

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

**ALZHEİMER AMİLOİD BETA PEPTİDİNE AİT FARKLI AMİNO ASİD
DİZİLERİNİN POLİELEKTROLİTLER İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ
İNCELENMESİ**

BAŞAK İŞCANI EROĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

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

İSTANBUL 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER AMİLOİD BETA PEPTİDİNE AİT FARKLI AMİNO ASİD
DİZİLERİNİN POLİELEKTROLİTLER İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ
İNCELENMESİ**

Başak İŞCANI EROĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 18.06.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Demir TIRYAKI

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ

İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Tez çalışmamın yapılmasının her aşamasında beni yönlendiren, desteği ile bana her konuda yardımcı olan, bugüne gelmemde emeği olan değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölümü Başkan Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste'ye, Şuanda aramızda olmasa da, engin bilgisi ve "öğretmenliği" ile bugünlere gelmem de bana büyük katkısı olan çok değerli bilim adamı ve hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafa Akdeste'ye,

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

Başım her sıkıştığında kapısını çaldığım ve bana her zaman hem engin bilgisi hem de içtenliği ile destek olan, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Hale Saybaşı'ya,

Toksiste deneylerim sırasındaki destekleri için, 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, Dekstran Aldehit eldesi çalışmalarında destek olan Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU'na ve Arş. Gör. Yeliz Başaran ELALMIŞ'a, Floresans ve Enerji Transferi çalışmalarındaki emekleri ve manevi destekleri için sevgili arkadaşım Yasemin Budama Kılınç'a, modelleme konusunda bilgi ve desteğiyle yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Serda KEÇEL GÜNDÜZ'e, sadece hücre deneylerindeki işbirliği ve desteği için değil, aynı zamanda hayatımın her evresinde yanımda olan, canım arkadaşım Leyla Türker Şener'e,

İş hayatı ile doktora arasında yaşadığım zorlukları, manevi desteği ile hafifleten sevgili müdürüm Melike YUMLU'ya,

Okul-iş hayatı ve özel hayat üçgeni arasında yaşadığım yoğunluklar, sorunlar ve sıkıldığım zamanlarda bana derya deniz gönlünü açan, beni yönlendiren, karanlıkta önümü görebilmem için ışık olan, sevgili öğretmenim Ayşe GÜREL'e,

Beni bugünlere kadar getirmek için çok büyük emekler veren, hayatta hep mutlu olmam için çalışan, doktora yapmam için hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bir evladın sahip olabileceği en büyük zenginlik - arkamdaki dağlar, biricik anneciğim ve babacığım Ayla İŞCANI ve Abdullah İŞCANI'na, her zaman koşulsuzca yanımda olan, varlıklarıyla hayatıma güç katan canım kardeşlerim Burcu İŞCANI GÖKDEMİR'e ve Begüm İŞCANI'na,

Sadece doktora süreci boyunca değil, hayatımın her anında, iyi günde-kötü günde her zaman destek olan ve bu tezi bitirmem için sabırla beni daima yüreklendiren, bitmeyen enerjisiyle hayatı birlikte daha yaşanabilir kılan sevgili eşim H. Barış EROĞLU'na,

Yaşamın bana en büyük armağanı, sonsuz ve sınırsız sevgi, "Pure Light", biricik oğlum Tuna EROĞLU'na,

Bana bütün bunları yaşama, deneyimleme ve başarabilme gücünü, enerjisini ve yaratıcılığını-ilhamını veren sevgili evrene,

Bu tez çalışmasına ve bana emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2014

Başak İŞCANI EROĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xx
ÖZET	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Alzheimer Hastalığı	5
2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	7
2.1.2 Alzheimer Hastalığının Dünya'da Yaygınlığı	7
2.1.3 Alzheimer Hastalığı Türleri	8
2.1.4 Alzheimer Hastalığının Evreleri	9
2.1.5 Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması	10
2.1.6 Amiloid β Peptid Oluşumu.....	11
2.1.7 Amiloidogenez ve Senil Plak Oluşumu	12
2.1.8 Tedavi Stratejileri.....	13
2.2 Alzheimer Hastalığı ve Aşı	16
2.2.1 Biyoteknolojik Aşılar	18
2.2.1.1 Amiloid- β Plaklarının Temizlenme Mekanizmaları ve İmmün Tedavisi	18
2.2.1.2 Aktif ya da Pasif Amiloid- β Bağışıklığı.....	19
2.3 Peptidler.....	20
2.3.1 Peptidler ve Peptid Bağı	21
2.3.2 Proteinlerin Yapısındaki Kovalent Olmayan Etkileşimler	22
2.3.2.1 Van der Waals Etkileşimleri.....	23
2.3.2.2 Hidrojen Bağları.....	23
2.3.2.3 Hidrofobik Etkileşimler	24

2.3.2.4 Elektrostatik (İyonik) Etkileşimler.....	24
2.3.2.5 Disülfid Bağları	25
2.4 Polimerler.....	25
2.4.1 Polielektrolitler	25
2.4.2 İmmünojen-Polielektrolit Komplekslerin Çalışma Prensipleri.....	26
2.4.3 Polielektrolitlerin Aşı Çalışmalarında Kullanımları	27
2.5 Çapraz Bağlanma Reaktifleri	29
2.5.1 Karbodiimidler	29
2.6 Bağışıklık Sisteminin Çalışma Prensibi	30
2.6.1 Lenfositler	30
2.6.1.1 T Lenfositler	31
2.6.1.2 B Lenfositler	31
 BÖLÜM 3	
MATERYEL ve METOD	32
3.1 Materyel.....	32
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	32
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	34
3.2 Metod	36
3.2.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	36
3.2.1.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	36
3.2.1.2 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)	38
3.2.1.3 Floresans Spektroskopisi	39
3.2.1.4 UV-VIS Spektroskopisi	42
3.2.1.5 Floresans Enerji Transferi Yöntemi İle Mesafe Hesabı	44
3.2.1.6 Modelleme Çalışmaları	44
3.2.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan Amiloid beta (A β) Peptid dizileri	45
3.2.2.1 Amiloid Beta (1-15) Peptid Dizisinin Kimyasal Özellikleri.....	46
3.2.2.2 Amiloid Beta (1-21) Peptid Dizisinin Kimyasal Özellikleri.....	48
3.2.3 Konjugasyonlarda Kullanılan Farklı Kimyasal Özelliklerdeki Taşıyıcı Makromoleküller	51
3.2.3.1 Polimerik Yapıdaki Taşıyıcılar	52
3.2.3.1.1 Poliakrilik Asit (PAA).....	52
3.2.3.1.2 N-Vinil-2-pirolidon/Akrilik Asit Kopolimeri	52
3.2.3.2 Protein Yapıdaki Taşıyıcılar	53
3.2.3.2.1 Bovine Serum Albumin (BSA).....	53
3.2.3.3 Polisakkarid Yapıdaki Taşıyıcılar	54
3.2.3.3.1 Dekstran Aldehid (DA)	54
 BÖLÜM 4	
DENEYSEL SONUÇLAR	55
4.1 Dekstran Aldehid Türevinin Eldesi	55
4.1.1 Sentezlenen DA Türevinin FTIR Analizi ile Karakterizasyonu	56
4.2 Konjugasyon Yöntemleri	56

4.2.1 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Karbodiimid (EDC) Varlığında Yapılan Konjugasyonlar	57
4.2.2 PAA ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları	58
4.2.2.1 A β (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	58
4.2.2.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar	59
4.2.2.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen PAA-A β (1-21) Peptid Konjugat..	65
4.3 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması	66
4.3.1 Analiz için Örnek Hazırlama	67
4.4 A β (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	70
4.4.1 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar	71
4.4.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen PAA-A β (1-15) Peptid Konjugatları	75
4.5 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması ve Örnek Hazırlanması	76
4.6 P(VP-co-AA) ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları	80
4.6.1 A β (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	80
4.6.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen VPAA-A β (1-21) Peptid konjugatları	81
4.6.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen VPAA-A β (1-21) Peptid Konjugatları	84
4.7 A β (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	88
4.7.1 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen VPAA-A β (1-15) Peptid konjugatları	89
4.7.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen VPAA-A β (1-15) Peptid Konjugatları	92
4.8 Bovine Serum Albumin (BSA) ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları	97
4.8.1 A β (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	97
4.8.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar	98
4.8.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen BSA-A β (1-21) Peptid Konjugatları	101
4.8.4 A β (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar	105
4.8.5 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Ab(1-15)-BSA Konjugatlar	106
4.8.6 Farklı Oranlarda Sentezlenen BSA-A β (1-15) Peptid Konjugatları	110
4.8.7 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması ve Örnek Hazırlanması	111
4.9 Dekstran Aldehid (DA) Biyokonjugatlarının Sentezi	114
4.9.1 A β (1-21) ve A β (1-15) Dizilerinin DA ile Konjugasyon Reaksiyonları...	115
4.10 Kompleks Oluşumu Yöntemi	122
4.10.1 Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid Dizilerinin PAA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması	122
4.10.2 Farklı koşullarda sentezlenen PAA Fiziksel Kompleksleri	123
4.10.3 Farklı oranlarda sentezlenen PAA Fiziksel Kompleksleri	125
4.10.4 Amiloid Beta (1-15) Peptid Dizisinin BSA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması	131
4.10.4.1 Farklı Koşullarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler	131
4.10.4.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler	134
4.10.5 Amiloid Beta (1-21) Peptid Dizisinin BSA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması	138
4.10.5.1 Farklı Koşullarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler	139
4.10.5.2 Farklı oranlarda sentezlenen fiziksel kompleksler	140
4.10.6 Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid Dizilerinin VPAA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması	144
4.10.6.1 Farklı koşullarda sentezlenen Amiloid Beta (1-15) / VPAA ve Amiloid Beta (1-21) / VPAA Fiziksel Kompleksleri	144

4.10.6.2 Farklı oranlarda sentezlenen Amiloid Beta (1-15) / VPAA ve Amiloid Beta(1-21) / VPAA Fiziksel Kompleksleri.....	147
4.11 Floresans Enerji Transferi Deneyleri ve Hesaplamaları	151
4.11.1 Floresans Enerji Transferi (FRET) Deneyi.....	151
4.11.2 Saf Peptid ve Biyokonjugatların Kuantum Verimlerinin Hesaplanması	156
4.11.3 Peptidin Kuantum Veriminin Hesaplanması.....	156
4.11.4 Biyokonjugatın Kuantum Veriminin Hesaplanması	157
4.11.5 Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi ile İntermoleküler Mesafe Hesabı.....	157
4.12 Modelleme Sonuçları.....	159
4.13 Hücre Deneyleri	166
4.13.1 MTT Deneyi.....	166
4.13.2 MCF 7 Hücrelerinin Kültürünün Yapılması	167
4.13.3 Amiloid B Peptidi (1-21) Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarının Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	167
4.13.4 Morfolojik İnceleme	168
4.13.5 Sentezlenen Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerin İnsan Kordon Toplardamar Endotel Hücreleri (HUVEC)'ndeki Etkilerinin xCELLienge System ile İncelenmesi.....	183

BÖLÜM 5

SONUÇ ve ÖNERİLER.....	192
5.1 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Tartışmalar	195
5.1.1 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Biyokonjugatları	195
5.1.1.1 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	195
5.1.1.2 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin BSA ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	197
5.1.1.3 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) (Mw=80000 Da) ile biyokonjugasyonuna ait Tartışma.....	200
5.1.1.4 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Dekstran Aldehid (DA) ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma.....	202
5.1.1.5 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin PAA ile sentezlenen Biyokonjugatlarının Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) ve Modelleme Sonuçlarına ait Tartışma	204
5.1.1.6 Hücre Kültürü Deneylerine ait Tartışma	210
5.1.1.6.1 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin PAA ile Sentezlenen Biyokonjugatlarının MCF-7 Hücre Kültüründe Yapılan Analizlerine ait Tartışma	210
5.1.1.6.2 Sentezlenen Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerinin İnsan Fibroblast Hücrelerindeki Etkilerinin xCELLienge System ile İncelenmesine ait Sonuçlar	213
5.1.2 Aβ (1-15) Peptid Dizisinin Biyokonjugatları	216

5.1.2.1 A β (1-15) Peptid Dizisinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	216
5.1.2.2 A β (1-15) Peptid Dizisinin BSA ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma	218
5.1.2.3 A β (1-15) Peptid Dizisinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) ile Biyokonjugasyonuna ait Tartışma.....	221
5.1.2.4 A β (1-15) Peptid Dizisinin Dekstran Aldehid (DA) ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma.....	223
5.1.2.4.1 Sentezlenen A β (1-15) Peptid Dizisinin Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerinin İnsan Fibroblast Hücrelerindeki Etkilerinin xCELLienge System ile İncelenmesine ait Sonuçlar	224
5.2 Kompleks Oluşumu Yöntemine Ait Tartışmalar	227
5.2.1 PAA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar	227
5.2.2 BSA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar	228
5.2.3 VPAA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar	229
KAYNAKLAR	231
ÖZGEÇMİŞ	246

SİMGE LİSTESİ

Bp	Baz çifti
c	Konsantrasyon
Ca	Kalsiyum
cm	santimetre
cm ²	santimetre kare
cm ⁻¹	Işınlar dalga sayıları
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
I	Geçen ışının şiddeti
I _o	Gelen ışının şiddeti
kDa	kilo dalton
k	Absorpsiyon katsayısı
kJ	Kilo Joule
M	molar
Mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
NAC	N-asetil sistein
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaHB ₄	Sodyum Bor Hidrür
NaHCO ₃	Sodyum Hidrojen Karbonat
NaN ₃	Sodyum azid
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₂	amino
nm	nanometre
α	alfa
β	beta
γ	gama
μ	mü
μg	mikrogram
μl	mikrolitre
μm	mikrometre
°C	santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

¹³ C	Karbon-13 izotopu
Aβ	Amiloid beta
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AA	Akrilik asid
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AChE	Asetilkolin
AH	Alzheimer Hastalığı
Ala	Alanin
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Arg	Arjinin
Asp	Aspartik asit
Aβ	amiloid beta
BSA	Bovin Serum Albumin
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
ChAT	Kolin asetiltransferaz
ChE	Kolinesteraz
COOH	Karboksil
Cpep	Peptid konsantrasyonu
Cpol	Polimer konsantrasyonu
CTF	Karbon uç parçası
DA	Dekstran Aldehit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNC	Dansil Klorür
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
FAD	Ailesel AH
FRET	floresans rezonans enerji transferi
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
GBD	Global Burden Disease
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik Asit
Gly	Glisin
GPC	Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi
H ₃ BO ₃	Borik Asid
HCl	Hidroklorik asit
His	Histidin
HPLC	High-performance liquid chromatography
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
Ig	İmmünoglobulin
IgE	İmmünoglobulin E

IL-4	İnterlökin 4
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
m _A	Molekül Ağırlığı
MCF 7	Michigan Cancer Foundation-7
mM	Mili Molar
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
Mw	Molekül ağırlığı
N ₂	Azot gazı
O ₂	Oksijen Gazı
NA	Avagadro sayısı
NIPAA	Poli-N-isopropilakrilamit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların
OVA	Ovalbumin
P(VP-co-AA)	Polivinil pirilidon
PAA	Poliakrilik Asit
PAB	periferal anyonik bölgesi
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Sentetik polielektrolitler
pH	Power of Hydrogen
Phe	Fenilalanin
pI	izoelektrik nokta
PS1	Presenilin 1
PS2	presenilin 2
SAD	sporadik tip
Ser	Serin
SH	sülfidril
S-S	disülfid bağı
T	geçirgenlik
Th-1	T helper-1
Th-2	T helper-2
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultra Viole
UV-VIS	Ultra Viole- Görünür Bölge
Val	Valin
VP	Poli-N-vinilprolidon
VP-AA	Polivinilpirilidon-Poliakrilikasit

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Alzheimer Hastalığı'nda nöron yapısı	5
Şekil 2.2 Alois Alzheimer ve Augusta Deter	7
Şekil 2.3 Tau Hipotezi	10
Şekil 2.4 Amiloid şelala hipotezi	11
Şekil 2.5 Alzheimer hastalığındaki ve normal durumdaki nöron görünüşleri	15
Şekil 2.6 Üstte, aşılınmamış doku örneğindeki plak görülürken, altta, aşılınmış fare dokusunda plak görünmemektedir	17
Şekil 2.7 Aktif ve pasif İmmünizasyon	19
Şekil 2.8 Aktif İmmünizasyon ve Pasif transfer mekanizmaları	20
Şekil 3.1 HPLC sistemi şeması	36
Şekil 3.2 Maddelerin alıkonma zamanına göre kolondan çıkışları	37
Şekil 3.3 Kolon kromatografisi	38
Şekil 3.4 Doğadaki floresans özellikli aromatik amino asitler: triptofan, Tirozin, Fenilalanin	40
Şekil 3.5 Dalgaboyu ve görünür bölge diyagramı	42
Şekil 3.6 Aminoasitlerin absorpsiyon verdiği dalga boyları grafikleri	42
Şekil 3.7 Spektrofotometre prensibi	43
Şekil 3.8 P1 peptidinin hidrofilitik ve hidrofobik amino asit içeriğinin şematik gösterimi	46
Şekil 3.9 Aβ peptidi 1-21 peptidinin hidrofilitik ve hidrofobik amino asit içeriğinin şematik gösterimi	49
Şekil 3.10 Amino asitlerin konjuge baz reaksiyonu	51
Şekil 3.11 Poliakrilik asidin molekül formülü	52
Şekil 3.12 Vinil piridon-akrilik asit kopolimerinin molekül formülü	52
Şekil 3.13 BAS'nın 3 boyutlu yapısı	53
Şekil 4.1 Dekstran Aldehid türevinin eldesi	55
Şekil 4.2 Dekstran ve sentezlenen dekstran aldehite ait FTIR spektrumları	56
Şekil 4.3 Biyokonjugasyonun oluşum mekanizması	57
Şekil 4.4 EDC ile aktive edilmiş PAA çözeltisinin PES membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi	59
Şekil 4.5 Koşul1'e göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması	60
Şekil 4.6 Koşul2'ye göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması	61
Şekil 4.7 Koşul 3'e göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması	62
Şekil 4.8 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ(1-21) peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği	63

Şekil 4.9	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC grafiği .	63
Şekil 4.10	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının; (a) RI dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) Serbest peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait SEC kromatogramları.	65
Şekil 4.11	Peptid-PAA konjugatlarının saflaştırılması.....	66
Şekil 4.12	HPLC ve GPC için kullanılan vialler Sentezlenen konjugatların PES filtrelerden viallere filtrasyonu.....	67
Şekil 4.13	A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ve tek başına polimer ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı.	67
Şekil 4.14	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları:....	68
Şekil 4.15	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının (a) RI dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) Serbest peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait SEC kromatogramları.	69
Şekil 4.16	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının serbest peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı. .	70
Şekil 4.17	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği.....	72
Şekil 4.18	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC grafiği.....	72
Şekil 4.19	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının serbest peptid ile kıyaslamalı; (a) UV, (b) Işık saçılması (RALS)ve (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.....	74
Şekil 4.20	A β (1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve PAA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı.....	74
Şekil 4.21	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatının UV spektrofotometre ile absorban ölçümü	75
Şekil 4.22	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC Spektrumları.....	77
Şekil 4.23	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	78
Şekil 4.24	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının PAA ile kıyaslamalı; (a) RI dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) Işık saçılması (RALS) ait dedektörüne SEC kromatogramları.....	80
Şekil 4.25	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin [P(VP-ko-AA)] (Mw=80.000 Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	82
Şekil 4.26	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin [P(VP-ko-AA)] kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramları:	83

Şekil 4.27	Farklı reksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları.	84
Şekil 4.28	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	86
Şekil 4.29	A β (1-21) peptidinin VPAA ile farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı.	86
Şekil 4.30	A β peptidi(1-21)-VPAA Konjugatlarına ait UV Absorbansları	87
Şekil 4.31	Farklı reksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları.	88
Şekil 4.32	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin [P(VP-ko-AA)] (Mw=80.000 Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları:.....	90
Şekil 4.33	Farklı reksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	92
Şekil 4.34	A β (1-15) peptidinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve VPAA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı.	94
Şekil 4.35	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	94
Şekil 4.36	A β (1-15) peptidinin VPAA ile farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı.	95
Şekil 4.37	Farklı bağlanma oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	96
Şekil 4.38	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	99
Şekil 4.39	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Ab (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının koşula bağlı absorbans değişimi grafiği.	100
Şekil 4.40	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı.	100
Şekil 4.41	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları...	102
Şekil 4.42	A β (1-21) peptidinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve BSA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı.	103
Şekil 4.43	Farklı bağlanma oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	104
Şekil 4.44	A β (1-21) peptidinin BSA ile farklı bağlanma oranlarında sentezlenen biyokonjugatına ait HPLC kromatogramları.....	105
Şekil 4.45	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	107

Şekil 4.46	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı.	108
Şekil 4.47	Farklı koşullarda sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	109
Şekil 4.48	A β (1-15) peptidinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve BSA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı.	111
Şekil 4.49	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları...	112
Şekil 4.50	Gösterilen yöntem uygulanarak, A β peptidinin (1-15) dizisinin BSA ile olan n=3, 5, 7, 9, 11 mol oranlarında sentezlenen konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.	112
Şekil 4.51	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının (a) UV dedektörüne, (b) RI dedektörüne, (c) Işık saçılması (RALS)dedektörüne ait SEC kromatogramları.....	114
Şekil 4.52	A β (1-21) Peptidi/DA konjugatının eldesi.	115
Şekil 4.53	A β Peptidi/Dekstran Aldehid konjugasyonunda takip edilen aşamaların akış şeması	117
Şekil 4.54	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin DA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları...	118
Şekil 4.55	Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidinin Dekstran Aldehid ile ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.	118
Şekil 4.56	Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	119
Şekil 4.57	Ab (1-15) Peptidi/ DA konjugatları UV Absorpsiyonu	120
Şekil 4.58	Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-15) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği.	120
Şekil 4.59	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin DA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları...	121
Şekil 4.60	Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-15) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları.	122
Şekil 4.61	A β (1-21) ve (1-15) Peptid dizilerinin PAA ile komplekslerinin sentezinde takip edilen aşamaların akış şeması	123
Şekil 4.62	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları	124
Şekil 4.63	EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları	125
Şekil 4.64	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	126
Şekil 4.65	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	127
Şekil 4.66	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin kıyaslamalı HPLC kromatogramları	127

Şekil 4.67	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin (a) RI dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) UV dedektörüne ait SEC kromatogramları.	129
Şekil 4.68	A β (1-15) peptidinin PAA ile Fiziksel Komplekslerine ait analiz sonuçları	129
Şekil 4.69	Farklı nPeptid/nPAA oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile fiziksel komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	131
Şekil 4.70	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidi-BSA komplekslerinin floresans grafiği	133
Şekil 4.71	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile fiziksel komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne ait SEC kromatogramları.	134
Şekil 4.72	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.....	136
Şekil 4.73	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile komplekslerinin kıyaslamalı HPLC kromatogramları.	136
Şekil 4.74	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları.	138
Şekil 4.75	Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidi-BSA komplekslerinin floresans grafiği	140
Şekil 4.76	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları	141
Şekil 4.77	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile Komplekslerinin (a) UV dedektörüne, (b) RI dedektörüne, (c) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları.	143
Şekil 4.78	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile komplekslerine ait HPLC kromatogramları.	145
Şekil 4.79	Farklı nPeptid/nVPAA oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları	145
Şekil 4.80	Farklı nPeptid/nVPAA oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları	146
Şekil 4.81	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları	148
Şekil 4.82	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları.	149
Şekil 4.83	Farklı nPeptid/nBSA oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne ait SEC kromatogramları	150
Şekil 4.84	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA kopolimeri ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği	151
Şekil 4.85	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin enerji transeferi bölgesine ait şematik gösterim.....	151
Şekil 4.86	Dansil Klorür (DNC)'ün molekül formülünün şematik gösterimi	152
Şekil 4.87	DNC'nin Amiloid β (1-21)-PAA biyokonjugatındaki 17. aminoasit olan Lizin'den bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi.....	152

Şekil 4.88	Amiloid β (1-21) peptid dizisine ait absorpsiyon spektrumu.....	153
Şekil 4.89	DNC'e ait absorpsiyon spektrumu.	154
Şekil 4.90	DNC'e ait emisyon spektrumu.	154
Şekil 4.91	Donörün emisyon spektrumu ile akseptörün absorpsiyon spektrumlarının overlap grafiği.....	155
Şekil 4.92	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin DNC ile titrasyon spektrumu.	155
Şekil 4.93	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatının DNC ile titrasyon spektrumu.	156
Şekil 4.94	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin moleküler yapısı	160
Şekil 4.95	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin β –sheet yapısında optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi	161
Şekil 4.96	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklenmesi ve optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.....	162
Şekil 4.97	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklenmesi ve optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.....	163
Şekil 4.98	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten ve optimizasyonundan önceki geometrisinin modellemesi	164
Şekil 4.99	Amiloid β (1-21) peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten ve optimizasyonundan sonraki geometrisinin modellemesi	165
Şekil 4.100	MTT'nin Formazan'a dönüşümü.....	166
Şekil 4.101	Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinde 24 saatlik inkubasyonu sonucu oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi	169
Şekil 4.102	Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından npeptid/nPAA=3'ün farklı konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi..	171
Şekil 4.103	Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından npeptid/nPAA=3 konsantrasyonuna maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu	174
Şekil 4.104	MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=3'ün farklı konsantrasyonlarındaki absorbans değerine bağlı grafiği	175
Şekil 4.105	MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=3 konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği.....	175
Şekil 4.106	Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından npeptid/nPAA=11'in farklı konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi..	178
Şekil 4.107	Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından npeptid/nPAA=11 konsantrasyonuna maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu	181
Şekil 4.108	MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=11 konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği.....	181
Şekil 4.109	MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=11'in farklı konsantrasyonlarındaki absorbans değerine bağlı grafiği	182
Şekil 4.110	Poliakrilik asitin 0.1-5-10-15 mg/ml konsantrasyonlarında toksisitesi....	182
Şekil 4.111	xCELLienge Sistemine ait 96 kuyucuklu e Plate 96	185
Şekil 4.112	Hücre yokluğunda ve varlığında elektrodun elektrik empedansındaki değişim	186
Şekil 4.113	Kontrol grubuna ait kuyucukların hücre indeksinin analizi.	187

