama Kılınç Y.**, Özçimen D., Mustafaeva Akdeste Z., A Comparison of Various Characterization Techniques for Gamaglobulin, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).
8. Eroğlu İşcanı B., **Budama Kılınç Y.**, Mustafaeva Akdeste Z., Conjugation of the Antigenic Peptide and Biopolymer and Investigation of Their Behaviour in Aqueous Solution and Organic Media by Using Fluorescence Method, 16th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2010).
9. **(SCI) Budama Y.**, Mustafaeva Z., Erçelen Ş., Demchenko A., Interaction of Bovine Serum Albumin-Polyelectrolyte Followed by A Novel Polarity Sensor, 34th FEBS, (2009).
10. **(SCI) Mustafaeva Z., Budama Y.**, Derman S., Fluorometric Definition of Primary Amines Based On Their Reaction with Fluorescamine, 34th FEBS, (2009).
11. **(SCI) Budama Y.**, Ozdemir Z.O., Topuzogullari M., Karabulut E., Mustafaeva Z., Fluorimetric investigation of polyelectrolyte influenza virus antigen conjugates, 34th FEBS, (2009).
12. **(SCI) Mustafaeva Z; Iscanı B., Ozdemir Z.O., Budama Y.**, Synthesis of Hepatitis B Surface Antigen Peptide Bioconjugates with Polyelectrolytes by Microwave Energy, 30 EPS, (2008).
13. **(SCI) Budama Y.**, Karabulut E., Ozdemir Z.O., Mustafaeva Z., Investigation of polyelectrolyte-antigenic peptide conjugates by fluorescence spectroscopy, 30 EPS, (2008).
14. **(SCI) Budama Y.**, Derman S., Mansuroğlu B., Mustafaeva Z., Determination of Binding Ratio of Hydrophobic Peptide-Polymer Conjugates by Using Fluorescamine Assay, 30 EPS, (2008).
15. **(SCI) Budama Y.**, Mustafaeva Z., The Study Of The Interaction Of Bovine Serum Albumin With Anionic Polyelectrolytes By Fluorescence Method, 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, (2008).
16. **(SCI) Mustafaeva Z., Budama Y.**, Ozdemir Z.O., The Fluorescence Study of Interaction between Bovine Serum Albumin and Polyelectrolyte, The 42nd IUPAC World Polymer Congress, Macro 2008, (2008).
17. **(SCI) Mansuroğlu B., Acar S., Budama Y.**, Kizilbey K., Mustafaeva Z., The Fluorescence Study Of Covalent Conjugation Of Peptide Epitops Of Foot-And-Mouth Disease Virus (FMDV) With Anionic Polyelectrolytes And Bovine Serum Albumin, 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, (2008).
18. **(SCI) Mustafaeva Z., Ozdemir Z.O., Karabulut E., Budama Y.**, Microwave assisted Polyelectrolytic bioconjugates of Hepatitis B surface antigenic polypeptides and their immunological properties, 30 EPS, (2008).

19. **Budama Y.**, Sarıçay Y., Mustafaeva Z., Analysis of Structure Difference of Water Soluble Complexes of Polyelectrolyte Interacting with Proteins By Fluorescence Method, 14th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2008).
20. Ozdemir Z.O., Topuzogullari M., Mansur B., Acar S., **Budama Y.**, Mustafaeva Z., Mustafaev M., Synthesis and Characterization of Viral Peptides and Their Biopolymer Conjugates for Developing New Synthetic Vaccines, 4th European Symposium on Biopolymers (ESBP 2007), (2007).
21. Acar S., Mansur B., Dalgakiran, E., Topuzogullari M., Akkılıç N., **Budama Y.**, Mustafaeva Z., Mustafaev M., Covalent Conjugation Of Synthetic Peptide Antigen Of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) to Globular Macromolecules, 4th European Symposium on Biopolymers (ESBP 2007), (2007).
22. **Budama Y.**, Mustafaeva Z., Mustafaev M., Comparative Studies Of Bovine Serum And Human Serum Albumin with Anionic Polyelectrolytes By Fluorescence Method, 4th European Symposium on Biopolymers (ESBP 2007), (2007).
23. Iscani B, Ozdemir Z.O., Topuzoğulları M., **Budama Y.**, Sarıçay Y., Akkılıç N., Mustafaeva Z., Mustafaev M., Chemical Synthesis of The Region of 95-109 of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Peptide and Bioconjugates with Polyelectrolytes by Using Microwave Method, 4th European Symposium on Biopolymers (ESBP 2007), (2007).
24. Akkılıç, N., **Budama Y.**, Çimen, N.S., Dalgakiran, E., Topuzoğulları, M., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., Development of nanoparticles based on polyanion-protein complexes, XII. International Biomedical Science and Technology Symposium, (2005).
25. Arslan, A., Akkılıç, N., Altıkatoğlu, M., **Budama Y.**, Karagöz, L., Öztolan, Ö., Öztürk, Y., Topuzoğulları, M., Kuzu, H., Mustafaev, M., Covalent complexes of enzymes with dextran and dextran sulphate, International Biomedical Science and Technology Symposium, (2005).
26. Mansour, B., Dalgakiran, E., Topuzoğulları, M., **Budama Y.**, Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., Bioconjugation of peptide antigens of foot-and-mouth diseases virus VP1 protein with synthetic polyanions in hydrated reverse micelle systems, XII. International Biomedical Science and Technology Symposium, (2005).