Şekil 4.114	A β (1-21) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına BSA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	188
Şekil 4.115	A β (1-21) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına PAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	188
Şekil 4.116	A β (1-21) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına VPAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	189
Şekil 4.117	A β (1-15) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına BSA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	189
Şekil 4.118	A β (1-15) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına PAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	190
Şekil 4.119	A β (1-15) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatlarının farklı nPeptid/nPAA derecelerindeki biyokonjugatlarının, tek başına PAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.	190
Şekil 4.120	A β (1-15) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına VPAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi.....	191
Şekil 5.1	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği	196
Şekil 5.2	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	198
Şekil 5.3	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	201
Şekil 5.4	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin DA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	203
Şekil 5.5	A β (1-21) peptid dizisinin optimizasyon öncesindeki, optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi	206
Şekil 5.6	A β (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki, optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	208
Şekil 5.7	A β (1-21) peptid dizisinin Akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten sonra optimizasyon öncesindeki, optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi.	209
Şekil 5.8	A β (1-21) peptidinin PAA ile sentezlenen n=3 konjugatının MCF7 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	211
Şekil 5.9	A β (1-21) peptidinin PAA ile sentezlenen n=11 konjugatının MCF7 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	211
Şekil 5.10	A β (1-21) peptidinin, BSA, PAA, VPAA örnekleri ile yapılan analizler sonucunda hücre sayılarındaki değişimlerin yüzde olarak kıyaslamalı grafiği.	215

Şekil 5.11	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	217
Şekil 5.12	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	219
Şekil 5.13	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	221
Şekil 5.14	Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin DA ile biyokonjugasyonunda biyokonjugat ve bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.	223
Şekil 5.15	A β (1-21) peptidinin PSA, VPAA, BSA örnekleri ile yapılan analizler sonucunda hücre sayılarındaki değişimlerin yüzde olarak kıyaslamalı grafiği.....	226

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Alzheimer Hastalığının evreleri	9
Çizelge 2.2 Alzheimer Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	16
Çizelge 3.1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri	33
Çizelge 3.2 Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninin soğurma, floresans dalgaboyu değerleri	40
Çizelge 3.3 Aβ (1-15) Dizisinin Genel Özellikleri.....	46
Çizelge 3.4 Aβ (1-21) Dizisinin Genel Özellikleri.....	48
Çizelge 4.1 Farklı nPeptid/nPAA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	67
Çizelge 4.2 Farklı nPeptid/nPAA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	77
Çizelge 4.3 Farklı nPeptid/nVPAA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	86
Çizelge 4.4 Farklı nPeptid/nVPAA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	94
Çizelge 4.5 Farklı nPeptid/nBSA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	102
Çizelge 4.6 Farklı nPeptid/nBSA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	111
Çizelge 4.7 Farklı n (1-15) Peptidi/nDA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	117
Çizelge 4.8 Farklı n (1-21) Peptidi /nDA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları	117
Çizelge 4.9 Farklı nPeptid/nPAA Oranlarında Sentezlenen Fiziksel Komplekte Kullanılan Peptid Miktarları	126
Çizelge 4.10 Farklı nPeptid/nBSA Oranlarında Sentezlenen Fiziksel Komplekslerde Kullanılan Peptid Miktarları.....	136
Çizelge 4.11 Farklı nPeptid/nBSA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları.....	143
Çizelge 4.12 Farklı nPeptid/nVPAA Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları.....	147
Çizelge 4.13 Farklı nPeptid/nPAA konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerinin canlılık oranları	183

**ALZHEİMER AMİLOİD BETA PEPTİDİNE AİT FARKLI AMİNO ASİD
DİZİLERİNİN POLİELEKTROLİTLER İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ
İNCELENMESİ**

Başak İŞCANI EROĞLU

Biyomühendislik Bölümü

Doktora Tezi

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

Amiloid terimi, özellikle son yıllarda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bunun en önemli sebebi, Alzheimer hastalığına neden olan en önemli etkenlerden birinin amiloid beta birikimlerinin meydana gelmesidir. Alzheimer hastalığı, yanlış katlanmış olan Amiloid Beta peptidlerinin beyinde plaklar şeklinde birikim oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Bu plaklar genellikle 39-43 amino asitten oluşan ve amiloid beta (A β) denen küçük peptid dizilerinden oluşmaktadır. A β çok daha büyük bir protein olan ve amiloid öncül protein (APP) olarak bilinen daha büyük bir proteinin çeşitli enzimlerle parçalanması sonucu meydana gelir. Sonuç olarak oluşan A β peptid fragmentleri sinir hücrelerinin dışında birikerek senil plaklar denilen yapıları oluştururlar. Bu tez çalışmasında, çağımızın en önemli hastalıklarından biri olarak görülen Alzheimer hastalığına ait peptid bazlı aşı modeli, tanı kiti geliştirilmesi gibi alanlarda kullanılabilecek biyolojik aktiviteye sahip peptid- makromolekül biyokonjugatları ve fiziksel kompleksleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Amiloid beta (A β) peptidinin antijenik özellikteki 2 farklı amino asit dizisi ticari olarak satın alınmıştır. Her iki peptid dizisi ayrı ayrı 4 farklı taşıyıcı makromoleküle farklı mekanizmalar ve bağlanma dereceleri ile hem kovalent olarak bağlanmış, hem de bu taşıyıcılar ile fiziksel kompleksleri elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan taşıyıcı makromoleküller şunlardır: Poliakrilik asit (PAA), [Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilikasit) veya VPAA], Dekstran aldehit (DA) ve Bovin Serum Albumin (BSA)'dir. Bu taşıyıcı moleküllerden PAA ve BSA ticari olarak alınmış olup, VPAA ve DA ise bölümümüzde sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Her iki peptid dizisinin de amino ucuna Triptofan amino asidi eklenerek bu peptidlere floresans özellik kazandırılmıştır. Böylelikle peptidlerin ve daha sonra sentezlenen biyokonjugatların floresans spektrofotometre cihazı ile incelenmesine olanak sağlanmıştır. Sentezlenen bütün biyokonjugat ve komplekslerin fizikokimyasal yapıları incelenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Biyokonjugat ve komplekslerin oluşumu, farklı spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, sulu çözeltide karbodiimid

varlığında kovalent bağlar ile oluşan biyokonjugatların daha verimli ve güçlü bağlandığı görülmüştür. Konjugasyon reaksiyonunun oluşumu sırasında floresans boya kullanılarak Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi yardımı ile; intermoleküler mesafe hesabı yapıp, biyokonjugattaki donör ve akseptör arasındaki mesafe hesabı ile elde edilen bilgiler, saf peptidin konformasyonu ve biyokonjugat oluşumu durumunda peptidin konformasyonundaki değişimler hesaplanmış ve sayısal değerlerle de ifade edilmiştir. Ayrıca literatürde ilk kez Trp içeren Amiloid beta (1-21) 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. Sentetik aşı modeli olarak tasarladığımız Amiloid beta (A β) peptidinin-taşıyıcı makromolekül biyokonjugatları için; in vivo uygulamalarda kullanılan düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen biyokonjugatların özellikle düşük dozlarında önemli derecede toksik bir etki göstermediği ortaya konulmuştur. Ayrıca bu biyokonjugatlarla yapılan MTT deneyleri ile hücre canlılık oranları da kontrol edilerek, IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Tez kapsamında hücre kültürü ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, her iki peptid dizisine ait farklı konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan fiziksel kompleksler ve biyokonjugatlar, tek başına taşıyıcı makromoleküller ve tek başına peptid dizileri, işaretleme gerektirmeden, 72 saat boyunca gerçek zamanlı (real-time) ölçüm alan yeni bir yöntem olan XCELLienge Sistemi ile İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) hücrelerine uygulanmış ve bu maddelerin hücrelerin çoğalma hızına etkileri ve toksik etkileri incelenmiştir. Biyokonjugat ve fiziksel kompleksin HUVEC üzerindeki etkileri kıyaslandığında ise, özellikle kovalent bağla bağlanmış olan biyokonjugatların hücre çoğalması üzerinde önemli bir negatif etkisinin olmadığı görülmüş ve hem MCF-7 ile hemde HUVEC ile yapılan hücre çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ile de biyokonjugatların deney hayvanları üzerinde kullanabilirliği ortaya konulmuştur. Böylece bu tez kapsamında sentezlenen konjugatların A β 'nın Alzheimer hastalığına karşı spesifik antikorlarının elde edilmesi, nanobiyosensörlerinin oluşturulması, tanı kitlerinin ve biyoteknolojik aşılarının geliştirilmesine ışık tutacak bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Amiloid beta peptidi, Alzheimer, biyoteknolojik aşılar, biyokonjugat, kovalent konjugasyon, adjuvant, karbodiimid, toksisite

ABSTRACT

INVESTIGATING CONJUGATION REACTIONS BETWEEN DIFFERENT ALZHEIMER'S AMYLOID BETA PEPTIDE SEQUENCES WITH POLYELECTROLYTES

Başak İŞCANI EROĞLU

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Term of amyloid has become an important subject of study in the scientific world especially in recent years. The most significant reason for this is the fact that one of the most important factors causing Alzheimer disease is formation of amyloid beta accumulations. Alzheimer disease is resulted from misfolded amyloid beta peptides forming accumulation in the brain in the form of plaques. Such plaques are made up of small peptide sequences consisting of 39-43 amino acids that are referred to as amyloid beta ($A\beta$). $A\beta$ is formed through cleavage of a bigger protein, which is known as amyloid precursor protein, with the help of various enzymes. The resulted $A\beta$ peptide fragments are deposited outside neurons to create structures, which are called as senile plaques. The object of this thesis study is to develop peptide-macromolecule bioconjugates and physical complexes having biological activity that can be used in the fields like development of a peptide-based vaccine or diagnostic kit etc for Alzheimer disease, which is considered as one of the most important diseases of our era. 2 different amino acid sequences of amyloid beta peptide ($A\beta$) with antigenic feature were purchased commercially. Both of the peptide sequences were joined in 4 different carrier macromolecules covalently separately through different mechanisms and at different degrees and furthermore, their physical complexes with these carriers were obtained. Macromolecules used in this study are: Polyacrylic acid (PAA), [Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) or VPAA], Dextran aldehyde (DA) and Bovine Serum Albumin (BSA). PAA and BSA of these carriers were purchased commercially while VPAA and DA were synthesized and characterized in our department. Both of the peptide sequences were equipped with tryptophan amino acid at the amino terminal to make them fluorescent to allow examining the peptides and the bioconjugates to be synthesized under a fluorescent spectrophotometer. Physicochemical nature of all synthesized bioconjugates and complexes were

investigated and they were characterized. Formation of bioconjugates and complexes was enlightened through different spectroscopic and chromatographic methods. Comparing the produced results, it was observed that the bioconjugates, which had been produced through covalent bonds in aqueous solution in presence of carbodiimide, had been attached through more efficient and stronger links. Fluorescent stain was used during occurrence of conjugation reaction for calculating intermolecular distance with the help of Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) method and the data produced from calculation of distance between the donor and the acceptor was used to calculation of conformation of the pure peptide and variations in conformation of the peptide during formation of the bioconjugate and they were quantitatively expressed. Furthermore, an amyloid beta (1-21) peptide sequence containing Trp was modeled for the first time in the literature, and its optimized geometry in which it had the minimum energy was identified through the molecular mechanical method. It was justified that numeric values, which were produced based on experimental data through FRET method, were consistent with those, which were calculated theoretically. For the amyloid beta (A β) peptide's carrier macromolecule bioconjugates that we designed as a model of synthetic vaccine, it was evidenced that the produced bioconjugates did not demonstrate a significant toxic effect especially at lower doses according to the studies, which were conducted on MCF-7 cells at lower concentrations used in in-vitro applications. Furthermore, IC₅₀ values were calculated by checking cell vitality ratios through the MTT tests conducted with these bioconjugates. On the other hand, in another study included in the thesis conducted with the cell culture, the physical complexes and bioconjugates, which had been synthesized from both of the peptide sequences at different concentrations, the carrier molecules alone and the peptide sequences alone were administered to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) through the XCELLienge System, which is a new method taking real time measurements for 72 hours with no need for marking, to investigate these matters' effect on cell proliferation rate and their toxic effects. Comparing effect of the bioconjugate and that of the physical complex on HUVECs, it was observed that there was no significant adverse effect of especially the bioconjugates, which were joined through covalent bonds, on cell proliferation and furthermore, usability of the bioconjugates on lab animals was displayed through the data obtained by cell studies conducted on both of MCF-7 and HUVEC. Thus, this is a study enlightening producing antibodies specific to Alzheimer disease, designing nano-biosensors and development of diagnostic kits and biotechnological vaccines including A β conjugates, which were synthesized under the scope of this thesis study.

Key words: Amyloid beta peptide, Alzheimer, biotechnological vaccines, bioconjugate, covalent conjugation, adjuvant, carbodiimide, toxicity

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İlk kez 1854 yılında Alman bilim adamı Rudolph Virchow tarafından ortaya atılan “amiloid” terimi, özellikle son yıllarda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir [1]. Bunun şüphesiz en önemli sebebi, Alzheimer hastalığı gibi günümüzün en yaygın hastalıklarından birinde amiloid patojenezinin görülüyor olmasıdır. Amiloid, çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatlarıdır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözünemeyen bir yapıdır. Amiloid birikimi gerçekleşen dokuda, hücreler arası iletişimin bozulmasından dolayı, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku ya da organ işlev göremez hale gelmektedir [2]. Amiloid birikiminin önlenmesi için, bugün yeni tedavilerin geliştirilmesi çalışmaları tüm dünyada hızla sürdürülmektedir. Alzheimer hastalığı, yanlış katlanmış olan Amiloid Beta peptidlerinin beyinde plaklar şeklinde birikim oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Bu plaklar genellikle 39-43 amino asitten oluşan ve amiloid beta ($A\beta$) denilen küçük peptid dizilerinden oluşmaktadır. $A\beta$ çok daha büyük bir protein olan ve amiloid öncül protein (APP) olarak bilinen daha büyük bir proteinin çeşitli enzimlerle parçalanması sonucu meydana gelir ve bu mekanizma henüz tam aydınlatılamamıştır. Sonuç olarak oluşan $A\beta$ peptid fragmentleri sinir hücrelerinin dışında birikerek senil plaklar denilen yapıları oluştururlar [3].

Yüz yıldan fazla zaman önce Louis Pasteur'un klasik aşılarının temellerini atmasının ardından, Penisilin'in 1928'de üretilmesi ile biyoteknolojik yöntemle aşı ve ilaç üretimine de başlanılmış oldu. İmmununoloji ve biyoteknolojide yaşanan gelişmeler, aşı teknolojisinin de gelişmesine önemli katkılarda bulunmuştur. Geliştirilen yeni nesil aşılar, sadece enfeksiyonlara karşı koruyucu amaçla değil, aynı zamanda hastalığın önlenmesinde tedavi amaçlı olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, yeni bir yaklaşım olarak hastalığa neden olan antijenin tamamı ile immunizasyon yerine, sentetik olarak elde edilen ve antijenin spesifik bir bölgesini oluşturan peptid yapıdaki aşılar geliştirilmeye başlandı. Kuvvetli bir immün yanıt oluşturabilmek için aşı çalışmalarında antijen olarak kullanılacak peptid vb. özellikteki molekül, adjuvant adı verilen taşıyıcı sistemler ile canlı sisteme verilmektedir. Adjuvantlar antikor oluşturmeyen birer immün uyarıcıdır. Yani düşük konsantrasyondaki antijenik bir maddenin, parçalanmadan vücutta daha uzun süre kalmasını böylece de hem daha yüksek antikor cevabı oluşması hem de immün sistemin daha uzun süre uyarılmasına yardımcı olurlar [4]. Doğal ve sentetik makromoleküllerin konjugatları, tıp ve biyoteknoloji alanlarında, ilaç salınımı ve enzimlerin stabilizasyonu gibi alanlarda gittikçe artan bir öneme sahiptir. Sentetik polielektrolitler (PE), kovalent bağlanma aracılığıyla proteinlerin modifikasyonları, antijenik proteinlerin immunolojenliklerinin artırılması ve/veya azaltılması ve in vivo stabilitelerinin ve vücutta kalma sürelerinin artırılması gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır [5], [6], [7]. Bu tür polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bununla beraber yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitler (PE), negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen polimerler, polibazlar, poliasitler ve bunların kopolimerleri, bu kopolimerler monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak benzer adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) göstermektedirler [8], [9], [10], [11], [12]. Aşı çalışmalarında kullanılan sentetik peptidler, bölgeye özgü antikorların oluşturulmasında oldukça ilgi çekici bir öneme sahiptir ve en büyük avantajları, herhangi bir enfekte edici maddeye ihtiyaç duymaksızın güvenilir olmaları, aynı zamanda da kimyasal olarak tamamen tanımlanabilmeleridir. Ayrıca sentetik peptid aşıları toksik değildir ve daha ucuzdurlar [13].

Bu tez çalışmasında Alzheimer Hastalığına ait Amiloid beta peptidinin A β (1-15) ve A β (1-21) olmak üzere iki farklı dizisi kullanılmıştır. Bu peptid dizileri, adjuvant özelliği olduğu düşünülen dört farklı taşıyıcı makro molekül olan;

- Poliakrilik Asit (PAA) (Mw: 100000 Da)
- Polivinil pirilidon [P(VP-co-AA)] (Mw:80000 Da)
- Dekstran Aldehit (DA) (Mw:75000 Da) ve
- Bovin Serum Albumin (BSA) ile konjuge edilmiştir.

Amiloid beta peptid dizilerinin bu taşıyıcı makromoleküller ile 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. 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. A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının biyouyumluluğunun ve toksisitelerinin incelenmesi amacıyla, 2 farklı konsantrasyonda antijen içeren biyokonjugat MCF 7 hücrelerine verilerek MTT yöntemi ile sitotoksik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca her iki peptid dizisi kullanılarak sentezlenen farklı konsantrasyonlardaki biyokonjugatlar ve fiziksel kompleksler, insan fibroblast hücrelerinde XCELLienge (Roche) sisteminde gerçek zamanlı olarak analiz edilmiştir. Bu analizde örnekler İnsan Umbilikal Ven Epitel Hücrelerine 72 saat boyunca maruz bırakılmış ve hücrelerinin canlılıkları ve çoğalma hızlarındaki değişimler gerçek zamanlı olarak bu 72 saat boyunca ölçülmüştür.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, çağımızın en önemli hastalıklarından biri olarak görülen Alzheimer Hastalığına (AH) ait antijenik özellikteki A β (1-15) ve A β (1-21) peptid dizilerinin, daha yüksek immün yanıt almak üzere adjuvant özellik gösterecek olan 4 farklı taşıyıcı makromoleküle kovalent konjugasyon ve fiziksel kompleks oluşumu gibi farklı metodlar yardımıyla bağlanmasıyla biyolojik aktiviteye sahip moleküller elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen farklı yapıdaki biyokonjugat ve fiziksel komplekslerin, AH'nın tedavisinde peptid bazlı yeni nesil aşı modeli olarak kullanılması hedeflenmektedir.

Bu amaçla, sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerin öncelikle çeşitli biyolojik hücresel sistemlerde toksik etki gösterip göstermediğinin ve doz çalışmalarının araştırılması ile elde edilen sonuçların ileride yapılacak olan hayvan denemelerine ışık tutması hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında, Amiloid beta peptidine ait 2 farklı antijenik özellikteki peptid dizisinin farklı taşıyıcı makromoleküller ile biyokonjugatlarının ve komplekslerinin sentezlenmesi ile elde edilen preparatlar kullanılarak, ilerleyen çalışmalarımızda gerçekleştireceğimiz hayvan deneylerinde, Alzheimer hastalığına karşı spesifik antikorların elde edilmesi, yüksek immün yanıtların oluşumunu sağlaması, böylece Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilecek peptid bazlı bir aşı modeli geliştirilmesi beklenmektedir. Sentezlenen peptid-taşıyıcı makromolekül biyokonjugatları ve fiziksel kompleksleri ile yapılan hücre deneyleri çalışmaları sayesinde belirlenen toksisite dozları ile, daha sonraki hayvan deneyi çalışmalarında yapılacak fazladan analizleri, maliyeti ve hayvan ziyanını önleyecektir. Bu çalışma ülkemiz ve dünyada çok önemli bir hastalık olan Alzheimer'a yönelik bir tedavi geliştirilmesine yardımcı olacak yeni nesil peptid bazlı aşılardan ve tanı kitlerinin üretilmesine zemin hazırlayacaktır. Bu nedenle sunulan bu tez çalışması, kimya, biyomühendislik ve biyofizik gibi hem teorik hem de pratik temel bilimlerin araştırma alanlarını kapsayan, multidisipliner bir çalışmadır.

2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer, bir beyin hastalığı [14]; beyindeki hücrelerin zamanla, yavaş yavaş ölmesi sonucu ortaya çıkar. Hastalığın kesin sebebi bilinmemektedir. Alzheimer hastalığı (AH), en sık karşılaşılan *demans* çeşitlerinden biridir. Diğer sık karşılaşılan *demans* çeşitleri arasında, beyni besleyen kan miktarının azalmasına neden olan büyük veya çok sayıda küçük inmeler sonucu oluşan vasküler (damarsal) *demans*, nörodejeneratif hastalıklara bağlı *Frontotemporal demans* vb. gibi *demans* hastalıkları bulunmaktadır. Fakat en sık rastlanılan *demans*, Alzheimer'dır. "Alzheimer hastalığı, beyin hücrelerinde hasara neden olarak, hafıza kaybı ile çalışma hayatı, hobiler ve sosyal ilişkilerde bozulmaya yol açar. Alzheimer hastalığı, günlük yaşam pratiklerini gerçekleştirme becerisini bozmakla birlikte, bellek ve bilişsel işlevleri yıkıma uğratan bir bunama hastalığıdır. AH'da klinik bulgular, yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkar. Başlangıçtan ölüme kadar olan süreçte yaşanan bilinç değişiklikleri açık bir şekilde görülür.



Şekil 2.1 Alzheimer Hastalığı'nda nöron yapısı [15]

AH'de özellikle yeni öğrenilen olaylarla ilişkili -epizodik- bellek kaybedilir. Hastalığa bellek kaybı ile birlikte psikiyatrik bozukluklar da eşlik eder; kişilik, duygu-durum değişimi, şizofreniye benzer tablolar görülür. Tüm AH'lilerin yüzde 50'sinde değişik derecelerde bilinç dalgalanmalarına neden olan varsanımlar tespit edilmiştir. Hastalık ilerledikçe, hasta kendi hastalık durumunu ayırt edemez ve içinde bulunduğu durumu reddetmeye başlar. İşlevsel bozulmalarının farkında olmazlar, kendi yetersizliklerini görme içgörülerini kaybolur. İçgörü kaybı, beyin ön bölgelerinde kan akımında düşme ile bağlantılıdır. AH'de farkındalıkta azalma, "önbeyin-yerine getirme" testlerindeki yetersizlikle doğru orantılıdır. Bilinçli farkındalıktaki azalma; davranışsal bozukluklar ve içsel durum göstergeleri arasındaki ilişkiyi izleme yeteneğinin bozulmaya başladığını gösterir [16]. Alzheimer hastalığı bazı beyin hücrelerinin ölümüne neden olan, kesin nedenleri bilinmeyen nörolojik bir hastalıktır. Klinik olarak incelendiğinde Alzheimer, bilişsel ve işlevsel düzeyde ilerleyici bir kötüleşme ve hafıza ile diğer entelektüel faaliyetlerde belirgin bozulma olarak karşımıza çıkar. Konuşma bozuklukları başlar; ya az konuşur ya da konuşsa bile söylediği şeyler anlamsızdır. Motor işlevleri korunuyor olmasına rağmen motor etkinliklerini yerine getiremez; eli, kolu vücudu sağlam olmasına rağmen yemek, tamirat, örgü gibi işleri yapamamaya başlar. Duyu işlevleri yerinde olduğu halde, objeleri tanıyamaz; yani gördüğü ve duyduğu şeyleri ve söylenilenleri anlayamaz ve eşyaların ne işe yaradığını bilemez. Planlama, organizasyon, dikkati odaklama, zaman ve mekân oryantasyonu, kavrama gibi işlevleri bozulmaya başlar; hasta önceden başarıyla yaptığı işleri zaman içinde yapamaz. Parasını idare edemez, evin temizliği ve düzenine artık dikkat etmemeye başlar. Zaman içinde yaşanan bu değişim, kişinin sosyal ve mesleki yaşamını etkiler. Hastalığın en ileri evresinde Alzheimer hastası tam bağımlı bir hale gelir. Beslenme, temizlik, tuvalet ancak bir kişinin yardımıyla mümkün olur. Hastanın üzerindeki etkisinin son derece güçlü olan bu hastalığın hastanın yakınları ve bakıcıların üzerinde de etkisi büyüktür. [3].

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı, Alman psikiyatristi ve nöropatoloğu olan Alois Alzheimer (14 Haziran 1864 – Aralık 1915) tarafından bulunmuştur. Alzheimeri ilk olarak “*presenil dementia*” vakası ile ilgili çalışmasını yayınlamış ve bu hastalık daha sonra psikiyatrist Emil Kraepelin tarafından “*Alzheimer hastalığı*” olarak tanımlanmıştır. Kocasının fark ettiği garip davranış bozukları ve kısa süreli hafıza kaybı olan 51 yaşındaki Auguste Deter kocası tarafından Alois Alzheimer’ın Frankfurt’ta çalıştığı hastaneye bırakılır. Alois Alzheimer, Nisan 1906’da Deter ölünce, hastanın dosyasını ve otopsi için beynini Münih’e, halen çalıştığı Kraepelin’in laboratuvarına getirtir. Burada yeni boyama teknikleri ile hastanın beyinde “amiloid” plakları ve “nörofibriler yumakları” gözlemler. Daha sonra hastalığın patolojisini ve klinik semptomlarını ilk kez Kasım 1906’da kongrede sunmuştur [17].



Alois Alzheimer (1864-1915)



Agusta Deter (1850-1906)

Şekil 2.2 Alois Alzheimer ve Agusta Deter

2.1.2 Alzheimer Hastalığının Dünyadaki Yaygınlığı

AH, genellikle ileri yaştaki kişilerde görülmekle birlikte kırk gibi genç yaşlarda başladığını gösteren veriler de bulunmaktadır. AH, sanayileşmiş ülkelerde ekonomik, sosyal ve tıbbi yönden giderek artan boyutlarda bir yük oluşturmaktadır. 1980 ve 1990 yılları arasında Avrupa’da yürütülmüş çalışmalar sonucunda, 60-69 yaşlarında arasında hastalığın görülme sıklığı % 0.3 iken, 70-79 yaşları arasında bu oran % 10.8’e çıkmaktadır. Japonya’da AH ikinci sırada gelmektedir; *demans* popülasyonun yüzde 42’sinde gözlenmekte ve bu nedenle de hastalık bu ülkede yaşanan en sık *demans* nedenidir. ABD’de yapılan istatistikler, AH’nın 65 yaş üstündeki 4 milyon kişiyi veya bu yaş üstü popülasyonun % 10’unu etkilediğini göstermektedir. ABD’de elli yıl sonra

devrim yaratacak bilimsel gelişmeler olmaması halinde, AH'nın görülme sıklığı dörde katlanmış olacak. 2050 yılında AH hastası sayısının 8.64 milyona ulaşması beklenmekte ve her 45 Amerikalıdan birinin *demans*lı olacağı tahmin edilmektedir [18]. 2012 yılı Dünya Alzheimer Raporu'na göre, *demans*ın, 2010 yılında tüm dünyada 36 milyon kişiyi etkilediğini göstermiş, 2030'da bu rakamın 65.7 milyona çıkacağı ve 2050'de 115.4 milyon kişinin bu hastalıktan etkileneceği tahmin edilmiştir [19]. 2012 Dünya Alzheimer Raporu'ndan alınan bilgilere göre; hastalığın erken evrelerinde yapılan tanı ve tedavilerin, hastalar üzerinde olumlu etkileri ve yararları olduğunu göstermektedir. Buna karşılık demanslı hastalardan sadece 4'te birine tanı koyulduğu, geriye kalan 4'te 3'ne ise tanı konulmadığı için gerekli tedavi ve bakımı yaptıramadığı bildirilmiştir [19].

2.1.3 Alzheimer Hastalığının Türleri

AH'nın hastalığının başlıca iki temel alt tipi tanımlanmıştır. Ailesel AH (FAD) olarak tanımlanan tip genellikle daha az görülmekte ve erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır [20]. FAD patogenezinde 3 genin etken olduğu bildirilmektedir [21]:

- 21. kromozomdaki APP (Amiloid Prekürsör Protein) genindeki Mutasyonlar
- 14. kromozomdaki presenilin 1 (PS1) genindeki mutasyonlar
- Kromozomdaki presenilin 2 (PS2) genindeki mutasyonlar

APP genindeki mutasyonların amiloid aggregasyonunda temel neden olduğu bilinmekte; PS1 ve PS2 mutasyonları ise APP'nin proteolitik işlenmesinde artışa neden olarak hastalığın agresif formu olan FAD gelişimini hızlandırmaktadır.

Hastalığın tanımlanmış diğer bir alt tipi olan sporadik tip (SAD), hastalığın en yaygın görülen formu olup hastaların %90'nını etkilemektedir. Belirtilerin genellikle 65 yaş üstü ortaya çıkabildiği ve 85 yaş üstü popülasyonun %50'sinin bu hastalığa yakalanma ihtimali olduğu bildirilmektedir. Bu hastalığın patogenezinde herhangi bir genetik mutasyonunun etkisi olduğu bildirilmemekle birlikte SAD'de ApoE geni sıklıkla araştırılmaktadır. Allellerden ApoE4 geninde mutasyonun varlığı hastalığın erken ortaya çıkışında belirleyici olmadığı halde bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir [22],[20].

2.1.4 Alzheimer Hastalığının Evreleri

Barry ve Reisberg'e göre Alzheimer hastalığının klinik özelliklerinin hastalık evrelerine bağlı olarak ortaya çıkışı ve evrelerin tahmini süresi şöyledir:

Çizelge 2.1. Alzheimer Hastalığının evreleri [23]

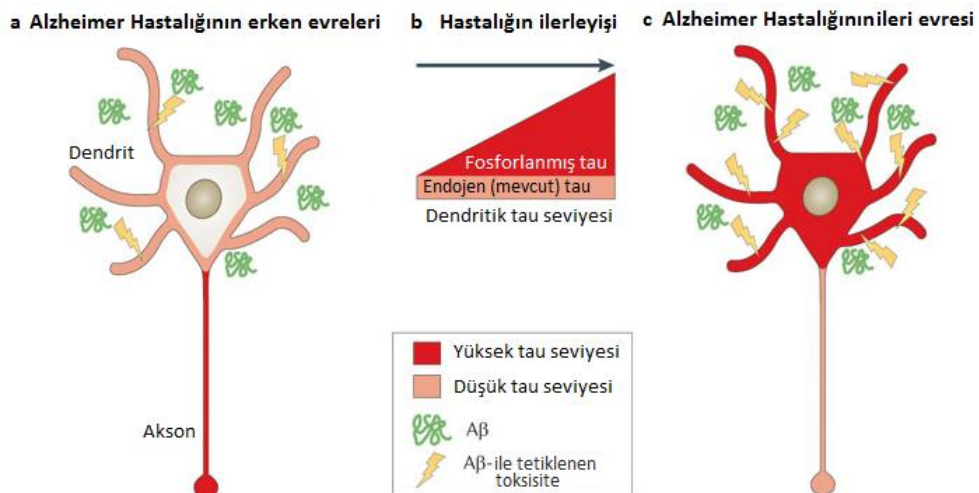
EVRE	KLİNİK ÖZELLİK	SÜRESİ
Evre 1	Nesnel ve öznel bilişsel eksiklik bulgusu yoktur.	
Evre 2	Bilişsel yetersizlikler hakkında öznel yakınmalar vardır: isimleri hatırlayamama, nesneleri koydukları yerleri bulamama gibi.	
Evre 3	Karmaşık mesleki ve sosyal görevlerde çok az nesnel kayıplar olur. Fazla tanımadığı yerlerde kaybolabilir, istekli olduğu bir işte performansı azalır, kelime ve isim bulma konusunda belirgin zorlanabilir, açık bir şekilde ne söylediğini unutur ve tekrarlanmalara gerek duyar. Bu dönemde bilişsel kayıpla ilişkili kaygılar yoğunlaşır.	7 yıl
Evre 4 (Hafif)	Yoğunlaşma, bellek, yönelim ve işlevsel kapasitede belirgin bozulmalar olur. Yakın bellekte ciddi etkilenme olur. Sosyal ve mesleki işlevlerinde önemli aksamalar olur.	2-4 yıl
Evre 5 (Orta)	Karşılaşılan güçlükler hastanın yardım almadan yaşamını sürdürmesini önleyecek kadar fazladır. Yaşamları hakkında önemli konuları hatırlayamazlar. Oturdukları adres, bitirdikleri okulun adı, başbakanın adı gibi. Bulundukları yılı hatırlayamazlar. Hesaplamada önemli güçlük çekerler. Depresyon ve öfke atakları olabilir.	1,5 yıl
Evre 6 (Orta derecede şiddetli)	Günlük yaşamın temel etkinliklerinde yardım gerekir. Eşlerinin adını unut urlar, adres bilmezler. Yaşamlarının erken dönemlerini anımsayabilirler (doğum yeri, anne-baba isimleri). 10'dan geriye birer birer saymada güçlük çekerler. Ajitasyon, öfke ve fiziksel şiddet gösterebilirler.	2,5 yıl
Evre 7 (Ağır)	Günlük etkinliklerde sürekli yardım gerekir. Konuşma yetisi sınırlanmaya başlar ve evre sonunda doğru kaybolur. Hareket ortadan kalkar. Saldırgan ve kontrol edilemez davranışlar olabilir.	3-6 yıl

2.1.5 Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması

Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve patogenezinin açıklanmasında üç temel hipotez öne sürülmektedir [20].

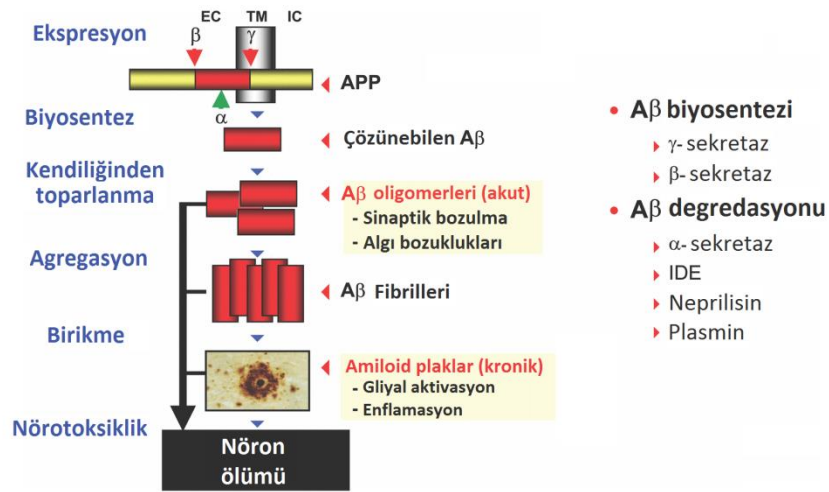
- **Kolinerjik Hipotez:** Öne sürülen hipotezlerden en eskisidir. AH'nın önemli bir nörotransmitter olan asetikolinin azalması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında bazal ön beyinde kolinerjik nöronlarda dejenerasyon; serebral kortekste kolinerjik reseptörlerde ve kolin asetiltransferaz (ChAT) düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmaktadır. Daha önce sürdürülen tedavi yaklaşımlarının birçoğu bu hipoteze dayandırılmakla birlikte, klinik araştırmalar asetilkolin düzeylerini yükseltmeye yönelik tedavi stratejilerinin yalnızca semptomatik iyileşme sağladığı ancak hastalığın gelişimi ve tedavisinde etkili olmadığını ortaya çıkarmıştır [20],[24],[25],[26]. Bununla birlikte, bu hipoteze dayanan yeni yaklaşımlarda kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımının beta-amiloid peptid agregasyonunu etkileyebileceği yönünde bulgular bulunmaktadır [27].

- **Tau Hipotezi:** Alzheimer hastalığında, mikrotübülle ilişkili protein ailesinin bir üyesi olup tübül stabilitesini sağlayan Tau proteinlerinin hiperfosforile olması sonucu yapıların bozularak intranöronal fibriller ağlar meydana getirdiği bildirilmektedir. Bu oluşumların intraselüler transport sistemine ve sinyal iletimine zarar vererek AH gelişimini hızlandırdığı ve nöronal ölüme yol açtığı öne sürülmektedir [28], [29], [30].



Şekil 2.3 Tau Hipotezi [31]

• **Amiloid Şelale Hipotezi:** 1991 yılında öne sürülen hipotez, AH'da A β birikimlerinin birincil etken olduğunu bildirmektedir. Bu modele göre, AH'da beyinde APP'nin üretimi sonrası meydana gelen türevlerinin yapımı, agregasyonu, depolanması ve toksisitesi ile tetiklenip birbiri ardına ilerleyen bir dizi nörodejeneratif olay söz konusudur [32],[33],[34] ve bu hipotez moleküler genetik, nöropatolojik ve biyokimyasal çalışmalar ile de desteklenmiştir [35],[36]. Bu hipotezde, AH'da beyin belli bölgelerinde birikerek çözünmez fibriller meydana getiren beta-amiloid (A β) proteinlerinin daha sonra senil plaklar oluşturarak sinir hücrelerini hasara uğrattığı, bu hücrelerin birbirleri ile olan bağlantılarını koparıp nörotransmitter miktarını azalttığı öne sürülmektedir [35].



Şekil 2.4 Amiloid şelale hipotezi [37]

2.1.6 Amiloid β Peptid Oluşumu

APP bir transmembran protein olup, santral sinir sistemi nöronlarını da içeren birçok hücrede eksprese edilmektedir. Alzheimer hastalığında karakteristik olan amiloid fibrillerinin, APP'in proteolitik yıkım ürünleri olan A β 1-42 ve A β 1-40'den türediği bilinmektedir. AH patogenezinde A β -peptidin polimerizasyonunun önemi bilinmekte ve polimerize A β oluşumunun artışı ile AH riskinin artışı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır [35]. Monomerik A β normal metabolizma esnasında oluşmaktadır ve nöronlar üzerinde belirgin bir etki yapmamaktadır [38]. Ancak patolojik durumda A β 'nin kendi kendine bir araya gelerek daha büyük oligomerik fibriller bir yapıya

dönüştüğü ve amiloid fibriller halinde nöritik plakların yapısına katılarak nöral toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir [39]. APP iki ayrı mekanizma ile A β yapımını etkilemektedir. α -sekretaz ile non-amiloidojenik kırılmaya uğrayan APP, çözünür yapıdaki sAPP α formuna dönüşmektedir. Proteininin membranda bağlı olan ve C-terminal parçası olarak adlandırılan C83 fragmanı bu işlemle ayrılmaktadır. γ -sekretaz ile gerçekleşen ikinci kırılma, küçük p3 peptidlerinin hücre dışına salınması ve APP'nin sitoplazmik kuyruğunun (AICD) hücre içine girişiyle sonuçlanmaktadır. AICD hücre içine girdikten sonra bir transkripsiyonel aktivatör gibi davranarak diğer sinyal iletim mekanizmalarını etkilemektedir. Amiloidojenik kırılma ise, β -sekretaz etkisi ile başlamakta ve sAPP β oluşmaktadır. Bu patolojik kırılmanın γ -sekretaz kaynaklı devam eden sürecinde sırasıyla 40 ve 42 aminosaitlik peptidler olan A β 40 ve A β 42 oluşmaktadır [40].

2.1.7 Amiloidogenez ve Senil Plak Oluşumu

Fizyolojik şartlarda ve derişimlerde A β parçacıkları şaperon destekli bir katlanmayla yeni bir şekil almaktadırlar. Bu olağan formlarında peptidler, beyinomurilik sıvısı ve kanda rahatça hareket edebildikleri ve hidroliz edilebilecekleri suda çözünür formlarında bulunmaktadırlar [41]. A β parçacıklarının üretiminin artması sonucu, bazı parçacıkların bu şaperon destekli sistemden sızarak patolojik oluşumlara yöneldiği bildirilmektedir. Bu durumlarda parçacıkların aminoasit dizilimlerine bağlı olarak ikincil yapılanmalar oluşmakta ve bu yapılar bir su kılıfıyla kaplanmaktadır. İşte bu oluşumlar biyokimyasal ve immünolojik ataklara dayanıklı amiloidleri meydana getirmektedir [20]. Bu oluşumlardan CmA β β -tabakalardan oluşan ve hidrofobik kısımlarca zengin bir yapılanma türüdür. CmA β derişiminin kritik düzeylere ulaşmasının amiloidozis için bir öncül olduğu bildirilmektedir. Bu yapılanmaların en iyi bilinenlerinden biri de “*prion*”lardır [20]. Alzheimer hastalarının beyinlerinde 3 tip A β birikintileri olduğu bulunmuştur [42]:

- Senil plakların öncülleri olduğu bildirilen “*diffüz plaklar*” amorf, yarı küresel, yoğunluğu az olan birikintilerdir. Bu oluşumlarda A β non-amiloid agregatlar olarak bulunmaktadır. Bu oluşumların normal yaşlanma sürecinde de bulunabileceği bildirilmektedir.

- “*Senil plak*” ya da “*nöritik plak*” olarak adlandırılan ve amiloid çekirdek içeren küresel oluşumlar patolojik oluşumlardır. Aksonal iletilerdeki bozulmalar gibi sorunların bu plaklar kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Bu plaklardaki ana bileşen A β (1–42)’dir.
- “*Serebrovasküler amiloid*” AH’da her zaman ortaya çıkmayan birikim türüdür. Bu durumlarda A β peptidlerin serebral kan damarlarında biriktiği bildirilmektedir.

2.1.8 Tedavi Stratejileri

AH oluşumunun biyolojik mekanizmasının son derece karmaşık oluşu ve hastalığın nöropatolojisinde birçok faktörün yer alması, AH oluşumunun engellenmesi, hastalığın seyrinin yavaşlatılması ve tedavisinde değişik stratejilerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır [43].

• A β fibril oluşumu, agregasyonu ve nörotoksitesinin engellenmesine yönelik tedavi stratejileri:

AH patogeneğinde A β -peptid birikiminin temel olması nedeniyle, tedavi stratejileri içerisinde içinde en popüler olanı A β amiloid fibril oluşumunun inhibe edilmesidir. A β miktarının kontrol edilmesindeki ilk düzenleyici basamak, APP sentezinin kontrol edilmesidir. Düzenlemenin ikinci basamağını ise, α ve β sekretaz aktivitelerinin kontrolü oluşturmaktadır. β -sekretaz aktivitesinin baskılanması, amiloid oluşumuna neden olan peptidlerin oluşumunu azaltmakta; böylece A β peptidinin oluşumu büyük ölçüde önlenmektedir [20],[40]. Benzer şekilde, prosesin α -sekretaz yönüne kaydırılmasının da, patolojinin önlenmesinde bir yöntem olabileceği bildirilmektedir. Boddapati ve arkadaşları, hücre kültürlerinde β -sekretaz aktivitesini inhibe ederek APP intraselüler ve ekstraselüler A β seviyelerinin %50 azaldığını rapor etmektedirler [44]. Sekretaz inhibitörlerinin kullanımının A β oluşumunu azaltarak etkin terapötik hedefler olduğu bildirilmektedir [40]. Presenilinler (PS1 ve PS2), APP’nin katalitik yolla parçalanmasından sorumlu olan gama sekretaz (γ -sekretaz) enzimlerinin alt bileşenlerini oluşturan transmembran proteinlerdir. Presenilinlerin γ -sekretaz aktivitesinden bağımsız olarak endoplazmik retikulumda bozulmuş Ca²⁺ sinyal iletiminde de görev aldığı bildirilmektedir. AH’da da presenilin genlerindeki

mutasyonlarının A β (1-40)'a göre daha amiloidojenik bir peptid fragmenti olan A β (1-42)'nin artışına neden olduğu ve hastalıktaki bozuk Ca metabolizması ile ilişkisi bulunduğu düşünülmektedir. [45].

•Kolinesteraz inhibitörleri:

Bu tip ilaçlar, AH'da bozulan sinir iletimini düzeltmeyi amaçlayan semptomatik tedaviye yönelik bileşiklerdir. AH'de asetilkolinin kortikal aktivitesi düşük olduğundan sinaptik boşluktaki asetilkolinin yıkımından sorumlu olan asetilkolinesterazlar (AChE), başlıca ilaç hedefini oluşturmakta ve Takrin, Donepezil, Rivastigmin ve Galantamin gibi AChE inhibitörlerinin AH'da sinirsel iletiyi düzelttiği gösterilmektedir. Kullanılan inhibitörlerden ilk kuşak inhibitör olan Takrinin hepatotoksik etkileri olduğu; daha sonra geliştirilen Donepezil ve Galantaminin daha sıklıkla kullanıldığı bildirilmektedir [46]. Kolinesteraz (ChE) inhibitörlerinin Alzheimer tedavisinde, iki yönlü etksinin olduğu kabul edilebilmektedirler. Enzimin periferik anyonik bölgesini (PAB) hedef alan inhibitörler, etkilerini hem kolinerjik sistemde hem de bu bölgeden kaynaklı olarak gelişebilen A β agregasyonunu engellemek yoluyla göstermektedirler. Alzheimer tedavisinde kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımına, tanı yapıldıktan sonra başlanmakta ve doz hastanın ilacı tolerans kapasitesine göre belirlenmektedir. Tedavi süresi genellikle 3-6 ay arasında değişmektedir [42].

•Antioksidan bileşikler:

AH hastalığında beyinde oksidatif stresin varlığı bilinmektedir. A β agregatlarının doğrudan hücre membranına girerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve mitokondriyal elektron taşıma sisteminde kaçakların meydana geldiği bildirilmektedir [46]. Pocernich ve arkadaşları, glutatyon seviyelerinin N-asetil sistein (NAC) yardımıyla artırılmasına yönelik yaptıkları çalışmalarda NAC'nin ve glutatyonun APP gen transkripsiyonunu azalttığını, A β fibrilasyonuna uğramış nöronal hücre kültürlerinde NAC uygulanması ile apoptotik yolların yavaşladığını bildirmektedirler [47]. Yapılan birçok çalışma, oksidatif hasarın diğer birçok hastalıkta olduğu gibi Alzheimer hastalığının patogeneğinde de önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu hastalıkların alternatif tedavisi nöroprotektif veya antioksidan maddeler yardımıyla nöronların

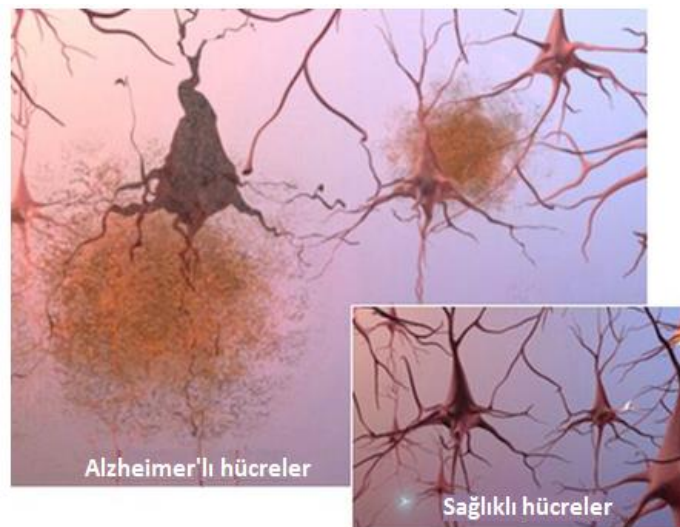
dejenerasyonunu azaltmak veya önlemek şeklinde olabilmektedir. E ve C vitaminleri, ubikinon, lipoik asit, beta-karoten, melatonin, curcumin gibi doğal antioksidanların ve bazı NAC içeren sentetik antioksidanların AH'da koruyucu ve nörodejenerasyonu durdurucu etkisi olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır [48].

•Anti-inflamatuar bileşikler:

Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAIDs) uzun dönem kullanımının AH riskini azalttığı bildirilmektedir. Etkilerinin amiloidojenik form olan A β (1–42) derişimlerini azaltmak yoluyla olabileceği ve AH'da gözlenen davranışsal bozuklukları düzelttiği rapor edilmiştir [49].

•Diğer yaklaşımlar

İnsulin parçalayıcı enzimin; laminin, rifampisin gibi β -tabaka bozucu kimyasalların; kolesterol düşürücü statinlerin A β agregasyonunu azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [46]. Tau proteini ve mikrotübül yapısının bozulmasını engelleyen stabilizatörler kullanılmasının hastalığın patogenizinde etkisi olabileceği bildirilmektedir [29]. A β antikorları kullanılarak aşılama çalışmalarının faz I düzeylerinde iyi tolere edilmekle birlikte, faz II seviyelerinde hastalarda meningoensefalit geliştiği görülmüştür. IL-4 adjuvant kullanılarak geliştirilen yeni bir DNA aşısının ise, farelerde denenmesi ile A β oluşumu ve agregasyonun azaldığı gösterilmiştir [50],[51].