- **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. **Budama Kılınc, Y.**, Çakır Koç, R., Bağirova, M., Allahverdiyev, A., Mustafaeva, Z., Antijenik Influenza A Peptidinin Polielektrolitler ile Biyokonjugatlarının

Karakterizasyonu ve MCF 7 Hücreleri Üzerinde Toksisitesinin İncelenmesi (**Sözlü Sunum**), 24. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ, Vol. 24, Issue 1, pp. 49-49, (2012).

2. **Budama Kılınç, Y., Özdemir, Z.O., Mustafaeva Akdeste, Z., (Sözlü Sunum).** Sentetik Aşı Uygulama Amaçlı Geliştirilen Influenza A Virusu Hemagglutinin HA1 Peptidi İle Oluşturulan Biyokonjugatların Spektroskopik Karakterizasyonu, XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, (2011).
3. **Budama Kılınç, Y., Karahan, M., Tuğlu, S., Mustafaeva Akdeste, Z., Papain Enziminin Polielektrolitlerle Oluşturduğu Komplekslerin Spektroskopik Yöntemlerle İncelenmesi, XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, (2011).**

- **Projeler**

1. Sentetik Polimer-Peptid Konjugatlarının Üretimi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : BAP Başlangıç - Bitiş : 2010.10.01 – 2013.05.01
2. Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : BAP Başlangıç - Bitiş : 2011.05.01 – 2013.05.01
3. Tıbbi Biyosensör Üretimi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : BAP Başlangıç - Bitiş : 2007.04.01 – 2010.10.01.
4. Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01.
5. Biyopolimerler, Biyopolimer Sistemler ve Hidrojeller Üretimi Görevi: Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01
6. Polimerik Şap Aşısı Üretimi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01
7. İmmunojenik Biyopolimer-LDL Biyokonjugatların Geliştirilmesi ve Ateroskleroz Tedavisinde Uygulanması Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01
8. Embriyonik Kök Hücrelerinin Üretilmesi, Değişik Dokulara Farklılaştırılması ve Biyopolimerlerle Etkileşiminin İncelenmesi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01
9. Biyopolimerlerin ve Organik Antikemoteropatik Bileşenlerin Sitotoksik Etkilerinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında İncelenmesi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.08.01 – 2010.08.01
10. Aşı Uygulama Amaçlı Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.01.01 – 2007.12.01
11. Biyohibrid ve Biyotalitçi Polimer-Peptid Konjugatları Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.01.01 – 2007.12.01
12. Fonksiyonel Biyopolimer Sistemler Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2003.01.01 – 2006.12.01

- 13.** Diş restorasyon malzemelerinin Üretilmesi Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : DPT Başlangıç - Bitiş : 2004.01.01 – 2006.12.01
- 14.** Fonksiyonel Polimer-Peptid Konjugatları Görevi : Araştırmacı Destekleyen Kurum : BAP Başlangıç - Bitiş : 2003.04.01 – 2005.10.01

- **Ödülleri**

- 1.** Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Yayın Teşvik Ödülü, 2011.