Şekil 2.5 Alzheimer hastalığındaki ve normal durumdaki nöron görünimleri

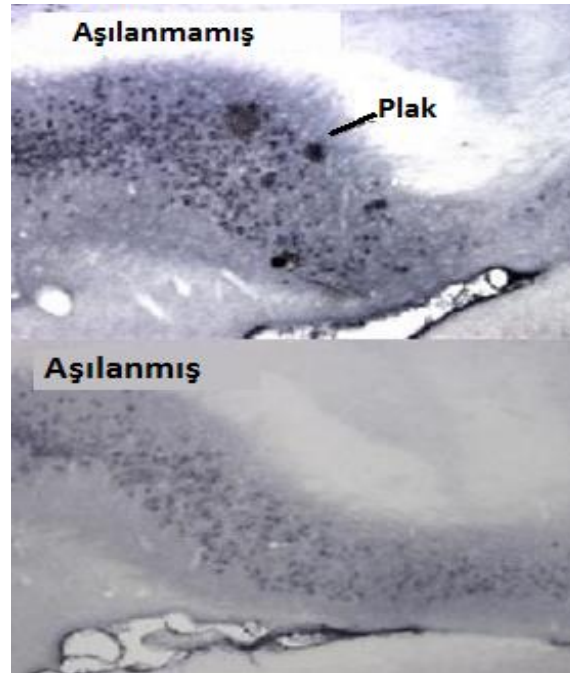
Çizelge 2.2. Alzheimer Tedavisinde Kullanılan İlaçlar [52]

İLAÇ İSMİ	ENDİKASYON	ETKİ	DOZ
Donepezil Ticari isim :Aricept	Hafif ve şiddetli AD	Asetilkolinesterazı inhibe ederek Asetilkolin'in düşüşüne karşı koruyucu. AD'nin bilişsel semptomlarının tedavisinde	5 mg günlük
Galantamine Ticari ismi: Razadyne	Hafif ve orta şiddetli AD	Asetilkolinin düşüşüne karşı koruyucu ve asetilkolin salgılanması için reseptörleri stimüle edici. AD'nin bilişsel semptomlarının tedavisinde	Günde 2 defa 4 mg
Rivastigmine Ticari isim: Exelon	Hafif ve orta şiddetli AD	Asetilkolini parçalayan enzimleri inhibe ederek asetilkolin düşüşünü önlemektedir. AD'nin bilişsel semptomlarının tedavisinde	Günde iki defa 1.5 mg
Memantine Ticari isim: Namenda	Orta ve şiddetli AD	Glutamaterjik reseptörleri bloke ederek, glutamat etkinliğini düzenlemektedir. AD'nin bilişsel semptomlarının tedavisinde	Günde 5 mg

2.2 Alzheimer Hastalığı ve Aşı

Alzheimer hastalığı patolojik olarak serebral amiloid β ($A\beta$) birikimi, nöritik plaklar, gliosis, nöron kaybı ve nörofibril düğümleri ile karakterize edilmektedir [53]. $A\beta$, Alzheimer hastalığının patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır [54]. Alzheimer hastalığı için geliştirebilecek terapilerin; $A\beta$ üretimini baskılamak, bozunmasını arttırmak ya da beyinden tamamen temizlemeye yönelik olduğu bildirilmektedir. $A\beta$ miktarının düşürülmesinin $A\beta(1-42)$ ile PDAPP transgenik faresinde aktif immünizasyon ile sağlandığı ilk olarak Schenk tarafından rapor edilmiştir [55]. Bundan sonra yapılan pek çok $A\beta$ immünizasyon çalışmasında, serebral $A\beta$ düzeylerinin farelerde [56],[57], [58], [59], [60], [61], insan olmayan primatlarda [62], [63] ve birkaç çalışmada da insanlarda [64], [65] $A\beta(1-42)$ seviyesinin düştüğü bildirilmiştir. 2002 yılında AN1792 insan klinik denemesi, Th-1 temelli güçlü bir adjuvant olan QS21 [66] ile AH'nın kendi antijeni olan $A\beta(1-42)$ kombinasyonu ile aşılanan Alzheimer hastalarının %6'sının beyin

zarı iltihabı ile karşı karşıya kalmasından dolayı [67], [68], [69] durdurulmuştur. Erken dönemde aşılanmanın sona ermesiyle beraber, immünize hastaların sadece %19.7'sinde antikor yanıtı alınabilmiştir [69]. Buna karşılık başka çalışmalarda; insanlarda [70], maymunlarda [63] ve farelerde [59],[71], [72] A β (1-15)'in hastalığın B hücresi epitopu olduğu, A β (16-42) bölgesinin ise T hücresi epitopu olduğu bulunmuştur [66], [73]. Böylece A β N-terminal türevleri ile yapılan immünizasyonlarda antikor üretilmiş, A β düşüşü gözlenmiş [57], [74], [75], [76] ve Alzheimer fare modellerinde alginin korunduğu bildirilmiştir [77], [74]. Bir Th2 temelli adjuvantın, Th1 nedenli durumların yarattığı sitotoksik etkiler olmaksızın güvenilir ve etkili şekilde immün yanıtın alınmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir [78]. Yapılan bir çalışmada A β B hücre epitop aşısı olarak, MER5101, A β (1-15) peptidine taşıyıcı protein olarak difteri toksini ile konjuge edilmiş ve bu aşı Th2 temelli adjuvant kullanılarak formüle edilmiştir. Çalışmanın sonunda genel olarak kullanılan Freund's adjuvanttan daha tolere edilebildiği bildirilmiştir [79]. Yapılan diğer bir çalışmada, GPGPG bağlı tetramer A β (1-15) sekansı ile APP/PS1 transgenik Alzheimer fare modelinin terapötik etkileri MF59 adjuvantı ile incelenmiş ve oldukça verimli antikor cevapları alındığı bildirilmiş ve enflamasyona neden olmayan Th2 yanıtını tetikleyebileceği rapor edilmiştir [80].



Şekil 2.6 Üstte, aşılanmamış doku örneğindeki plak görülürken, altta, aşılanmış fare dokusunda plak görünmemektedir [81]

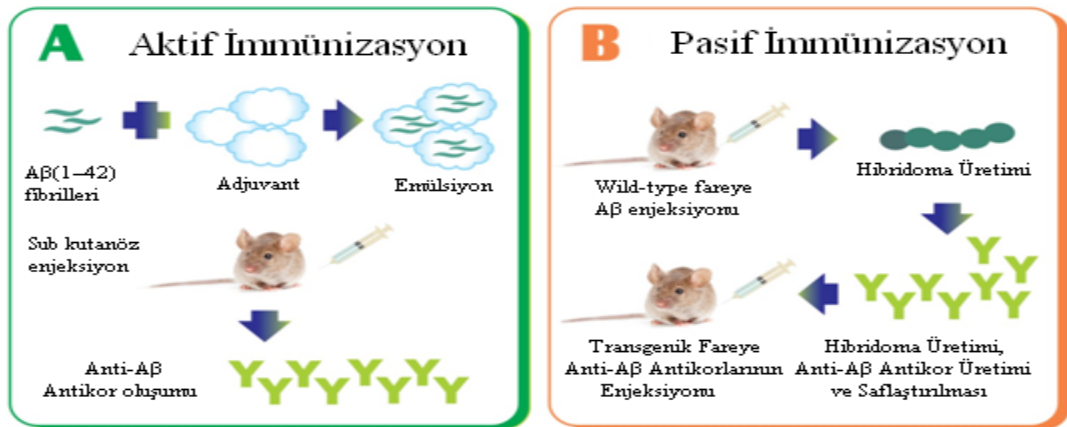
2.2.1 Biyoteknolojik Aşılar

2.2.1.1 Amiloid-β Plaklarının Temizlenme Mekanizmaları ve İmmün Tedavisi

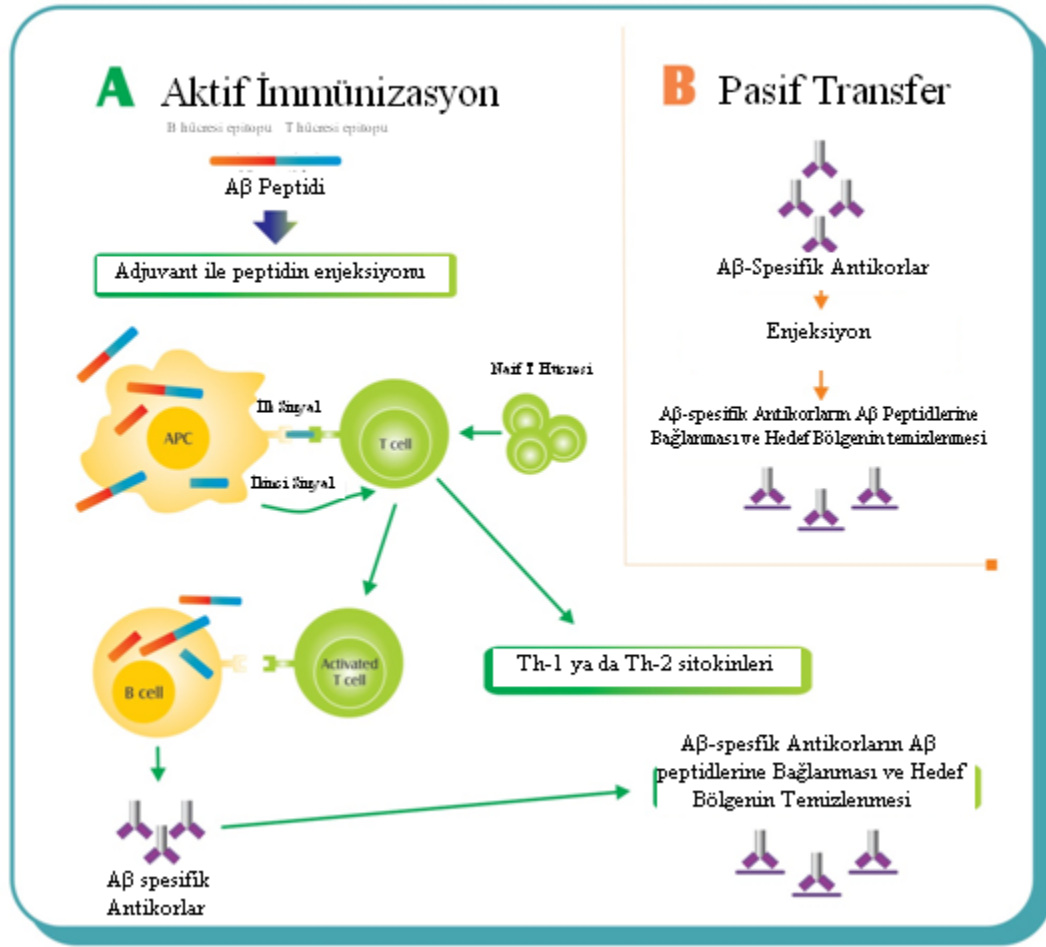
Amyloid-β (Aβ)'ya yönelik antikorların bu peptidin canlı içinde (*in vivo*) temizlenmesini nasıl kolaylaştırdığını açıklayan bir çok mekanizma bulunmaktadır. Anti-Aβ antikorları Aβ peptitleri ile antijen-antikor kompleksi oluşturduğunda, antikorların Fc bölümleri mikrogliya üzerindeki Fc reseptörüne bağlanarak bu kompleksin fagositozunu başlatmaktadır [56]. Bu mekanizmaya göre, anti-Aβ antikorlarının kan-beyin bariyerini aşarak, CNS içinde Aβ'ya bağlanmaktadır. Bu mekanizmayı destekleyen bir takım bulgular olmakla beraber, iki çalışmada Fc aracılığı ile gerçekleştirilen fagositozun Aβ temizlenmesi ile bağışıklık tedavisi (immunoterapi) için gerekli olmadığı rapor edilmiştir [82],[83]. Alternatif bir mekanizmada, kandaki anti-Aβ antikorlarının kan-beyin bariyeri boyunca Aβ'nin konsantrasyonunun farkında değişikliğe neden olduğu ve bunun da beyinden çevreye Aβ akışını arttırdığı belirtilmiştir [84],[85]. Aβ antikorları, sinapslardaki toksik Aβ türlerinin etkilerini küçük Aβ kümelerine bağlanıp bunları yok ederek ortadan kaldırabilmektedir [86]. Bir çalışmada belirli antikorların (örneğin, bir orta bölge Aβ antikor, m266) monomerik Aβ'yi beyinde ayırarak, bu peptidin temizlenmesini kolaylaştırdığı ve Aβ'nin toksik kümelenmiş hallerinin oluşmasını engellediği öne sürülmüştür [87]. Aβ'nin bağışıklık tedavisi ile temizlenmesi konusunda önerilen bu mekanizmalar, ayrışık olmamakla beraber hastalık evresine bağlı olabilmektedir. Örneğin, beyinde amiloid birikiminden önce kullanılan bir koruyucu ilaç, Aβ temizlenmesini iyileştirmek ve Aβ'nin monomerik halinde kalmasını sağlamak için antikorların kan-beyin bariyerini aşmalarını gerektirmeyebilir. Karşıt olarak, tedavi amaçlı kullanılan bir ilaç (plak birikiminden sonra kullanımda) Aβ antikorlarının, Aβ fagositozunu başlatmak ve bölgesel Aβ toksisitesini yok etmek için, CNS içine taşınımı ile yarar sağlamaktadır. Anti-Aβ antikorlarının çevredeki sirkülasyonu, Aβ'yi temizlenmesi için beyinden kana doğru çekerek daha fazla birikimini engelleyecektir.

2.2.1.2 Aktif ya da Pasif Amiloid- β Bağışıklığı

Aktif ve pasif amiloid- β bağışıklık tedavilerinin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Aktif A β bağışıklık tedavisi daha uygun maliyetli ve uzun süreli olmakla birlikte, aylık olarak maliyeti yüksek monoklonal antikor aşılmasına ihtiyaç duyulan pasif bağışıklıktan daha az doktor kontrolü gerektirmektedir. Aktif tedaviler ek yararlar da sağlayabilmektedirler. Bir çalışmada insan olmayan primatlara A β aşılmasının, çapraz reaktif ve potansiyel olarak koruyucu A β otoantikorlarının üretiminde artışa neden olduğu belirtilmiştir [88]. Bu tip antikorlar Alzheimer hastalarında aynı yaştaki sağlıklı bireylerden daha azdır ve bu nedenle bu proteinlerin seviyelerini arttırmak faydalı olabilir. Aşılama genellikle antikor üretimini arttırmak için güçlü bir immunojen-adjuvant karışımını içermektedir. Ancak bu adjuvantlar, özellikle pro-enflamatuar sitokinleri zaten normal seviyenin üzerinde olan yaşlı bireylerde istenmeyen bağışıklık yanıtını da tetikleyebilirler. Bu tip durumlarda pasif A β bağışıklık tedavisi faydalı olabilir [89]. A β aşıları için bu problemin bir çözümü antikor üretimini istenmeyen yan etiklerden kaçınarak arttıran anti-inflamatuar Th2 yolaklı adjuvantların kullanılması olabilir. Aktif tedaviler için bir diğer problem de, herhangi bir yan etki oluşması durumunda aktif aşıya karşı gelişecek bağışıklık yanıtının zorlukla durdurulmasıdır. Diğer yandan pasif A β bağışıklık tedavileri her an durdurulabilir. Pasif tedavi yaklaşımının bir diğer avantajı da, en zararlı olduğu düşünülen belirli A β yapı ya da türleri için özelleşmiş antikorların kullanılması ile tüm A β 'nin beyinden uzaklaştırılmasının önlemesidir. Pasif yaklaşımın dezavantajı ise, hastaların sonuçta pasif tedavide verilen antikoru nötrleştirme potansiyelidir [90].



Şekil 2.7 Aktif ve pasif immunizasyon [91]



Şekil 2.8 Aktif İmmünizasyon ve Pasif transfer mekanizmaları [90]

2.3 Peptidler

Peptid bir kimyasal yapı olarak, amino asit monomerlerinden oluşmuştur. 100'den fazla amino asitten oluşan yapılara protein adı verilmektedir. Peptidler yapılarında bulunan amino asitlerin fonksiyonel gruplarına ve dizilişine göre farklı özellikler gösterebilirler [92]. 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 almaktadırlar [93], [94]. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerdeki çok büyük rolü onların potansiyel ilaç adayı olmalarını arttırıcı etkiye yol açmaktadır [95]. Son 10 yılda peptid araştırmalarında büyük artış olmuştur. Peptid araştırmaları alanında yılda ortalama 20.000 makale yayınlanmaktadır [92]. Doğal ve sentetik peptidlerin kullanımı çeşitli hastalıkların potansiyel tedavisinde farmasötik olarak umut vaat etmektedirler. Peptidlerin keşfedilmiş en önemli sınıflarının içinde

bulunan insülin, gonadotropin salgı hormonu, kalsitonin, enkefalinler, glukagonlar, diğer hormon analogları, enzim inhibitörleri ve aşılar yer almaktadır. Peptidlerin büyük bir çoğunluğu, kanser çeşitleri ve metabolik bozukluklara karşı hedeflenmiştir. 2010 yılında, 50 peptid ilacı piyasada yaklaşık 1 milyar ABD doları gibi bir pay teşkil etmiştir. Bu ilaçlar arasında ciclosporin (Neoral®, Novartis), goserelin acetate (Zoladex®, AstraZeneca), glatiramer acetate (Copaxone®, Teva Pharmaceuticals), leuprolide acetate (e.g. Lupron®, Abbott Laboratories) ve octreotide acetate (Sandostatin®, Novartis) örnek olarak verilebilmektedir. Buna ek olarak 2010 yılında, 100'ü aşkın peptid ilacı klinik çalışmalarda aday olarak kullanıldığı rapor edilmiştir [96]. Geleneksel atenüe aşilarla karşılaştırıldığında, modern alt-ünite peptid aşiları arttırılmış güvenlik, daha yüksek özgüllük, yüksek saflık ve üretim maliyetinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. Alt -ünite peptid aşiları sadece aşı etkinliği için gereken minimal antijenik bileşenleri içermektedir [97]. Bu peptid bazlı aşilar kolaylıkla modifiye edilebilir, enfeksiyöz değillerdir ve enzimatik bozunmaya karşı yüksek stabilite göstermektedirler [98]. Diğer bazı formülasyonlardan farklı olarak, peptid bazlı alt-ünite aşilar, başarılı bir aşı için gerekli adjuvant, taşıyıcı ve antijen gibi tüm bileşenleri içermektedirler [99], [100]. Peptid bazlı aşilar peptidlerin doğasında olan kararsızlıkları, spesifik olmayan immün yanıtlara ya da immünitenin sağlanamaması gibi sonuçları ortaya çıkarma potansiyeline de neden olmaktadır. Doğal peptid epitopları 1990'dan itibaren özgüllüğü ve immünojenikliği arttırmak için peptidomimetikler ve peptid-peptidomimetik hibritler ile değıştırilmektedirler. Antijenlerin dizaynı için peptidomimetiklerin kullanılması literatürde kendine geniş bir yer bulmaktadır [101].

2.3.1 Peptidler ve Peptid Bağı

Peptid bağı, amino asidlerin peptidlere ve proteinlere polimerleşmesine yol açan kondenzasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bağdır. İki amino asidin birleşmesiyle oluşan yapıya *dipeptid* denir. Basit bir dipeptid; bir amino asidin karboksil grubuyla diğer amino asidin amino grubu arasında kovalanet bağ oluşması ve aralarından 1 mol suyun ayrılmasıyla oluşur. 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'in

altında olan yapılar ise, polipeptidler olarak adlandırılır [102]. 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-ucu (N-terminus) ve C-ucu (C-terminus) olarak adlandırılırlar [103]. Peptidler her zincirin bir ucunda sadece bir serbest amino grubu ve bir serbest karboksil grubu içerirler. Bu gruplar serbest amino asitlerdeki gibi iyonize olurlar. Uçlar dışındaki tüm amino asitlerin -amino ve -karboksil grupları kovalent bağlanıp peptidleri oluşturdukları için, iyonize olarak peptidlerin toplam asit-baz davranışlarına katkıda bulunmazlar. Fakat bazı amino asitlerin R grupları iyonize olabilir ve molekülün asit-baz özelliğini etkiler. Serbest amino asitlerinkine benzer şekilde, peptidlerinde izoelektrik noktaları (pI) mevcuttur [102].

2.3.2 Protein Yapısındaki Kovalent Olmayan Etkileşimler

Kovalent olmayan bağlarla bağlanmış atomlar arasındaki etkileşimler (yani non-kovalent etkileşimler) doğal protein yapısı ve kararlılığını belirlemede önemli rol oynamaktadır. Termodinamik ve spektroskopik çözümler, bu kovalent olmayan etkileşimleri tespit etmek ve anlamak için kullanılmaktadır. Doğal ve katlanmış proteinler arasındaki serbest enerji genellikle birbirleri ile dengede olan entropik ve entalpik düzenlenmelerden kaynaklanmaktadır [104]. Kovalent olmayan etkileşimler, proteinlerin yapılanmasında çok büyük önem taşımaktadırlar. Hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik bağlar ve Van der Waals kuvvetleri protein konformasyonunda önemli bir etkiye sahip olan kovalent olmayan etkileşimlerdir. Bu kovalent olmayan etkileşimler, kovalent bağlardan çok daha zayıftır. Örneğin 1 mol (6×10^{23}) C-C bağı kırma için 350 kJ enerji gerekirken, 1 mol van der Waals bağı kırma için 4 kJ enerji yeterlidir. Hidrofobik etkileşimler, kovalent bağlardan oldukça zayıfsalar da, yüksek polariteye sahip çözücülerde (örneğin derişik tuz çözeltilerinde) bu etkileşimler çok kuvvetli hale gelmektedir. İyonik etkileşimler ve hidrojen bağları çözücünün polarlığına bağılı olarak değışik kuvvette olabilirler ancak bütün bu etkilere rağmen yine de kovalent bağlardan daha zayıf olurlar. Bu zayıf bağların herbirinin oluşması, sistemin serbest enerjisinde net bir azalma yaratmaktadır. Makromoleküllerin en kararlı (doğal) yapıları, bu zayıf bağları oluşturabilme yetilerinin

en yüksek olduğu halleridir. Tek bir polipeptid zincirinin üç boyutlu şekilde katlanması, bu esasa göre belirlenmektedir. Antijenin özel bir antikora bağlanması birçok zayıf etkileşimin toplam etkisiyle olmaktadır. Birbirleriyle moleküler düzeyde etkileşim içersinde bulunan biyomoleküller arasındaki bütünleyicilik, moleküllerin yüzeyinde bulunan polar, yüklü ve hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimleri ve bütünleyiciliğı yansıtmaktadır [103].

2.3.2.1 Van der Waals Etkileşimleri

İki tane yüksüz atom birbirine çok yaklaştırılırsa, yüzeylerindeki elektron bulutları birbirini etkiler. Bir çekirdeğin etrafındaki elektronların konumlarının rastgele değışikliğı, geçici bir elektrik dipolü oluşturabilir; bu arada çok yakınında bulunan bir diğ er atom ise, dipole zıt bir elektrik dipol oluşturabilir. Oluş an bu iki zıt dipol birbirlerini zayıf bir etkileş imle çekerek, iki çekirdeğı birbirine daha da yakınlaştırır. Bu zayıf güçteki çekimlere “Van der Waals Etkileş imleri (ya da London kuvvetleri) “ adı verilir. İki çekirdek birbirine daha yakın bir duruma geldiklerinde, elektron bulutları birbirlerini itmeye baş lar. Van der Waals çekiminin bu itiş kuvvetiyle dengeye ulaşt ığı noktada, çekirdeklerinin birbiriyle van der Waals temasında olduğı söylenir [102].

2.3.2.2 Hidrojen Bağları

Bir hidrojen bağı, azot ve oksijen gibi elektronegatif atomların hidrojenle etkileş ime girmesiyle meydana gelir [105],[106]. Hidrojen bağları, proteinlerin üç boyutlu yapısının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Özellikle makromoleküllerde; makromolekölün bazı kısımları arasında meydana gelen bağlar sonucunda oluş an özel formdaki katlanmalar, makromoleküllerin fiziksel ve biyokimyasal rollerini belirler. Proteinlerde hidrojen bağları, bir ana zincirdeki oksijenler ile diğ er zincirdeki hidrojenler arasında meydana gelir [107]. Bir hidrojen bağı nın enerjisi yaklaşık olarak 2 ile 20 kJ/mol arasındadır. Bu enerji, bir protein molekülünün katlanmasının stabilizasyonu için yeterli bir enerji değildir. Bir protein katlanmasında, protein ile su molekülü arasında oluş an hidrojen bağı kırılır ve bazılarının yerini molekül iç i hidrojen bağları alır ve çözücünün entropisi azalır [105],[106].

2.3.2.3 Hidrofobik Etkileşimler

Polar olmayan gruplar, su ile etkileşmeyi pek tercih etmezler çünkü su ile hidrojen bağı oluşturmazlar. Apolar grupların su molekülleri ile etkileşiminin olmaması, apolar moleküllerin kendi aralarında etkileşime girmesi ile sonuçlanır; yani polar olmayan moleküller polar olmayan bir ortamı tercih ederler. Polar olmayan bu grupların başka polar olmayan gruplarla etkileşimleri “Hidrofobik Etkileşimler” olarak adlandırılır. Hidrofobik etkileşimler, protein molekülünün sulu ortamdaki kararlı yapısının oluşmasına sebep olan katlanmalarının en önemli sebebidir [108]. Hidrofobik etkileşimler, molekülleri bir arada tutarlar. İki ya da daha fazla hidrofobik grup, su molekülleriyle çevrildiklerinde, birleşme eğilimi gösterirler. Su molekülleri, su ağındaki hidrojen bağlarının engelleyici etkisini azaltmak için hidrofobik grupları bir araya getirir. Bu yolla hidrofobik grupların su molekülleri tarafından itilmesi ve bu şekilde bir arada tutulması, “hidrofobik bağlar” ile açıklanmıştır. Hidrofobik etkileşimler, globular proteinlerin katlanması ve 3 boyutlu yapısını almasında en önemli kuvvetlerden biridir ve amino asitlerin hidrofobik yan zincirlerinin proteinin iç kısımlarına gömülmesi ile sonuçlanır. Frank ve Evans’ın [104] polar olmayan türdeki moleküllerin, sudaki düşük çözünürlüklerini açıkladıkları çalışmalarına bağlı olarak, Kauzmann ilk kez 1950’lerin sonlarında proteinlerin katlanmalarının karmaşıklığını “hidrofobiklik” kavramıyla açıklamıştır [109].

2.3.2.4 Elektrostatik (İyonik) Etkileşimler

Elektrostatik çekimler tarafından ortaya çıkan iyonik etkileşimler, iki karşıt yüklü ya da benzer yüklü moleküller arasında meydana gelir. Amino asit yan zincirleri, lizin, arjinin ve histidin amino asitlerinde olduğu gibi pozitif yük taşıyabilir veya aspartat ve glutamat amino asitlerindeki gibi negatif yük taşıyabilirler. Ayrıca, proteinlerin veya peptid zincirlerinin NH_2 -ucu ve COOH -ucu çoğunlukla iyonize formda bulunduklarından, protein veya peptid molekülleri pozitif veya negatif yükler taşıyabilirler. Bütün bunlar proteinin yapısında elektrostatik etkileşimlerin meydana gelmesini sağlar. Yüklü moleküller genellikle, proteinin suyla etkileşime girebileceği yüzeyinde yerleşmiş durumdadırlar. Proteinin yüzeyindeki bu yüklü gruplar arasında meydana gelen

etkileşimler “elektrostatik etkileşimler” ya da “tuz köprüleri” olarak adlandırılırlar. Ve bu etkileşimler proteinin stabilizasyonunda çok önem taşırlar [103].

2.3.2.5 Disülfid Bağları

Disülfid bağı, iki sülfür atomu arasında meydana gelen kovalent bir bağıdır. Bu kovalent bağlar, birincil dizilimde farklı pozisyonlarda yerleşmiş sistein amino asidlerinin R grupları arasında meydana gelir. Bu bağlar proteinlerin katlanması, yapısı ve fonksiyonu açısından oldukça önemlidir [13]. Her sistein amino asidi, yan zincirinde fonksiyonel grup olarak tiyol (-SH) grubu taşır. Amino asidlerden birindeki sülfür atomu ile, amino asid diziliminde farklı bir pozisyonundaki sistein amino asidine ait sülfür atomu arasında, tersinir (geri dönüşümlü) bir kovalent bağ meydana gelir. Ve tiyol grupları okside olarak disülfid bağı (S-S) meydana getirirler. Disülfid bağları, proteinlerin dördüncül yapılarının oluşmasında önemli role sahiptirler [92].

2.4 Polimerler

2.4.1 Polielektrolitler

Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı “counter” iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır [110]. Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere *homopolielektrolit* adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküller ise, *poliamfolitler* olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda protein yapıları poliamfolit bulunmakla birlikte, sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir. Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler. Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemeleridir ve bu nedenle *polituzlar* olarak da adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri, tuzlar gibi, elektriği iletir ve polimerler gibi viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır. Son zamanlarda sentetik polielektrolitlerin fizyolojik aktifliği ve bunların ilaç preparatları için taşıyıcı

olarak kullanılması, bu tür polimerlerin sentez yöntemlerinin ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesini gerekli kılmaktadır [111], [112]. Sentetik polielektrolitler, proteinleri kovalent bağlarla modifiye etmekte, antijenik proteinlerin bağışıklık sisteminde immünojenliğinin arttırılmasında (ya da azaltılmasında) [113],[114],[115] ve vücuttan atılma sürelerinin uzatılmasında (prolongation) sıkça kullanılmaktadır. Bununla birlikte, viral antijenlerin (virüslerin organizma tarafından tanınabilen kısmı) polielektrolitlerle konjugatları güçlü koruyucu özellikler göstermektedir [116] ve yeni nesil sentetik aşı bileşikleri olarak düşünülmektedir. Polimerler içerisinde, yapısında (+) ve (-) yük bulunduran makromoleküller gerek suda çözünmeleri gerekse biyomakromoleküllerle etkileşimleri açısından özel bir yer teşkil etmektedirler. Canlı organizmada var olan biyomakromoleküllerin (proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler vb.) veya organellerin (hücre membran yüzeyi, doku yüzeyleri vb.) (-) yüklerinden dolayı biyomakromoleküllerin, (-) yüklü polielektrolitlerle etkileşiminin incelenmesi çok etkin olarak yapılmaktadır [117],[118]. Polielektrolitin organizmada kullanılabilmesi için biyobozunur özelliğe sahip olması gerekir. Bu özellik sayesinde polimerin organizmadan atılması daha kolay olmaktadır [119].

2.4.2 İmmünojen-Polielektrolit Komplekslerin Çalışma Prensipleri

1970'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. PE'lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve hayvanlar bu kompleksler ile immünize edilerek, immün cevabın yükselmesinde PE'lerin etkili oldukları gösterilmiştir. PE'lerin bakteri, virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması sonucu immün cevabın artması ve devamlı bir immün koruyuculuk sağlaması sentetik aşı tasarlama fikrini ortaya çıkarmıştır [120]. Yüklü olmayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poliN-vinil pirilidon, polietilen glikol) eritrositlerin kompleksleri yapılmış, fakat bu kompleksler immün cevapta artış sağlayamamışlardır yani bu tür yapılı polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bu bilgiler ışığında yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitlerin (PE), (negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen polimerler; polianyonlar, polikasyonlar ve

bunların kopolimerleri) monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır [121],[122],[123],[124]. Bunun nedeni şu şekilde açıklanmıştır: Bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. PE suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilmektedir. Polielektrolitlerde molekül ağırlığı arttıkça, yük taşıyan fonksiyonel grupların artmasından dolayı sulu çözeltideki protein veya peptidler ile etkileşimi de artmaktadır. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır [120].

2.4.3 Polielektrolitlerin Aşı Çalışmalarında Kullanımları

Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasit zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir [125]. Poliakrilikasit (PAA), Poli-N-isopropilakrilamid (NIPAA), Poli-N-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilikasit (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar [126]. 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, haptenerler vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenerlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da 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.

Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak, pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünolojik olmayan sentetik polielektrolitler kullanılabilmektedir [120]. Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi ilerleyen bölümlerde verilmiştir. Polielektrolitler, sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yapay aşı bileşenleri olarak düşünülmektedir [13]. Polielektrolit-peptid kovalent konjugasyonu açısından 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. Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip olduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve konjugatın yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir [120],[125]. Sadece lineer yapıdaki polielektrolitler değil aynı zamanda yapay aşı sistemlerinde de küçük molekülleri konjuge etmek için taşıyıcı moleküller olarak protein biyomolekülleri kullanılabilmektedir. Büyük moleküler boyutlardaki BSA, Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Ovalbumin (OVA) gibi globular proteinler, peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-

vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar. Bovin Serum Albumin (BSA) antikor oluşumda konjugasyon için genel olarak en yaygın kullanılan taşıyıcı proteindir. Yapısında taşıdığı çeşitli fonksiyonel gruplarından dolayı da konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler ya da haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir [127]. Örneğin, Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan ve düşük immünolojik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA'ya % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA-B konjugatları 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlenmiştir. Suda çözünabilir özellikteki BSA-B konjugatlarının UV analizi sonucu agregat oluştuğu gözlemlenmiştir. [128].

2.5 Çapraz Bağlanma Reaktifleri

Biyokonjugasyon için kullanılan küçük kullanışlı reaktif sistemleri “Zero-Length Çapraz Bağlayıcılar” olarak adlandırılırlar. Bu bileşikler, iki molekülün, herhangi bir atom eklenmeksizin, birbirine bağlanması yani konjugasyonunda arabuluculuk yaparlar. Böylelikle, bir moleküldeki atom, herhangi bir bağlayıcı ya da arabulucu olmaksızın diğer moleküldeki atoma kovalent olarak bağlanır.

2.5.1 Karbodiimidler

Karbodiimidler, karboksilat ve amin grupları arasında amid bağı oluşturmak üzere en çok kullanılan çapraz bağlayıcı reaktiflerdir. Karbodiimidler, suda çözünebilenler ve suda çözünmeyenler olmak üzere 2 tipte olabilirler. Biyolojik orjinli birçok makromolekül sulu çözeltilerde çözünebildiğinden, biyokimyasal konjugasyonlarda en çok suda çözünebilen karbodiimidler kullanılır. Bu reaksiyonlarda sadece karbodiimidin kendisi değil, aynı zamanda reaksiyonun ara ürünü olan izoüre de, suda çözünebilen özelliktedir ve kolayca reaksiyon ortamından uzaklaştırılabilir. Suda çözünemeyen karbodiimidler ise, çoğunlukla peptid sentezinde ve organik solventlerde çözünebilen molekülleri içeren diğer konjugasyonlarda kullanılırlar. Ancak hem suda çözünebilen hem de çözünemeyen karbodiimidlerin izoüre ara ürünleri, suda çözünebilen. 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil karbodiimid (EDC), biyolojik maddelerin konjugasyonunda en çok kullanılan karbodiimidlerden biridir. Birçok kaynakta, EDC'nin pH'ın 4.7 ile 6 arasında optimal koşullarda reaksiyon verdiği tanımlanmıştır. Karbodiimidin

arabuluculuğunda oluşan amid bağı formu da, pH 4.5 ile 7.5 arasında etkili bir şekilde meydana gelir [129]. Karboksil grubunun karbodiimide bağlı aktivasyon reaksiyonunun basit mekanizması, polimerin karboksil grubu ile proteinin amino grubu arasında gerçekleşen ve iki basamaktan oluşan bir kondenzasyon reaksiyondur [130]. Karbodiimid ilk olarak, polimer molekülündeki karboksil grupları ile reaksiyona girer ve oldukça aktif o-açıl-izoüre ara ürününü meydana getirir. EDC ile aktive olan karboksil grupları, amid bağı oluşturmak üzere peptiddeki amino grubuna saldırır ve bu reaksiyondan suda çözünebilir özellikteki üre türevleri yan ürün olarak oluşur. Çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda oluşan izoüre ara ürünü ve reaktifin fazlası suda çözünebilir özellikte olduklarından, diyalizle ya da jel filtrasyonu ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir [129].

2.6 Bağışıklık Sisteminin Çalışma Prensibi

Canlı vücudunu farklı savunma sistemleri korumaktadır. Dış dünyadan vücuda giren ve vücudun tanımadığı moleküllere *antijen* denilir. Antijenler canlı vücudundaki bağışıklık sistemini harekete geçirirler. Bu tarz bir saldırıda öncelikle antijenlerin vücuda girmesini engelleyici yüzey engelleri devreye girer. Yüzey engelleyicilere örnek olarak göz, deri, solunum, sindirim sistemi verilebilir. Yüzey engellerini aşan antijenler ikinci savunma sistemi olan doğal bağışıklık sistemi ile karşılaşırlar. Doğal bağışıklık sisteminde fagositler, makrofajlar ve lenfositler devreye girer. Fagositler ve makrofajlar öncü hücreler olduğundan ilk aşamada antijenleri yok etmeye çalışırlar. Vücuda girebilen birçok organizma bu yöntem ile yok edilmeye çalışılır [131]. İkinci koruma sistemini aşan antijenler üçüncü savunma sistemi olan özgül bağışıklık sistemi ile karşılaşırlar. Üçüncü savunmada B ve T lenfositler devreye girer. Antijen saldırısını haber alan T hücreleri harekete geçerek diğer savunma hücrelerini tetiklerler [132].

2.6.1 Lenfositler

Lenfositler vücuda giren antijenlerin uyarısıyla farklılaşarak bağışıklık cevabını oluşturan asıl birimlerdir. Lenfositler genel olarak T, B ve Doğal öldürücüler şeklinde sınıflandırılır. Dokuya göre değişmekle birlikte genel olarak T hücreler lenfositlerin %80'ini geriye kalan %20'sini eşit bir şekilde B hücreler ve doğal öldürücüler oluşturur [133].

2.6.1.1 T lenfositler

T hücresi oluşturmak için bağışıklık hücreleri kemik iliğindeki olgunlaşmamış kök hücrelerinden salındıktan sonra timusa geçer ve timusta olgunlaşırlar. Olgunlaşan hücreler timustan ayrılarak kanda ve lenf sistemlerinde dolaşır. Farklı görevleri yerine getirmek için çeşitli T hücreleri vardır. T hücreleri çeşitlerinden öldürücü T lenfositler virüs taşıyan hücreleri tespit edip o hücreleri yok etmeye çalışır. Diğer T hücreleri benzer şekilde öldürücü lenfositleri destekleyen görevleri yerine getirirler. T lenfositler immünolojik bellekten ve hücrel bağışık yanıtta sorumludurlar. T lenfositler taşıdıkları belirleyicilere göre CD4 (Th2 yanıtından sorumlu- B lenfosit aktivasyonu) veya CD8 (Th1 yanıtından sorumlu - sitotoksik) olmak üzere 2 alt gruba ayrılır. CD4 yardımcı lenfositler, bağışık yanıtı başlatır veya yardım eder, CD8 ise sitotoksik etkilidir [134].

2.6.1.2 B lenfositler

B lenfositler antijene özel antikor üretir. Vücuda herhangi bir antijen girdiğinde, B lenfositler milyonlarca antikor üreterek çoğalır [134]. Antikor diğer adıyla immünglobulin, serum ve doku sıvılarında bulunan bir grup glikoproteindir. Antikor belirli bir antijene yönelik immünglobulindir. Antikorlar B lenfositler tarafından antijene karşı üretilirler ve yapılmalarına neden olan antijene özgül bir şekilde bağlanırlar [135]. İmmünglobulinler (Ig, antikor) vücutta immün sistem tarafından (B lenfositler, plazma hücreleri) virüsler, bakteriler, mantarlar, kanser hücreleri gibi yabancı maddelere karşı üretilen proteinlerdir. Bu yabancı maddelere saldırarak immün sistemin onları yok etmesini sağlar ve vücuda zarar vermesini önlerler. Her antijene (vücuda yabancı madde) karşı, ona özgü Ig üretilir. Ayrıca alerjik olaylarda (IgE'ler) rol oynadıkları gibi, bazen de oto-immün hastalıklarda vücudun kendi doku ve organlarına da saldırabilirler [136].

MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

- Finnpiquette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- WTW pH level 1 pH metre
- Precisa XB 220A Terazi
- Sartorius CP 225D Hassas Terazi
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıticılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- 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 Furier 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)
- Su saflaştırma sistemi (Millipore MilliQ Elix 5)
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.22 µm
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.45 µm
- 10000 Da'luk Millipore membranlı tüp

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Amiloid Beta Peptidi (1-15)	BioSynthesis	-
Amiloid Beta Peptidi (1-21)	BioSynthesis	-
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
Poliakrilikasit (PAA)	Aldrich	52392-5
3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma	M 5655
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
Dansil Klorür [5-(dimetilamino)naftlen-1-sulfonyl klorür]	Aldrich	D143359
Borik Asid (H_3BO_3)	Sigma	B6768
Dextran from Leucontoc mesenteroides (Av.mol wt 60,000-90,000)	Sigma	D3759
Sodium (meta) periodate	Fluka	71862
Sodyum Hidrojen Karbonat ($NaHCO_3$)	Fluka	71627
Sodyum Bor Hidrür ($NaBH_4$)	Fluka	71321

3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

- **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.

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

2,6807g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Mw=268,07 g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözüldü. Aynı bir erleninde 1,56g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Mw=156,01 g/mol) tartılarak 400 ml ultra saf suda çözüldü. Hazırlanan 400 ml'lik NaH_2PO_4 çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklendi ve karıştırıldı. Bu karışıma son olarak 8,766 g NaCl

eklenir ve karıştırmaya devam edildi. Çözeltinin pH'ı ölçüldü ve pH=7'ye ayarlandı. Ultra saf su kullanılarak çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

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

6.18 g borik asit bir miktar saf su içerisinde çözüldü. Üzerine 2.00 gr sodyum hidroksit eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

- **100mM NaHCO₃ Tamponu**

200ml NaHCO₃ tamponu hazırlamak için;

$M = n / V$ formülünden,

$0,1 = n / 0,2$ buradan $n=0,02$ mol bulunur.

$n = m / m_A$ formülünden ise,

$0,02 = m / 84,01$ $m=1,68$ gr bulunur.

1,68 gr NaHCO₃ tartılıp, 200 mL distile suda çözüldü ve bu çözeltinin pH'ı 8 olacak şekilde ayarlandı.

- **PAA Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

Deneylerde % 35'lik Mw=100.000 Da olan PAA çözeltisi kullanıldı. Bu ana stok çözeltiden her seferinde almak yerine, konsantrasyonu bilinen bir ara stok çözelti hazırlandı.

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

100 mL'de	35 gr PAA varsa,
X	1 mg PAA

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

2 mL PAA ana stoktan alırsak;

2.85 µL'sinde	1 mg PAA varsa,
2000 µL'sinde	X

$X = 701.75$ mg PAA vardır.

Bu 2 mL (701.75 mg) PAA çözeltisini 2 mL ultra saf su ile dilue edersek ($V_T = 4$ mL);

701.75 mg PAA 4 mL'deyse

1mg PAA	X
---------	----------

$X = 5.7$ µL'sinde 1 mg PAA bulunur.

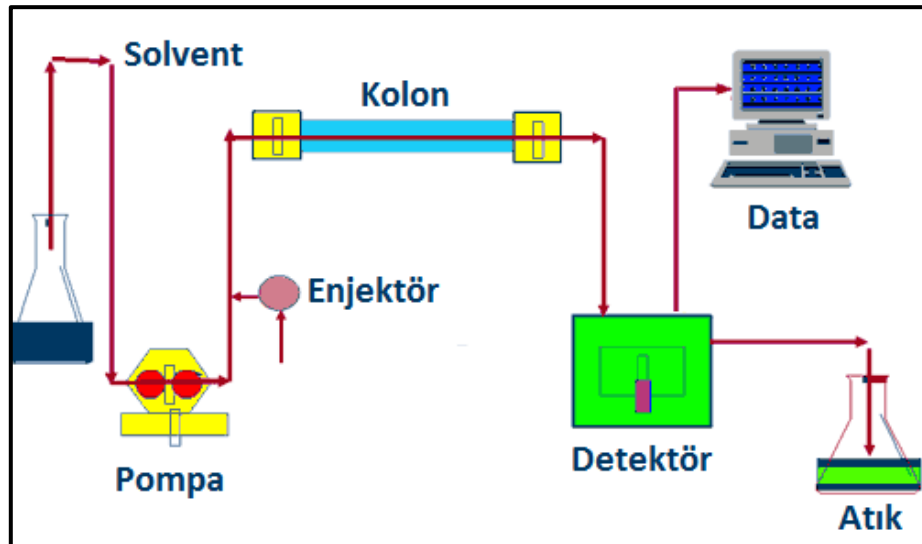
Böylece, elimizde 5.7 μL 'sinde 1 mg PAA olan 4 mL ara stok çözeltimiz olur. Deneylerimizde kullanılan bütün PAA'ler bu ara stok çözeltiden uygun miktarlar hesaplanarak kullanılmıştır.

3.2 Metod

3.2.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.2.1.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

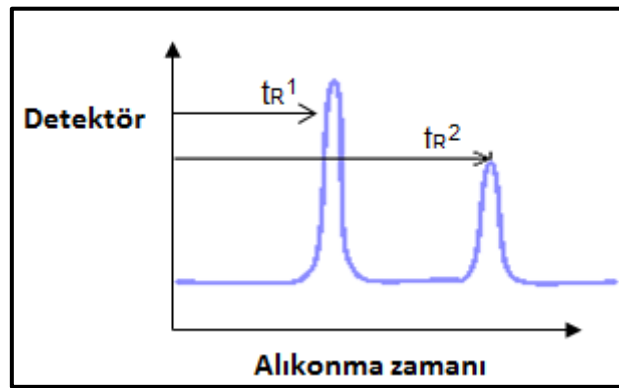
Çok ufak tanecikli sabit fazın üzerinden yüksek basınçta hareketli fazın yürütülmesi ile gerçekleştirilen bir kromatografi türüdür.



Şekil. 3.1 HPLC sistemi şeması [137]

Pompa hareketli fazın istenen basınç ve akış hızında kromatografi sistemine verilmesini sağlamaktadır. Kullanılan kolonların dayanabildikleri maksimum basınç değerleri bulunmaktadır ve bu basınç değeri aşılsa kolon bozulmaktadır. Akış hızını ayarlama sebebi ise karışım bileşenlerinin uygun şekilde ayrılmasını olanak sağlamaktadır. Akış hızı düşük olduğunda karışım kromatografi sisteminde daha uzun süre tutulacak ve daha iyi bir ayırma sağlanacaktır, ancak bu durumda da çalışma süresini uzatacaktır. Bu nedenle optimum akış hızı ile çalışmak gereklidir. Karışım hareketli faza enjektör ile verilmektedir.

Karışımı çözmekte kullanılan çözücü hareketli faz ile uyumlu olmalıdır. Polarlıkları yakın olmalı, çökme, bulanıklık meydana gelmemelidir. Kolonlar kromatografik ayırmanın gerçekleştiği HPLC parçasıdır. Kolondan çıkan ayrılmış maddeler detektöre girerler. Burada miktarlarına ve belli çeşitli özelliklerine göre cihaz tarafından saptanırlar. Bir HPLC sisteminde kullanılabilen detektörleri seçici ve seçici olmayan detektörler olarak ikiye ayırabiliriz. Seçici detektörler sadece belli maddelere cevap verirler. Örneğin floresans detektörü sadece floresans özelliği olan maddeleri saptarlar. Seçici olmayan detektörler ise genel uygulamalı detektörlerdir ve çok sayıda maddeyi saptayabilirler.

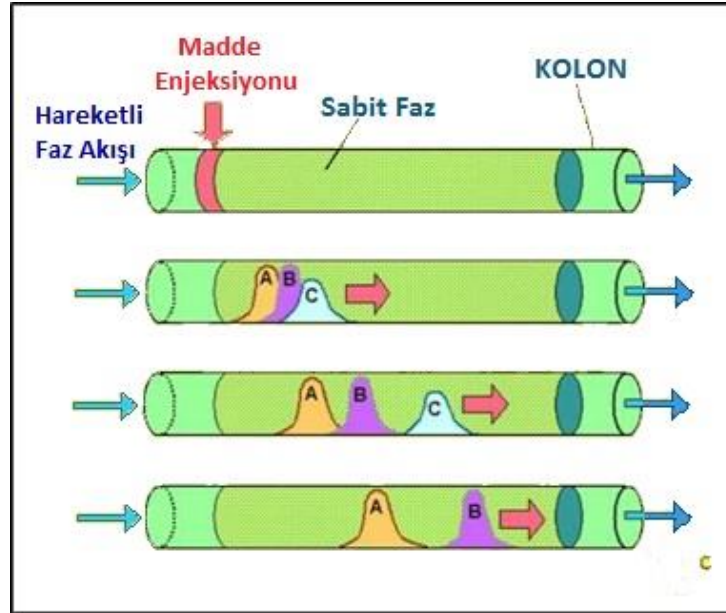


Şekil 3.2 Maddelerin alıkonma zamanına göre kolondan çıkışları

HPLC sisteminde detektörden geçen her bir madde, kromatogramda bir pik olarak gözlenir. Alıkonma zamanı, bir maddenin kolon içinde ne kadar süreyle kaldığını gösteren bir değerdir. t_R^1 ve t_R^2 değerleri her bir maddenin alıkonma zamanını göstermektedir. Kromatogramdaki pikler dışında kalan kısımlar hareketli fazı göstermektedir ve “baseline” adını almaktadır. Alıkonma zamanı dakika olarak verilmektedir. Bazı hallerde alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de kullanılmaktadır. Bu durumda okuduğumuz değer maddenin, hareketli fazın kaçınıcı mililitresinde kolondan çıktığını göstermektedir.

3.2.1.2 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)

Kromatografi, birbirine yakın özellikteki madde karışımlarını ayırmak için kullanılan güçlü bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Genel olarak tanımı ise, kromatografi, bir karışımın sabit bir faz üzerinde (gözenekli), hareketli bir çözücü yardımıyla , karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanır. Kromatografide sabit ve hareketli olmak üzere iki faz vardır. Sabit faz katı ve sıvı hareketli faz sıvı ve gaz olabilir. Ayrımı istenen karışım hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden geçirilir. Karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulması nedeniyle her bir bileşik sistemi farklı zamanlarda terk eder. Böylece bileşikler birbirinden ayırmak, tanımak ve ayrı ayrı toplamak olasıdır [138].



Şekil 3.3 Kolon Kromatografisi [139]

Çalışmamızda kullanılan peptid ve taşıyıcı makromoleküllerin molekül ağırlıkları ve boyutları birbirlerinden farklıdır. Konjugasyon reaksiyonlarımızda bulunan serbest peptid veya üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Molekül çapı çok daha büyük olan polimer gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından, kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden en önce çıkacaktır. Yani molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi ise azalacaktır. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite (RI) ve Işık saçılması (RALS) detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek

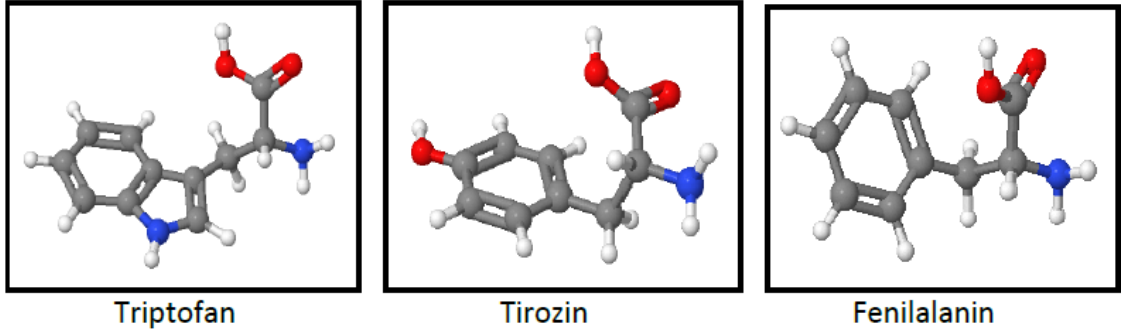
kromatogramları elde edilecektir. Konjugat çözeltileri direkt olarak 0.22 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek 4 dedektörlü moleküler eleme kromatografisi (GPC) cihazına verilmiştir. 250C'de, 0.8 mL/dk akış hızında, 100 µl enjeksiyon hacminde ve TSK Gel G3000 SWXL kolonunda UV (280 nm'de), Kırılma İndisi ve Işık Saçılması detektörleri ile çalışılmıştır. pH = 7'de hazırlanan konjugatlar için PBS tamponu hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

3.2.1.3 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 ayrımı hassasiyetindeki gelişim, veri analiz metodları ve enstrümantasyondaki ilerlemeden dolayı olduğu bilinmektedir. 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 [140],[141], [142],[143], [144], [145]. Floresans olayı, birincisi absorpsiyon ve bunu izleyen ikinci proses olan emisyon olmak üzere iki proses içerir[145]:

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 [146].

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.



Şekil 3.4 Doğadaki floresans özellikli aromatik amino asitler: Triptofan, Tirozin ve Fenilalanin

Çizelge 3.2 Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninin soğurma ve floresans dalga boyu değerleri

Aromatik Amino Asit	Işını en çok soğurduğu dalga boyu (nm)	Işığı maksimum yaydığı dalga boyu (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 dalga boylarında gözlenebilir.

Elektromagnetik dalgayı temsil eden fiziksel büyüklüklerin birbiri ile ilişkisi şöyledir;

$$E = hc/\lambda$$

3.1

Denklem 3.1, fotonun enerjisi ile dalga boyu arasındaki bağıntıyı vermektedir. Burada; E, fotonun enerjisini; h, Planck Sabitini ($6,62 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$); 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 3.1'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 [147].

$$Qf = \frac{\text{yayılan fotonun floresans şiddeti (If)}}{\text{absorblanan foton miktarı (Ia)}} \quad 3.2$$

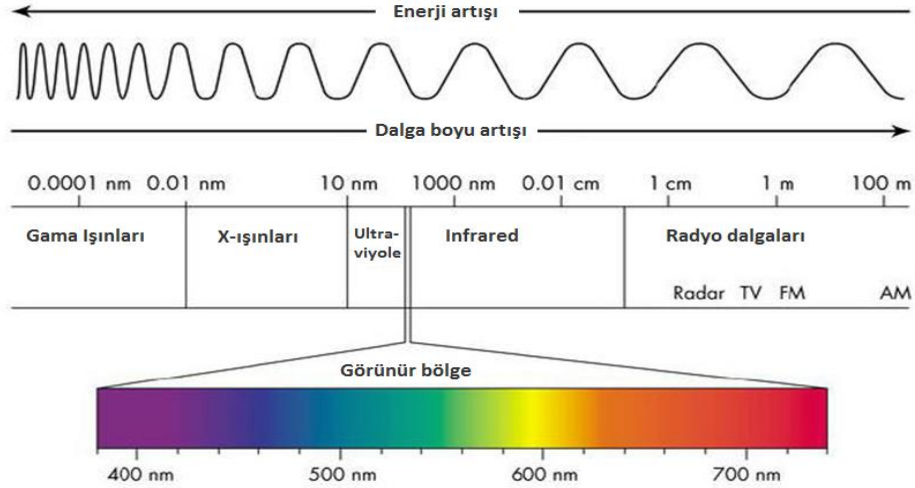
Denklem 3.2'deki absorplanan foton miktarı,

$$I_a = I_0 - I_t \quad 3.3$$

Denklem 3.3'de I_0 , örneğin üzerine gelen ışık şiddeti, I_t ise ışının örnekten geçtikten sonraki şiddetidir. 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 [148].

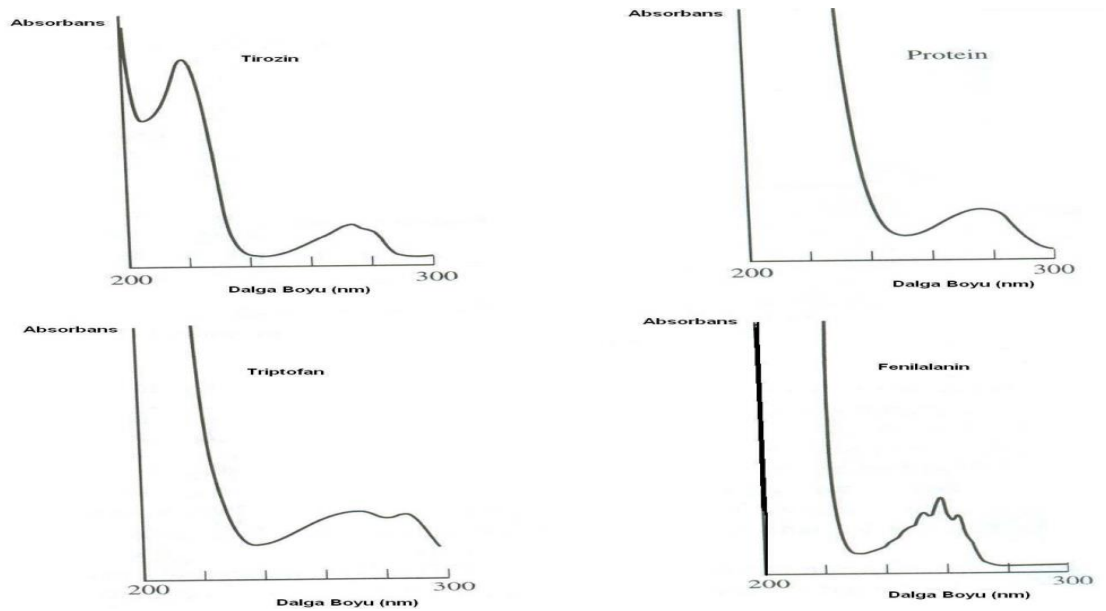
3.2.1.4 UV-VIS Spektroskopisi

UV-VIS Spektroskopisi, çözelti içindeki bilinmeyen maddelerin tanımlanmasında ve bilinen maddelerin konsantrasyonunun tayin edilmesinde kullanılır. Biyolojik olarak öneme sahip olan bir çok molekülün UV-VIS bölgede ışığı absorplama özelliği bulunmaktadır.



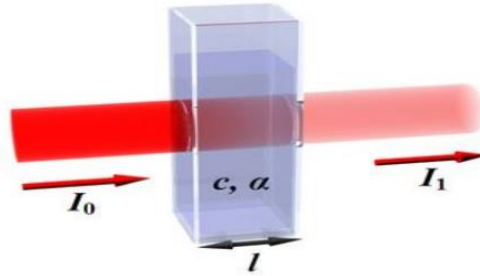
Şekil 3.5 Dalga Boyu ve Görünür Bölge Diyagramı

Proteinler UV bölgede iki absorbans pikine sahiptirler: a) Peptid bağının absorpsiyonundan kaynaklanan ve yaklaşık 205 nm’de ölçülen [149], (b) İçerdikleri Tirozin (fenol) ve Triptofan (indol) amino asitlerinden dolayı 280 nm’de absorbansa sahiptirler.



Şekil 3.6 Amino asitlerin Absorbans Verdiği Dalga Boyları Grafikleri [150]

Ultraviyole (100-400nm) ve görünür ışık (400-700nm) (UV-VIS) absorpsiyon spektroskopisinde, bir ışın demeti bir örnekten geçtikten veya bir örnek yüzeyinden yansıtıldıktan sonraki azalma ölçülür.



Şekil 3.7 Spektrofotometre prensibi [151]

Monokromatik ve I_0 şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Işımanın şiddetindeki bu azalma moleküllerin o dalga boyundaki ışığı absorplaması sonucu ortaya çıkar ve absorpsiyon **LAMBERT-BEER** eşitliği ile verilir:

$$I = I_0 \times e^{-kc}$$

3.4

I : Geçen ışının şiddeti

I_0 : Gelen ışının şiddeti

k : Absorpsiyon katsayısı

c : Konsantrasyon

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

Bu metod kullanılarak:

- Molekülün yapısı hakkında bilgi edinilebilir; özellikle UV alandaki absorpsiyon önemlidir,
- Konsantrasyon (derişim) belirlenebilir,
- Kimyasal reaksiyonun gidişi izlenebilir,
- Enzim aktivitesi ölçülebilir [152].

3.2.1.5 Floresans Enerji Transferi Yöntemi İle Mesafe Hesabı

Bu tez çalışmasında kullanılan peptidlerden A β (1-21) 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 17. amino asit rezidüsü olarak akseptör molekülünün bağlanacağı **Lizin** amino asidinin bulunmasıdır. Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi için boya olarak, alifatik ve aromatik aminlerdeki birincil amino grupları ile reaksiyona giren Dansil Klorür (DNC) seçilmiştir. Biyokonjugat oluşumu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile ispatlanan, A β (1-21) peptid dizisinin poliakrilik asit ile sentezlenen biyokonjugatı liyofilizatör ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kuru haldeki bu konjugat, konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde pH=9,2 Borat tamponunda çözülmüştür. Ayrıca DNC ise, başka bir beherde konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde Asetonitrilde çözülmüştür. Hem peptid hem de biyokonjugat için boyanın inkübasyon (karanlık ortamda) süresi optimize edilmiş ve 1 dakika olarak bulunmuştur.

3.2.1.6 Modelleme Çalışmaları

Biyolojik aktiviteye sahip olan birçok makromolekülün, organizmadaki işlevi onun uzaydaki 3 boyutlu yapısı ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle de biyolojik moleküllerin nasıl etkileştiğini anlamada moleküllerin üç boyutlu yapılarının bilinmesinin önemi büyüktür. Doğadaki bütün biyolojik olayların en kararlı hali en düşük enerjili hallerine karşılık gelir. Biyolojik moleküller de fonksiyonlarını ancak bu en düşük enerjili konformasyonlarında yerine getirebilirler. Yani, biyolojik fonksiyon gerçekleştiren (biyolojik aktif) bir molekül, en düşük enerjili (kararlı) konformasyonlarından birinde bulunur. O halde, molekülün tüm konformasyonları arasından kararlı olanları belirlemek gerekmektedir. Teorik Konformasyon Analizi Yöntemi, molekül içindeki tüm etkileşimleri dikkate alarak molekülün toplam enerjisini ifade eden ve kararlı konformasyonları belirleyen bir yöntemdir. Bu yöntemle, biyolojik moleküllerin mümkün konformasyonları ve bu konformasyonların enerjilere göre dağılımları belirlenerek, bu bilgiler ışığında moleküllerin çalışma ya da çalışmama mekanizmalarına

açıklık getirilebilir. Biyolojik moleküllerin üç boyutlu yapılarının değişmesine bağlı olarak, fonksiyon kaybı meydana gelmekte bu da hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik reaksiyonların gerçekleşmesiyle ilgili sorulara açıklık getirebilmek için etkileşmekte olan moleküllerin konformasyonlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [153]. Alzheimer hastalığında oluşan fibrillerin 3 boyutlu yapılarındaki değişimlerinin incelenmesi ve anlaşılması, bu hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde büyük öneme sahiptir [154]. Özellikle son yıllarda moleküler alanda yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar, bu hastalığın nedeninin A β peptidindeki yanlış katlanma sonucu meydana gelen agregasyonlar olduğunu göstermektedir. Çünkü biriken bu A β agregatları, toksiktir ve sonunda beyindeki sinir hücrelerinin ölmesine ile sonuçlanır [155]. Bu tez çalışmasında, Amiloid beta peptidinin birbiriyle bağlanma ve fibril oluşturma eğiliminde olduğu bilinen (1-21) peptid dizisinin moleküler modelleme çalışmaları ile, konjugat oluşumundaki en düşük enerjili konformasyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

3.2.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan Amiloid beta (A β) peptid dizileri

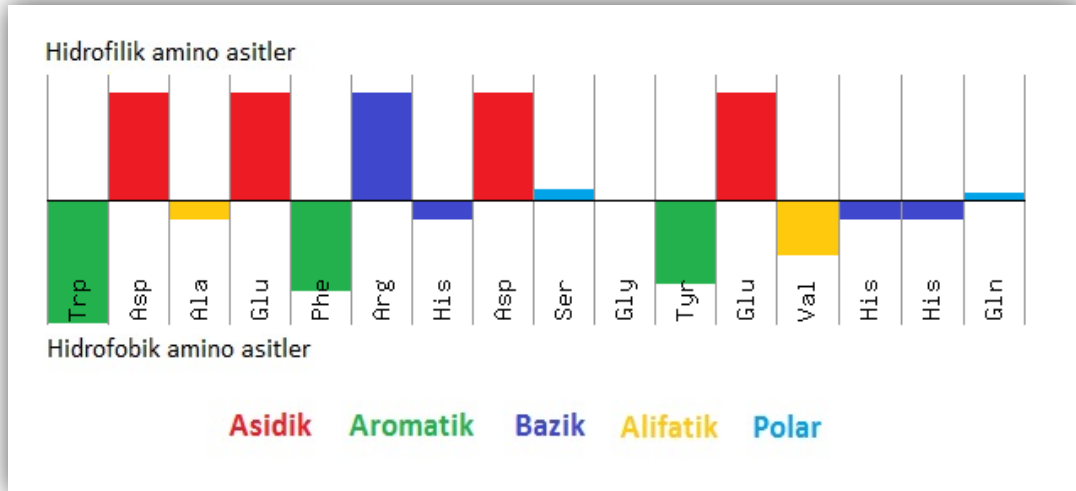
Özellikle A β agregasyonunu önleyecek peptido-mimetik inhibitörler veya peptidlerin geliştirilmesinde, 42 amino asitlik tüm diziyi kullanmak yerine, daha kısa A β fragmentlerinin seçilmesi son yıllarda çok ilgi gören bir konudur [156]. Buradan hareketle, bu tez çalışmasında Alzheimer hastalığına ait 42 amino asitlik A β peptidinin 1-21 dizisi ve 1-15 dizisi olmak üzere, 2 farklı peptid dizisi ile çalışılmıştır. Tjenberg ve ark. A β peptidinin birbiriyle bağlanarak fibriller oluşturduğu düşünülen en aktif bağlanma bölgesinin A β 16-20 (KLVFF) dizisi olduğunu göstermişlerdir [157]. Bu nedenle bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilen dizilerden bir tanesi, A β 1-21 dizisi bu aktif bağlanma bölgesini (KLVFF) de içermektedir. Ayrıca diziler seçilirken her iki peptid dizisinin de –N terminal ucuna, peptid ile polielektrolitler arasındaki konjugasyon mekanizmasını daha kolay saptayabilmek ve konjugasyon oluşumunu spektroskopik olarak gözlemleyebilmek amacıyla Triptofan (W) amino asidi eklenmiştir. Böylelikle peptidlerin ve ilerde sentezlenecek biyokonjugatların floresans spektrofotometre cihazı ile incelenmesine olanak sağlanmıştır. Bu peptid dizilerinin genel özellikleri aşağıda verilmiştir.

3.2.2.1 Amiloid Beta (1-15) Peptid Dizisinin Kimyasal Özellikleri

42 amino asitlik Amiloid beta peptidinin (A β 42) epitop analizi yapıldığında, A β (1-15) dizisi A β 42'nin dominant B hücresi epitopu olduğu ve bu dizinin A β 42 gibi T-hücresi reaktif bölgelerini içermediği bulunmuştur [158]. Bu nedenle A β (1-15) bir aşı modeli olarak da kullanılabilir [156]. Bu tez çalışmasında kullanılan A β (1-15) peptid dizisi BioSynthesis (USA) firması tarafından amino ucuna W eklenerek sentezlenmiştir. Toplam 16 amino asitten oluşan bu peptidin amino ait dizilimi ve hidrofobik/hidrofilik karakteri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.3 A β (1-15) Dizisinin Genel Özellikleri

A β (1-15) Dizisinin Genel Özellikleri	
Dizinin tek harf gösterimi	WDAEFRHDSGYEVHHQ
Dizinin üç harf gösterimi	Trp - Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln
Dizinin molekül ağırlığı	2012.9 gr/mol
pH 7'deki net yükü	-2.7
İzoelektrik noktası (pI)	5.12



Şekil 3.8 P1 peptidinin hidrofilik ve hidrofobik amino asit içeriğinin şematik gösterimi

Bu dizide yer alan amino asitlerin diziye kattıkları kimyasal özellikler ve bu peptidin sulu çözeltideki davranışlarına olan etkileri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır. Dizinin N-ucunda bulunan, hidrofobik (suyu sevmeyen) ve non-polar özellikteki amino asit olan Triptofan (Trp), 280 nm'de UV ışını absorblama özelliğinden dolayı bu diziye floresans özellik kazandırmaktadır. Ayrıca Trp, bu peptidin sulu çözeltideki etkileşimlerinde

peptid dizisindeki diğer hidrofobik amino asitlerle etkileşerek peptidin iç kısımlarına çekilir ve H bağı, aromatik halka etkileşimi ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerde yer alarak peptidin yapısını stabilize etmeye yardımcı olur. Dizinin diğer hidrofobik ve apolar amino asitleri olan Fenilalanin (Phe) ve Tirozin (Tyr)'de içerdikleri fenolik gruplar sayesinde UV ışını absorblama özelliğine sahiptir ancak bu absorpsiyonun miktarı ve kuantum verimi Trp'a göre daha azdır. Phe reaktif olmayan bir amino asit olmasına rağmen, sahip olduğu indol halkası dolayısıyla Trp eğer çözeltide ulaşılabilir bir noktadaysa oldukça reaktiftir[129]. Bu üç aromatik amino asitte sahip oldukları konjuge çift bağlar nedeni ile 260-280 nm dalga boyundaki UV-ışınları absorbe ederek onlara özgü pik verirler. Tirozin (Tyr), fenil grubuna hidroksil grubu bağlanmış fenilalanin yapısında amino asittir. Tirozin amino asidi hidrofobik olmakla birlikte içerdği – OH grubuyla hidrojen bağı oluşturabilir ve peptidin yaptığı H bağlarına katkıda bulunur. Glisin (Gly), amino asitlerin en basit yapısı ve en az interaktif olanıdır çünkü yan zincirinde fonksiyonel grup olarak sadece H atomu yer alır. Glisin bulunduğu yerde bu peptide diğer amino asitlerden daha fazla fleksibilite vermektedir. Alanin (Ala) ve Valin (Val) gibi oldukça hidrofobik yan zincire sahip amino asitler ise, sulu çözeltide bir araya gelerek, bu peptid dizisinin hidrofobik etkileşimlerle sabitlenmesine yardımcı olurlar. Dizinin Serin (Ser) ve Glutamin (Gln) gibi polar yan zincire sahip amino asitleri; peptidin suda çözünürlüğünü arttıırırlar. Çünkü suda diğer aminoasitlere göre daha iyi çözünürler, yani daha hidrofilik bir yapıya sahiptirler. Ayrıca Serin'in taşıdığı hidroksil grubu H alıcısı olduğundan hidrojen bağları oluşumunu destekler. Peptid dizisinin kovalent modifikasyonu ve konjugasyon mekanizması düşünüldüğünde; en önem teşkil eden amino asitler; dizinin iyonize olabilen yan zincire sahip olan amino asitleri olan Aspartik asit (Asp), Glutamik Asit (Glu), Arjinin (Arg), Histidin (His) ve Tirozin (Tyr)'dir [129]. Asp ve Glu, yan zincirde –COOH fonksiyonel grubunu taşırlar ve pKa değerleri o kadar düşüktür ki (Asp pKa = 3.86, Glu pKa=4.25) peptidin yapısına katıldıklarında bile fizyolojik pH'da (-) yükleri korunur. Yüksek polarite ve çözünürlükleri sebebiyle, peptidin dış kısımlarında yer alarak iyonik ve hidrojen bağ oluşumuna katkı sağlarlar. Ayrıca bu iki amino asit, BSA gibi -NH₂ fonksiyonel grubuna sahip taşıyıcılar ile kovalent olarak bağlanarak konjugasyona katkı sağlarlar. Arg ise, yan zincirindeki guanidino grubu nedeniyle çok kuvvetli bazik özelliğe sahiptir. Yan zincirin pKa değeri çok yüksek (Arg pKa=12.48) olduğundan, hemen hemen bütün koşullarda Arg pozitif

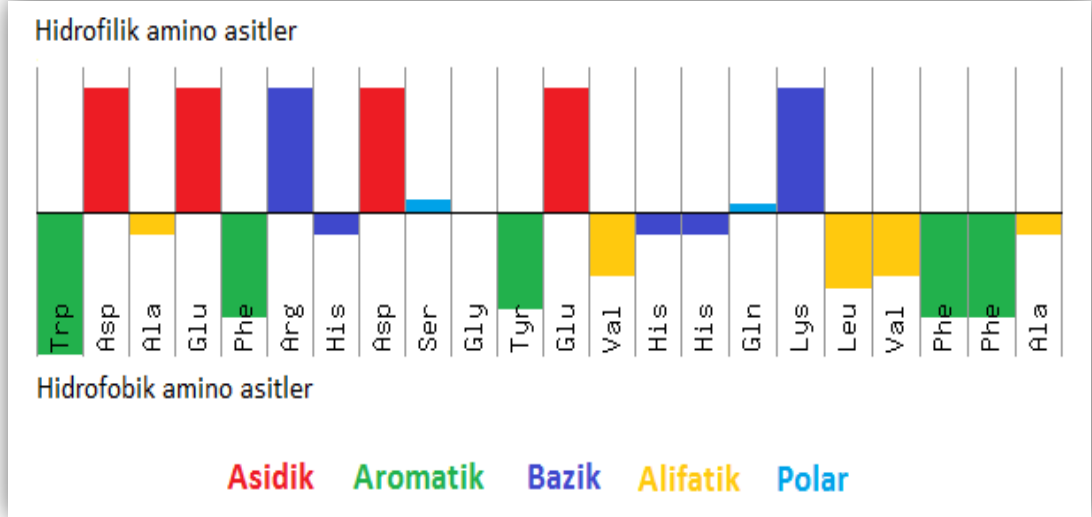
yük taşımaktadır. His'in taşıdığı imidazol grubu, hem H alıp, hem de H verme özelliğindedir. Yan zincirde taşıdığı imidazol halkasının pKa değeri (pKa=6,0), fizyolojik pH'a çok yakın olduğundan fizyolojik pH'da en yüksek tamponlama etkisine sahip amino asiddir.

3.2.2.2 Amiloid Beta (1-21) Peptid Dizisinin Kimyasal Özellikleri

Tjenberg ve ark. yaptıkları çalışmalarla, 42 amino asitlik A β peptidinin birbiriyle bağlanarak fibriller oluşturduğu düşünülen en aktif bağlanma bölgesinin A β 16-20 (KLVFF) dizisi olduğunu göstermişlerdir[157]. Bu nedenle bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilen A β 1-21 dizisi bu aktif bağlanma bölgesini (KLVFF) içermektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan A β (1-21) peptid dizisi BioSynthesis (USA) firması tarafından amino ucuna W eklenerek sentezlenmiştir. Toplam 22 amino asitten oluşan bu peptidin amino ait dizilimi ve hidrofobik/hidrofilik karakteri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Amino asitler içerisinde yan dalları yüklü olan dört amino asit bulunmaktadır (Arg, Lys, Glu, Asp). Lizin ve Arginin yan zincirlerinde amino grubu içerirler ve pozitif yüklüdürler. Aspartik asit ve Glutamik asit yan zincirlerinde karboksil grubu içermektedirler ve negatif yüklüdürler. Peptid zincirindeki yüklü amino asitler arasında kuvvetli elektrostatik etkileşmeler meydana gelmektedir ve buda molekülün enerjisine katkı sağlamaktadır [153].

Çizelge 3.4 A β (1-21) Dizisinin Genel Özellikleri

A β (1-21) Dizisinin Genel Özellikleri	
Dizinin tek harf gösterimi	WDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA
Dizinin üç harf gösterimi	Trp - Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala
Dizinin molekül ağırlığı	2719.9 gr/mol
pH 7'deki net yükü	-1.7
İzoelektrik noktası (pI)	5.75

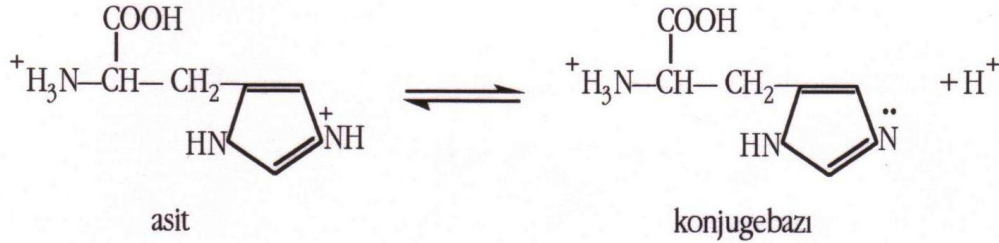


Şekil 3.9 Aβ peptidi 1-21 peptidinin hidrofilik ve hidrofobik amino asit içeriğinin şematik gösterimi

Bu dizinin kimyasal reaksiyonlar ve konjugasyon açısından önem taşıyan özellikleri ve bu peptidin sulu çözeltideki davranışlarına olan etkileri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır. Lizin (Lys) ve peptidin N-ucunun konjugasyona etkisi şöyledir: Lys'in yan zincirinde bulunan primer amin grubu ve peptidin N-ucunda yer alan amin grubu, konjugasyon reaksiyonları açısından değerlendirildiğinde, en önemli aktif bağlanma bölgeleri arasında yer almaktadır. Lys çoğunlukla peptidin dış yüzey kısmında bulunur ve bu durum konjugasyon sırasındaki bağlanmayı kolaylaştırır. Ayrıca Lys'deki primer amin grubunun nükleofilikliği, Sisteindeki sülfidril, Serin ve Treonin'deki hidroksil ve Histidindeki imidazol gibi diğer amino asitlerdeki başka nükleofilik gruplara göre çok daha yüksektir. Bu nedenle de, peptid dizisindeki Lys, elektrofilik bir atakta her zaman daha çok tercih edilen residüdür. Lys içeren bir amino asitte, konjugasyonun N-ucu amino grubundan mı yoksa Lys yan zincir amino grubundan mı gerçekleşeceği ortamın pH değerine göre belirlenebilir. N-ucu NH₃ grubu pKa değeri yaklaşık 7,6-8,0 iken, Lys yan zincir NH₃ grubu pKa değeri yaklaşık 10,0 – 10,2'dir. Eğer konjugasyon reaksiyonlarının yapıldığı çözeltinin pH değeri 8,5 – 9.0 gibi Lys'ne göre düşük bir değerde tutulursa, ozaman konjugasyon direkt olarak N-ucundan gerçekleşebilir [159]. Dizinin N-ucunda bulunan, hidrofobik (suyu sevmeyen) ve non-polar özellikteki amino asit olan **Triptofan (Trp)**, 280 nm'de UV ışını absorblama özelliğinden dolayı bu diziye floresans özellik kazandırmaktadır. Ayrıca Trp, bu peptidin sulu çözeltideki

etkileşimlerinde peptid dizisindeki diğer hidrofobik amino asitlerle etkileşerek peptidin iç kısımlarına çekilir ve H bağı, aromatik halka etkileşimi ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerde yer alarak peptidin yapısını stabilize etmeye yardımcı olur. Dizinin diğer hidrofobik ve apolar amino asitleri olan **Fenilalanin (Phe) ve Tirozin (Tyr)**'de içerdikleri fenolik gruplar sayesinde UV ışını absorblama özelliğine sahiptir ancak bu absorpsiyonun miktarı ve kuantum verimi Trp'a göre daha azdır. Phe reaktif olmayan bir amino asit olmasına rağmen, sahip olduğu indol halkası dolayısıyla Trp eğer çözeltide ulaşılabilir bir noktadaysa oldukça reaktiftir[129]. Bu üç aromatik amino asitte sahip oldukları konjuge çift bağlar nedeni ile 260-280 nm dalga boyundaki UV-ışınları absorbe ederek onlara özgü pik verirler. **Tirozin (Tyr)**, fenil grubuna hidroksil grubu bağlanmış fenilalanin yapısında amino asittir. Tirozin amino asidi hidrofobik olmakla birlikte içerdği – OH grubuyla hidrojen bağı oluşturabilir ve peptidin yaptığı H bağlarına katkıda bulunur. **Glisin (Gly)**, amino asitlerin en basit yapılı ve en az interaktif olanıdır çünkü yan zincirinde fonksiyonel grup olarak sadece H atomu yer alır. Glisin bulunduğu yerde bu peptide diğer amino asitlerden daha fazla fleksibilite vermektedir. **Alanin (Ala), Lözin (Leu) ve Valin (Val)** gibi oldukça hidrofobik yan zincire sahip amino asitler ise, sulu çözeltide bir araya gelerek, bu peptid dizisinin hidrofobik etkileşimlerle sabitlenmesine yardımcı olurlar. Dizinin **Serin (Ser) ve Glutamin (Gln)** gibi polar yan zincire sahip amino asitleri; peptidin suda çözünürlüğünü arttırırlar. Çünkü suda diğer aminoasitlere göre daha iyi çözünürler, yani daha hidrofilik bir yapıya sahiptirler. Ayrıca Serin'in taşıdığı hidroksil grubu H alıcısı olduğundan hidrojen bağları oluşumunu destekler. Peptid dizisinin kovalent modifikasyonu ve konjugasyon mekanizması düşünüldüğünde; en önem teşkil eden amino asitler; dizinin iyonize olabilen yan zincire sahip amino asitleri olan: **Aspartik asit (Asp), Glutamik Asit (Glu), Arjinin (Arg), Histidin (His) ve Tirozin (Tyr)**'dir [129]. Asp ve Glu, yan zincirde –COOH fonksiyonel grubunu taşırlar ve pKa değerleri o kadar düşüktür ki (Asp pKa = 3.86, Glu pKa=4.25) peptidin yapısına katıldıklarında bile fizyolojik pH'da (-) yükleri korunur. Yüksek polarite ve çözünürlükleri sebebiyle, peptidin dış kısımlarında yer alarak iyonik ve hidrojen bağ oluşumuna katkı sağlarlar. Ayrıca bu iki amino asit, BSA gibi –NH₂ fonksiyonel grubuna sahip taşıyıcılar ile kovalent olarak bağlanarak konjugasyona katkı sağlarlar. **His**'in taşıdığı imidazol grubu, hem H alıp, hem de H verme özelliğindedir. Yan zincirde taşıdığı imidazol halkasının pKa değeri (pKa=6,0), fizyolojik pH'a çok yakın olduğundan

fizyolojik pH'da en yüksek tamponlama etkisine sahip amino asiddir. Bir proteinin yapısına girdiğinde iyonik çevrenin özelliğine göre pozitif yüklenebilir. His, β -karbonunda bir imidazol grubu taşır. Bu grup, asit-baz regülasyonunda tamponlamada önem taşır.



Şekil 3.10 Amino asitlerin konjuge baz reaksiyonu

Arg ise, yan zincirindeki guanidino grubu nedeniyle çok kuvvetli bazik özelliğe sahiptir. Yan zincirin pKa değeri çok yüksek (Arg pKa=12.48) olduğundan, hemen hemen bütün koşullarda Arg pozitif yük taşımaktadır.

3.2.3 Konjugasyonlarda Kullanılan Farklı Kimyasal Özelliklerdeki Taşıyıcı Makromoleküller

Zayıf immunojenik özellikteki sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için proteinler, polisakkariter ve lineer özellikteki polimerler kullanılmaktadır [160]. Bu çalışmada, her iki peptid dizisi ile yapılan biyokonjugatların sentezinde taşıyıcı olarak farklı kimyasal özelliklere sahip, 3 ayrı kategoride makromolekül kullanılmıştır:

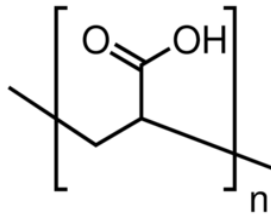
- a) Polimerik yapıdaki taşıyıcılar
 - Poliakrilik Asid (PAA),
 - Vinil Pirilidon- Akrilik Asid Kopolimeri P[(VP-co-AA)] veya (VPAA)
- b) Protein yapıdaki taşıyıcılar
 - Bovine Serum Albumin (BSA)
- c) Polisakkarit yapıdaki taşıyıcılar
 - Dekstran Aldehid (DA)'dir.

Bu tez çalışmasında yukarıda bahsedilen 4 farklı taşıyıcı makromolekül kullanılarak; farklı başlangıç molar oranlarında ve farklı pH'larda aktivasyon yöntemleri ile çok sayıda konjugat ve fiziksel kompleks sentezi yapıldı. Genel olarak bütün reaksiyonlarda konjugasyonun fizikokimyasının ve bağlanmanın ne derecede gerçekleştiğinin anlaşılabilmesi amacıyla; bu taşıyıcı makromoleküllerin konsantrasyonunu sabit tutularak (0.5 mg/mL), peptidlerin konsantrasyonu değiştirilmiştir.

3.2.3.1 Polimerik Yapıdaki Taşıyıcılar

3.2.3.1.1 Poliakrilik Asit (PAA)

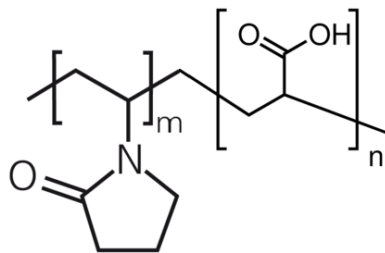
Poliakrilik asit (PAA), yan zincirinde fonksiyonel grup olarak $-\text{COOH}$ grubu içeren, suda çözünebilen, lineer yapıda biyobozunur özellikte bir biyopolimerdir. Toksik değildir ve biyoyumlu bir yapıya sahiptir. Molekül ağırlığı, $M_{\text{PAA}} = 100\,000\text{ Da}$ 'dur.



Şekil 3.11 Poliakrilik asidin molekül formülü

3.2.3.1.2 N-Vinil-2-pirolidon/Akrilik Asit Kopolimeri

Konjugasyonda vinilpirolidonun (VP) akrilik asit (AA) ile $M_w: 80000\text{ Da}$ ve kompozisyonu VP/AA (1:2) olan kopolimeri kullanılmıştır ve bu kopolimer Uelzmann ve arkadaşlarının (1958) yöntemi ile sentezlenmiştir.

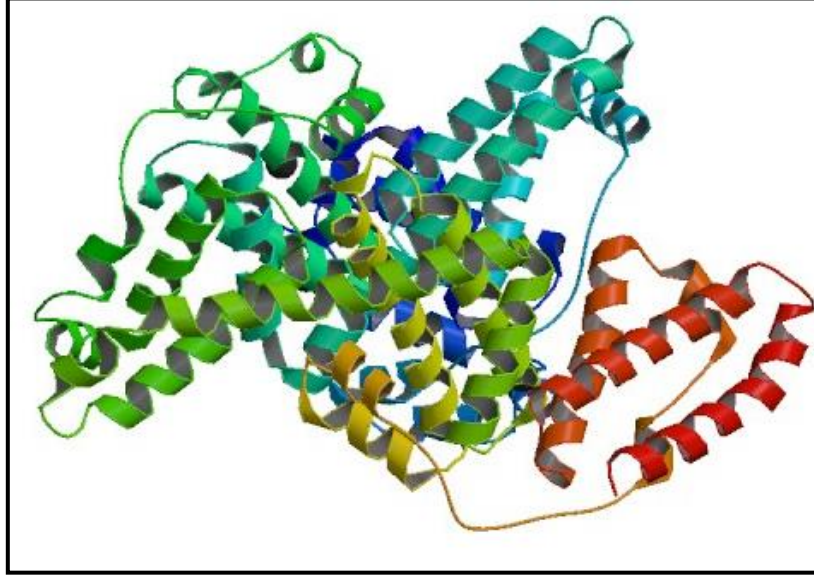


Şekil 3.12 Vinil prilidon-akrilik asit kopolimerinin molekül formülü

3.2.3.2 Protein Yapıdaki Taşıyıcılar

3.2.3.2.1 Bovine Serum Albumin (BSA)

Bovin Serum Albumin (BSA), yaklaşık 66000 Da ağırlığında, 583 aminoasidden oluşan globular yapıda bir plazma proteinidir [161]. Kalp şeklini andıran ve 3 ayrı alt-domainden oluşan 3 boyutlu yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir:



Şekil 3.13 BSA'nın 3 boyutlu yapısı

Amino asit diziliminde 17 adet Cys ve 2 adet Trp bulunmaktadır. BSA aynı zamanda Asp, Glu, Ala, Leu and Lys kalıntıları bakımından zengindir. İçerdiği amino asitlerden dolayı taşıdığı çok çeşitli fonksiyonel gruplar nedeniyle konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler yada haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir. İzoelektrik noktası suda 4,7'dir [162]. Çalışmamızda kullanılan BSA'nın fluoresans özelliği; yapısında 134 ve 212 pozisyonlarda bulunan iki adet Triptofan'dan kaynaklanmaktadır. Bunlardan 134. konumdaki Triptofan daha dışta olduğundan etkileşimlere daha açıktır. 212. konumdaki Trp ise molekülün daha içinde kalmaktadır [163].

3.2.3.3 Polisakkarid Yapıdaki Taşıyıcılar

3.2.3.3.1 Dekstran Aldehid (DA)

Dekstran doğada bulunabilen, biyobozunur, inert ve toksik özelliği olmayan bir polimerdir. Bu özelliklerinden dolayı dekstran ve türevleri biyolojik birçok uygulamada kullanılmaktadır [164], [165], [166]. 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 [167]. 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 [129].

4.1 Dekstran Aldehid Türevinin Eldesi

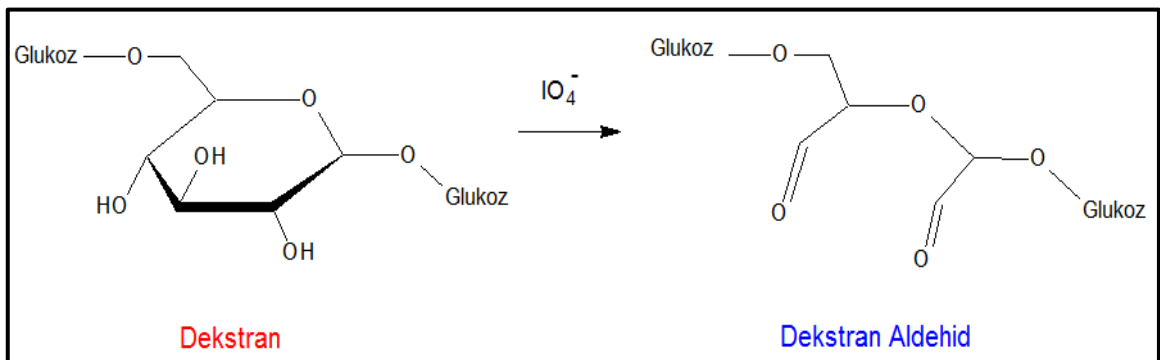
Reaksiyon şeması Şekil 4.1’de gösterilen Dekstran-Aldehit türevinin eldesi şu aşamalar gerçekleştirilerek yapıldı:

Kullanılan Çözeltiler

- 1) 3,33g Dekstran 30ml destile suda çözüldü.
- 2) 8 g NaIO₄ 70ml destile suda çözüldü.

Deneyin Yapılışı

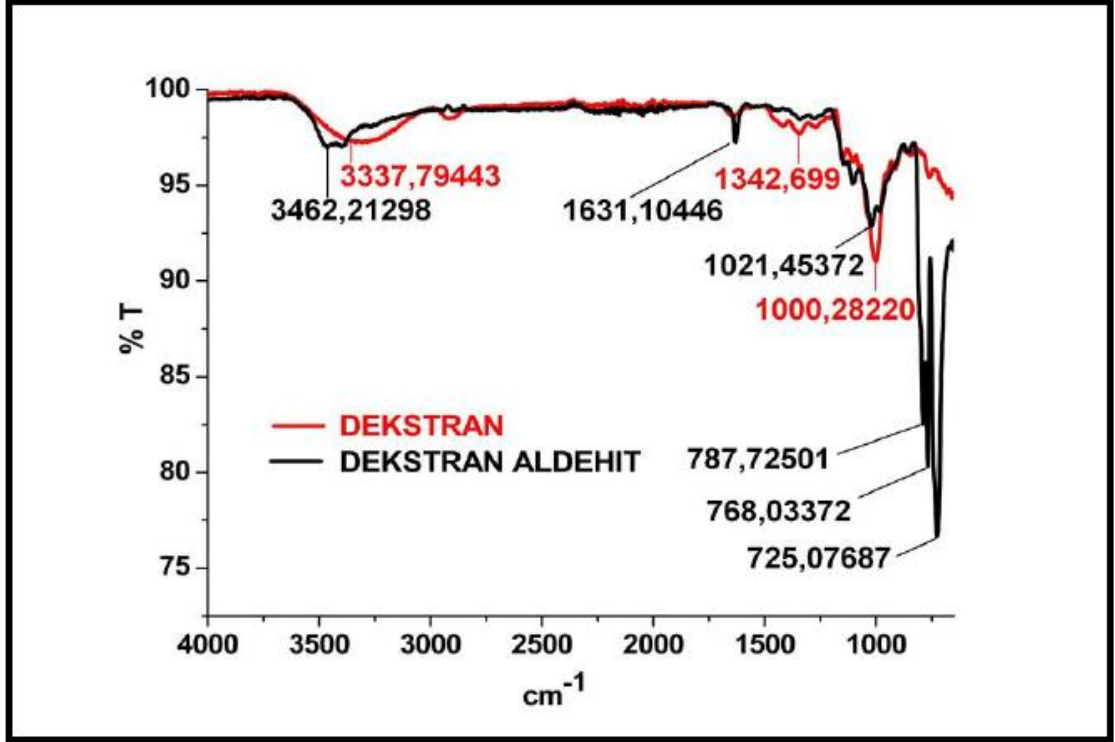
- 1) Dekstran çözeltisinin üzerine NaIO₄ yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- 2) Bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyoofilizatörde) aldehid grupları bulunduran dekstran elde edildi [168].



Şekil 4.1 Dekstran Aldehid türevinin eldesi

4.1.1 Sentezlenen DA Türevinin FTIR Analizi ile Karakterizasyonu

Dekstran ve dekstranın periyodat oksidasyonu ile elde edilen dekstran-aldehit türevinin FT-IR spektrumları Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Dekstran ve sentezlenen dekstran aldehite ait FTIR spektrumları

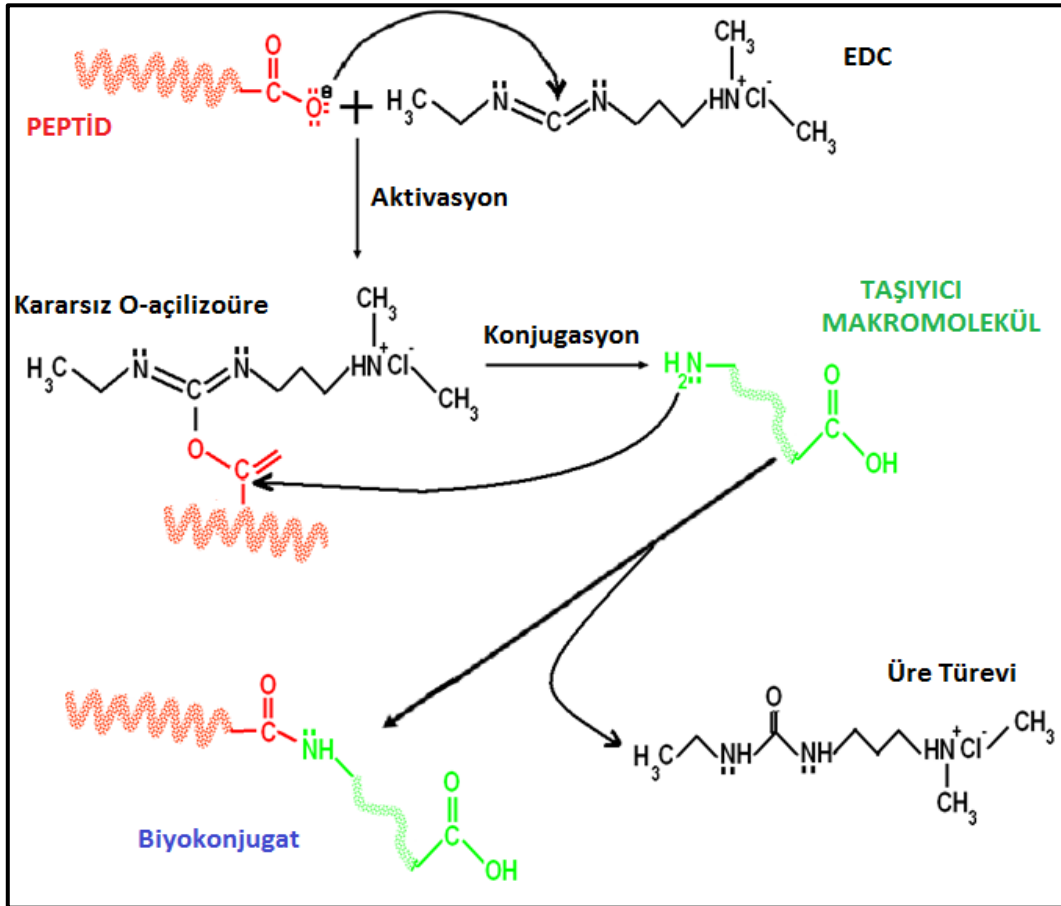
Dekstran ve dekstran-aldehit türevinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, dekstran-aldehite ait FT-IR spektrumunda 1631 cm^{-1} ’de C=O gerilmesine ait bir pikin olduğu görülmektedir. Bu bize dekstran aldehitin oluşturulduğunu ispat etmektedir.

4.2 Konjugasyon Yöntemleri

Peptid biyokonjugatlarının sentezlenmesinde, reaksiyon mekanizması birbirinden farklı olan 3 ayrı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler Amiloid beta peptidinin seçilen her iki dizisi ve farklı makromoleküller ile sentezlenmiştir. Her bir yöntemle sentezlenen biyokonjugatlar, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilerek, en iyi verime sahip konjugasyon yöntemi belirlenmiştir.

4.2.1 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Karbodiimid (EDC) Varlığında Yapılan Konjugasyonlar

Karboksil grubunun karbodiimide bağlı aktivasyon reaksiyonunun basit mekanizması, polimerin karboksil grubu ile proteinin amino grubu arasında gerçekleşen ve iki basamaktan oluşan bir kondenzasyon reaksiyondur [130]. Karbodiimid ilk olarak, polimer molekülündeki karboksil grupları ile reaksiyona girer ve oldukça aktif o-açil-izoüre ara ürününü meydana getirir. EDC ile aktive olan karboksil grupları, amid bağı oluşturmak üzere peptiddeki amino grubuna saldırır ve bu reaksiyondan suda çözünebilir özellikteki üre türevleri yan ürün olarak oluşur.



Şekil 4.3 Biyokonjugasyonun oluşum mekanizması [169]

Çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda oluşan izoüre ara ürünü ve reaktifin fazlası suda çözünebilir özellikte olduklarından, diyalizle ya da jel filtrasyonu ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir [129].

4.2.2 PAA ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları

4.2.2.1 Aβ (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Peptid-PAA konjugasyonlarında öncelikle EDC aktivasyonu farklı aşamalarda yapılmış, daha sonra da aktivasyonun yapıldığı pH değerleri değiştirilerek bağlanmanın en iyi olduğu yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Hesaplamalar

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün biyokonjugatlar $n_{\text{pep}}/n_{\text{pol}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, polimer ve diğer taşıyıcı moleküllerin konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki eşitlikten reaksiyon için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$n_{\text{peptid}} / n_{\text{PAA}} = [(C_{\text{peptid}} \times N_A) / M_w (\text{peptid})] \times [M_w (\text{PAA}) / C_{\text{PAA}} \times N_A] \quad 4.1$$

N_A = Avagadro sayısı

C_{pep} = Peptid konsantrasyonu

C_{pol} = Polimer konsantrasyonu

M_w = Molekül ağırlığı

Bu denklemde veriler yerlerine konulduğunda, reaksiyonlarda kullanılacak olan peptid miktarı;

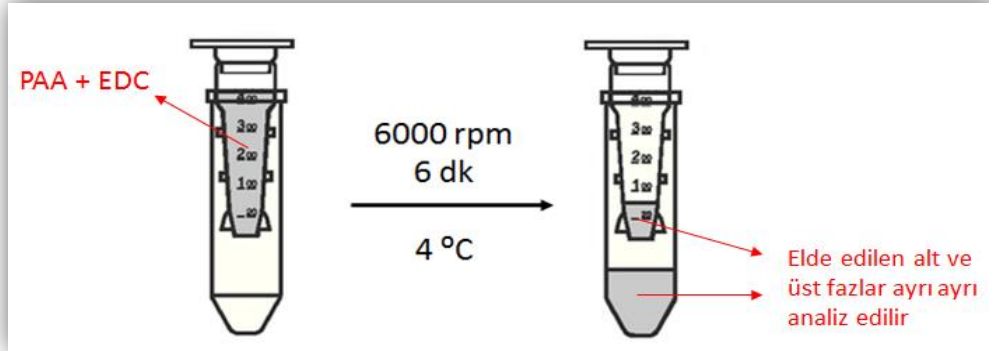
$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2719,9 \times 5) / 100000 \quad \Longrightarrow \quad C_{\text{peptid}} = 0,339 \text{ mg/5mL}$$

olarak bulunur. Daha sonra reaksiyon hacmine göre gerekli peptid miktarı ve kullanılacak aktivatör (EDC) miktarları belirlenir. Genellikle kullanılan taşıyıcı molekülün yaklaşık 2 katı kadar EDC kullanılmıştır. Bunun reaksiyon için bir sakıncası yoktur çünkü reaksiyona girmeyen EDC'nin fazlası, saflaştırma yöntemleri ile reaksiyon ortamında kolaylıkla ayrılabilir.

4.2.2.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar

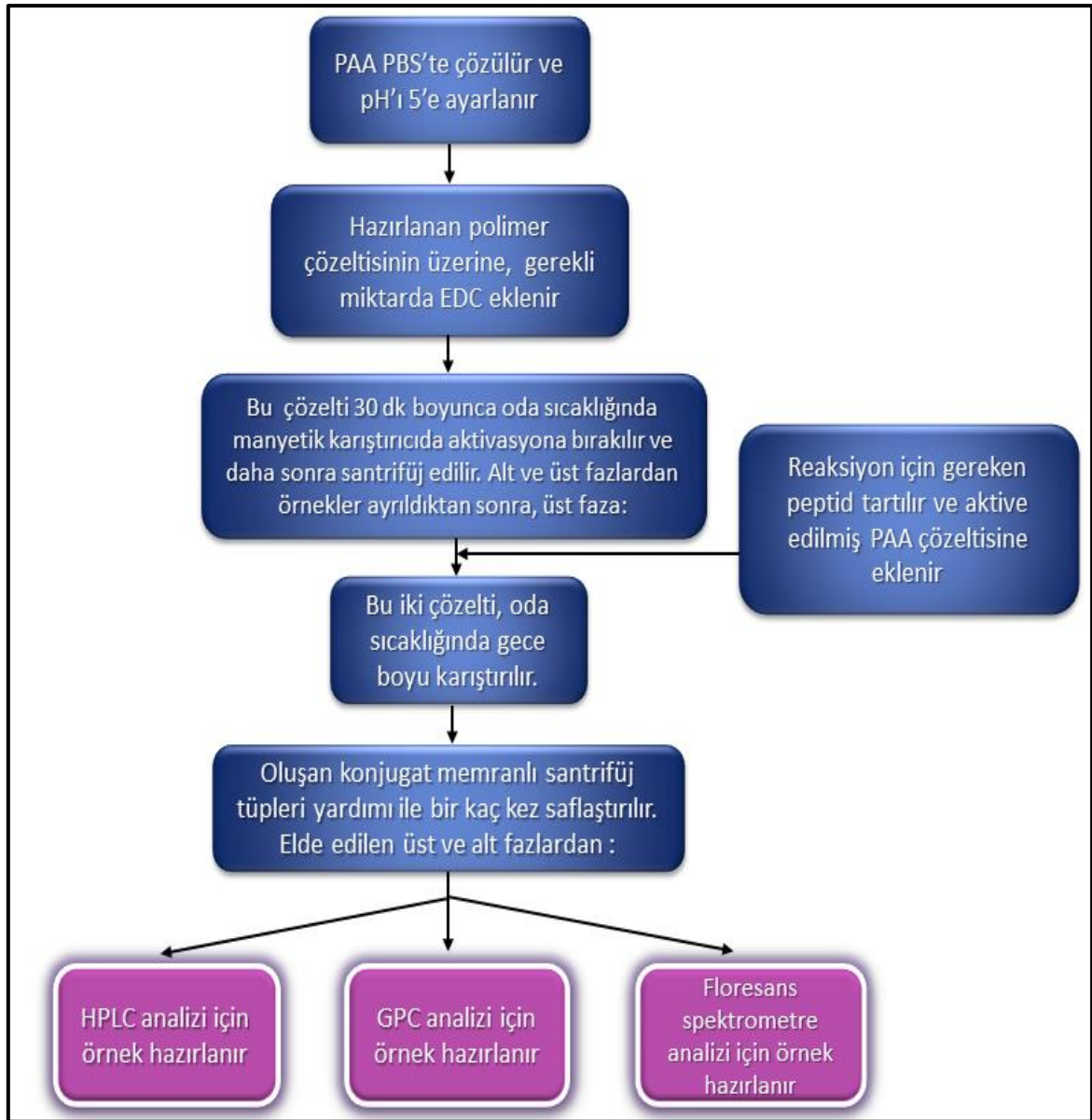
- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 10 mL pH 5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. Daha sonra pH 5'teki bu çözeltiye 10 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat kadar karıştırıldı. 1 saat sonra aktive olmuş PAA moleküllerinin reaksiyona girmeyen EDC moleküllerinden ayrılmasını sağlamak için membranlı santrifüj tüplerinden 6000 rpm'de, +4 °C'de 6 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst ve alt fazlarda analiz için örnekler ayrıldı.



Şekil 4.4 EDC ile aktive edilmiş PAA çözeltisinin PES membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi

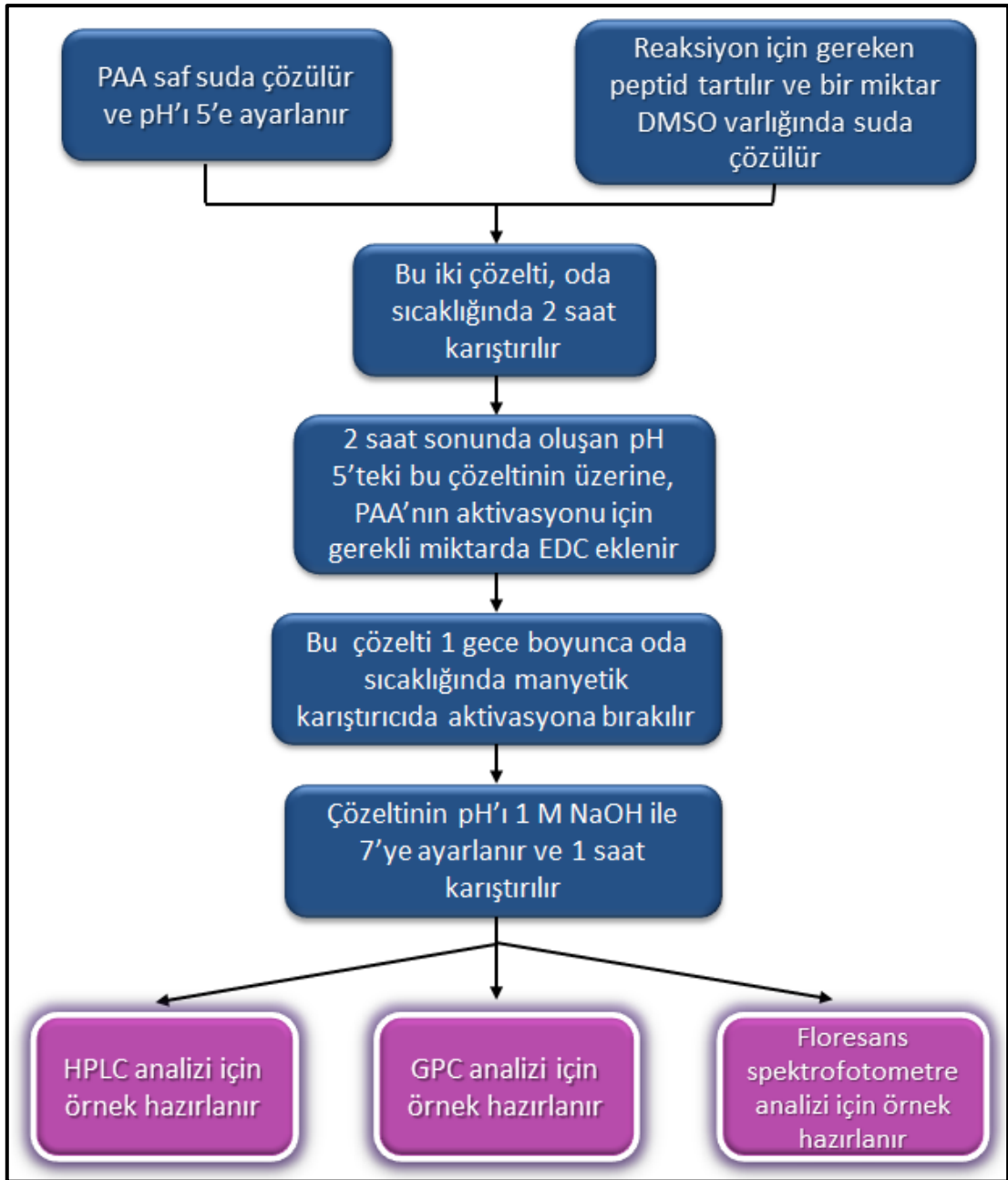
Örnek ayrıldıktan sonra, üst fazın geri kalanı alınarak üzerine, (125 µl dimetil sülfoksit DMSO'de çözüldükten sonra) son hacim tekrar 10 mL olacak şekilde PBS'te çözülmüş olan 0.68 mg Aβ 1-21 peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 gece boyunca, oda sıcaklığında konjugasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.



Şekil 4.5 Koşul1'e göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması

- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 9.277 mL pH 7 olan PBS'te çözöldü ve çözöltinin **pH'sı 5'e** ayarlandı. 0.68 mg A β 1-21 peptidi 125 μ l dimetil sülfoksit DMSO'de çözöldü ve karışmakta olan PAA çözöltisine eklendi. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra **pH 5'teki** fiziksel karışımına 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözöltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

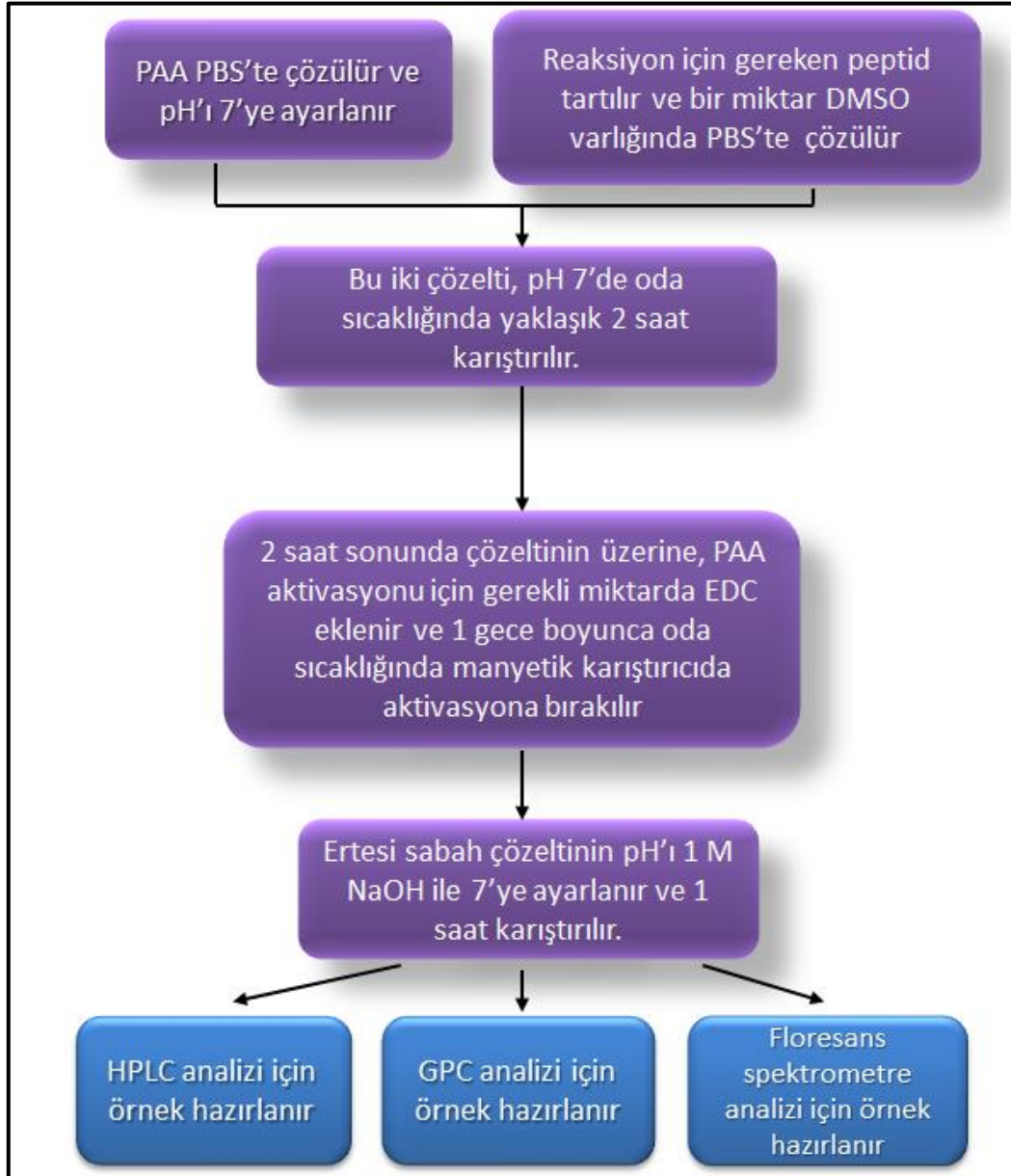


Şekil 4.6 Koşul2'ye göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması

- **Koşul 3'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

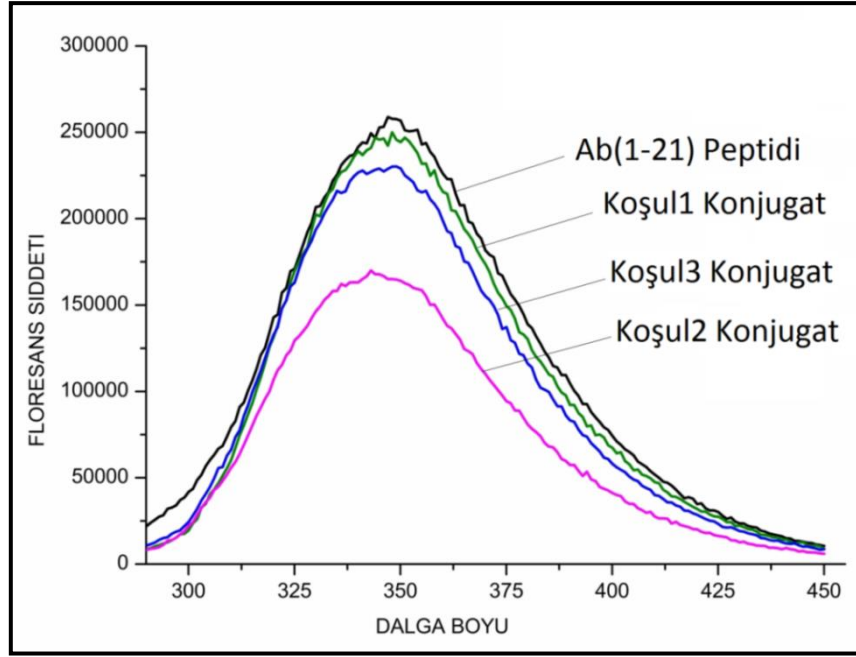
5 mg poliakrilik asid (PAA Mw=100000) 9.277 mL pH 7 olan PBS'te çözöldü ve çözöltinin **pH'sinin 7'de kalmasına** dikkat edildi. Polimer 15 dk kadar karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra, 125 µl DMSO'da çözölmüş olan 0.68 mg Aß 1-21 peptidi PAA çözöltisinin üzerine eklendi. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Oluşan fiziksel kompleksten analiz için örnekler ayrıldı. Daha sonra kalan çözöltiye **pH 7'de** 10 mg suda çözöünen 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı ilave edilerek gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı.

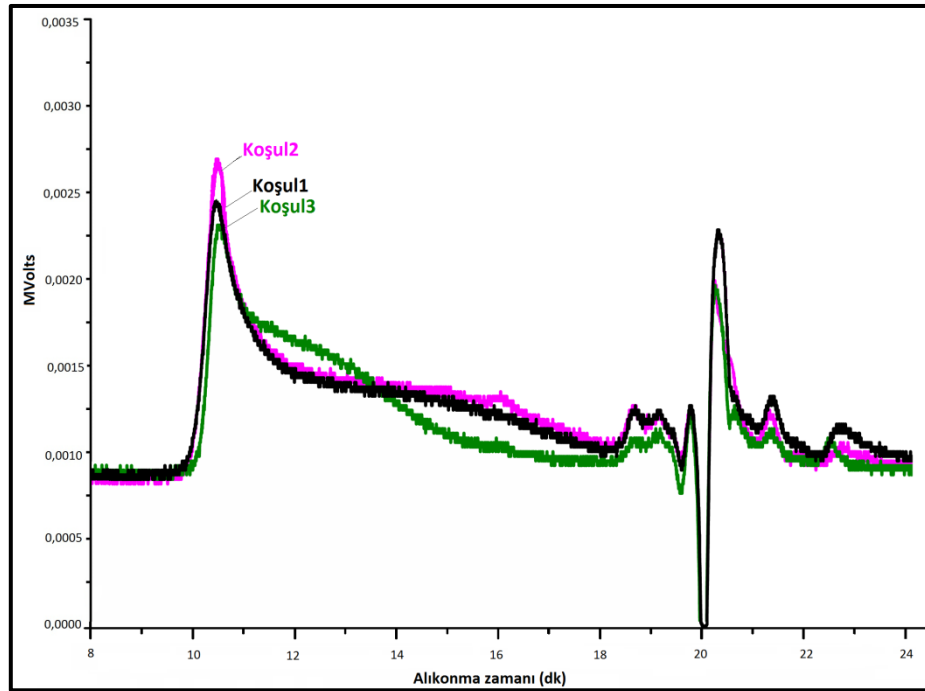


Şekil 4.7 Koşul 3'e göre gerçekleştirilen konjugasyonda takip edilen aşamaların akış şeması

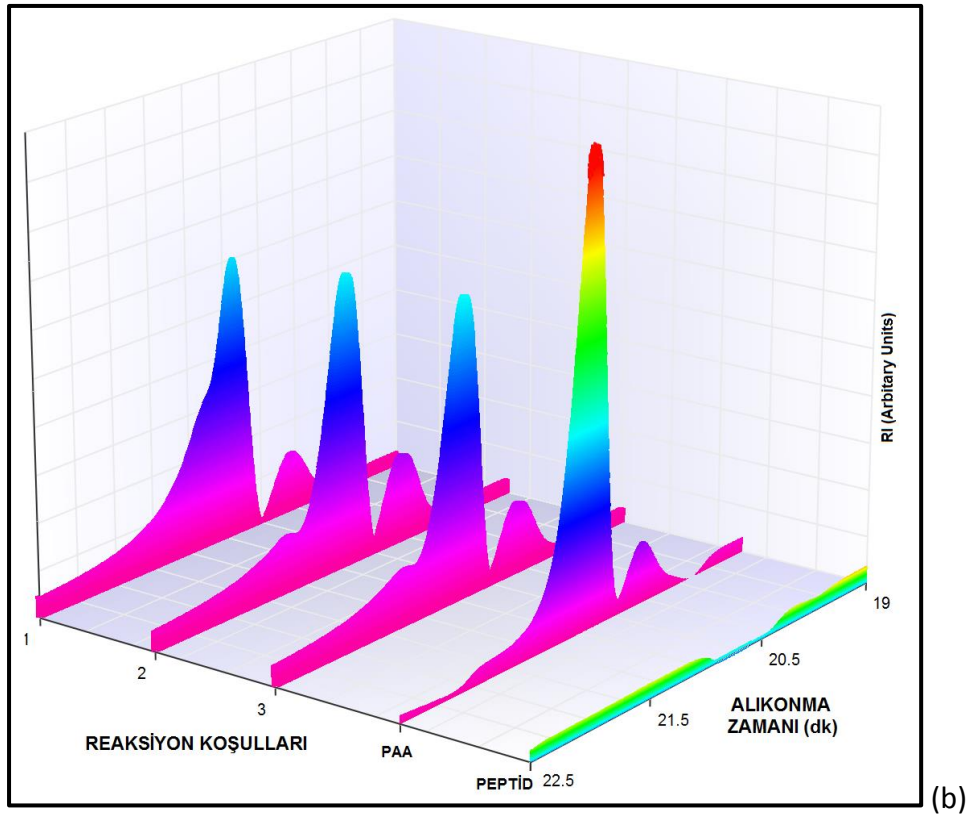
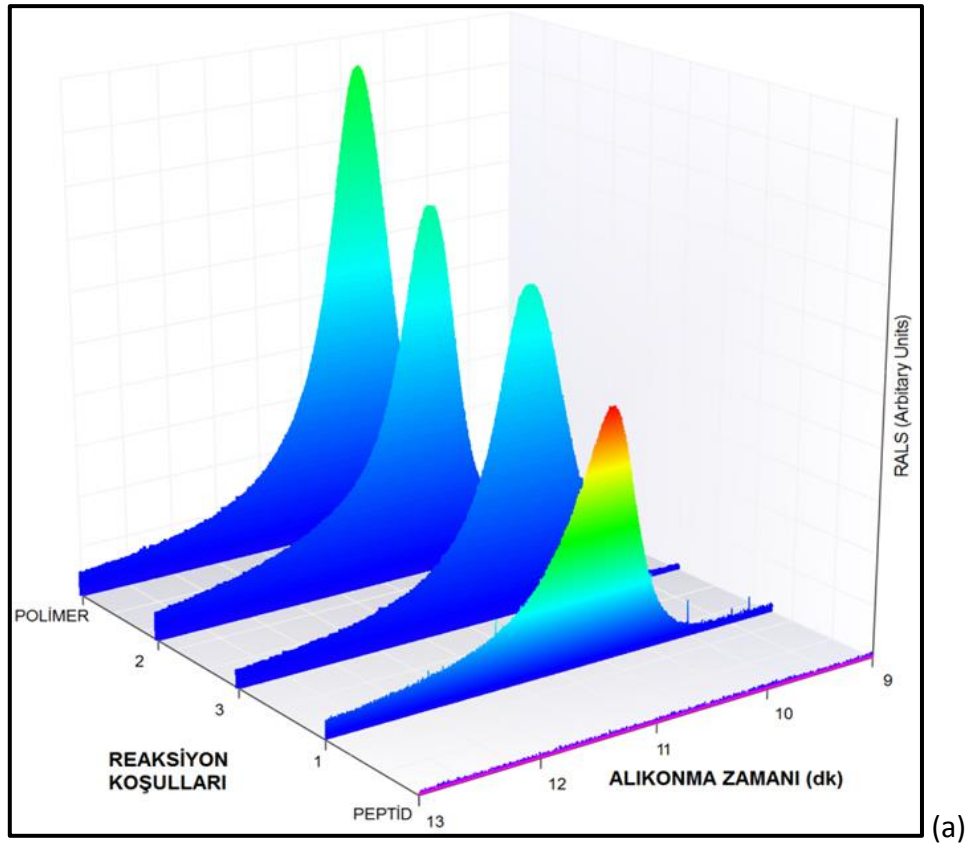
Sentezlenen bütün konjugatlar yaklaşık 1 saat pH 7'de karıştırıldıktan sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırıldı ve elde edilen konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

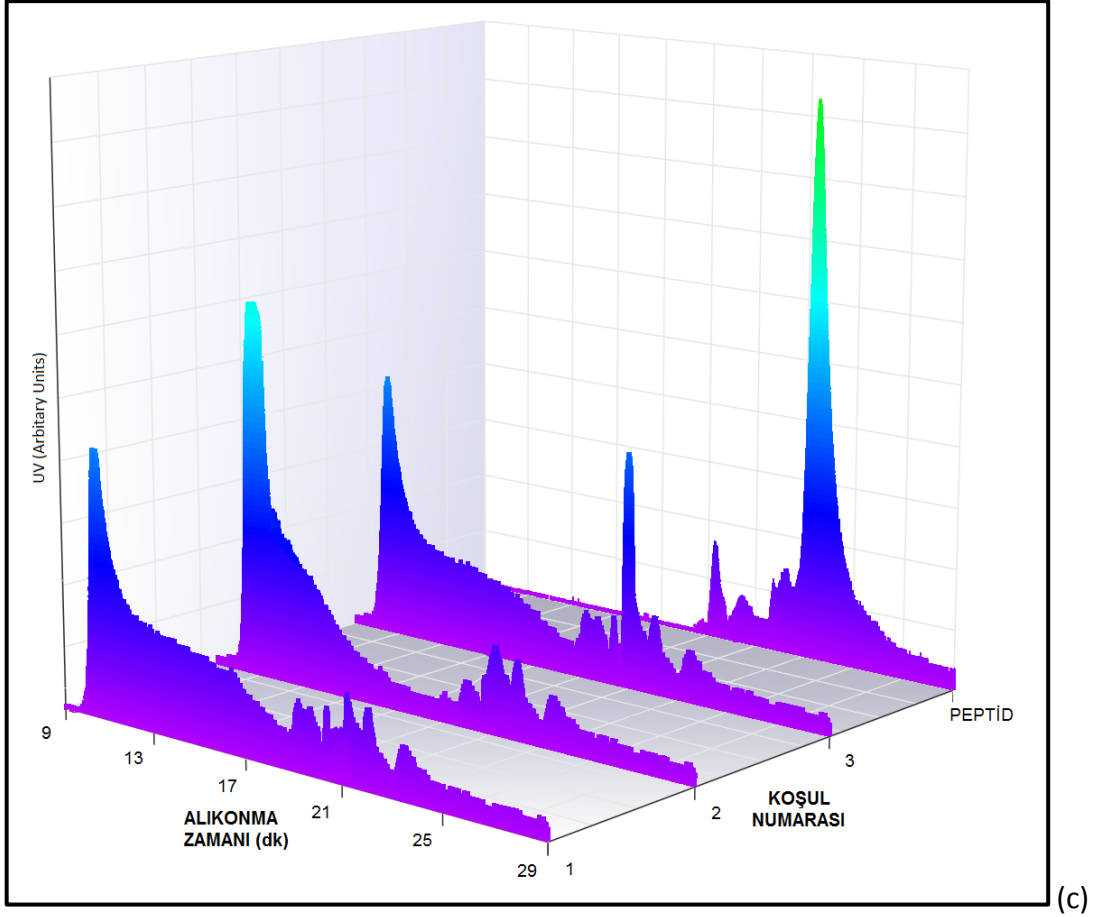


Şekil 4.8 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ(1-21) peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği. (■) Tek başına peptid ($\lambda_{\max}$:348 nm), ve (■) Koşul1 ($\lambda_{\max}$:348 nm), (■)Koşul2 ($\lambda_{\max}$:342 nm), (■) Koşul3($\lambda_{\max}$:349 nm)'e göre sentezlenen konjugatlar



Şekil 4.9 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ(1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC grafiği. ve (■) Koşul1 , (■)Koşul2, (■) Koşul3'e göre sentezlenen konjugatlar





Şekil 4.10 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının; (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) RI dedektörüne, (c) Serbest peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.2.2.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen PAA-A β (1-21) Peptid Konjugatları

A β (1-21)-PAA peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, Koşul 2'de olduğu gibi yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında daha önce bahsedilen PAA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Bu peptid stok çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır:

5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranında, $V_T = 5\text{mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır:

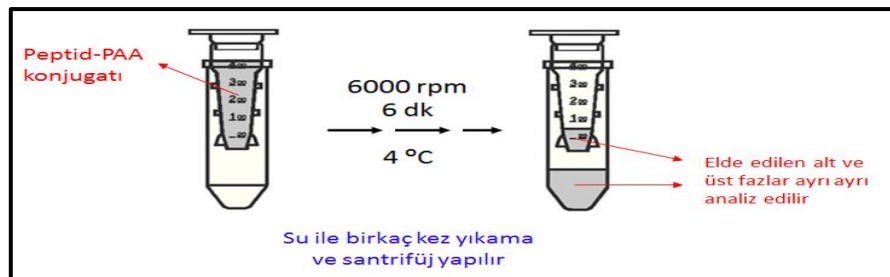
Çizelge 4.1 Farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranı	C_{pep} (mg/5mL)	A β (1-21) peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	0.068	68
3	0.204	204
5	0.339	339
7	0.476	476
9	0.612	612
11	0.748	748

Yukarıdaki tabloya göre ara stok çözeltisi için gereken toplam peptid 2.447 mg'dır. 2.5 mg peptid tartılıp, yaklaşık 2,5 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stoktan 28,5 μL PAA, pH=5 PBS tamponunda çözöldü. Çözeltinin pH'sı ölçölerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine, A β (1-21) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için gerekli peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 10 mg EDC eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçöldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra saflaştırıldı.

4.3 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması

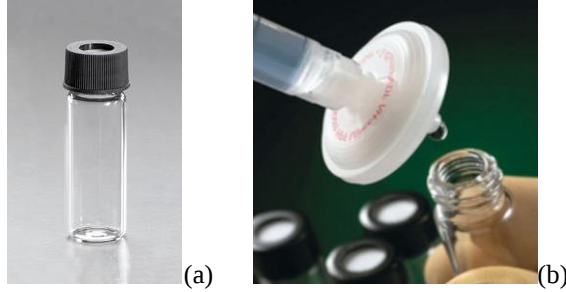
Sentezlenen bütün konjugatlar, konjugasyon mekanizmasında yan ürün olarak açığa çıkan üre türevi veya reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından santriföljlü filtrasyon (membranlı santrifölj tüpleri) ile Şekil 4.12'de gösterildiği gibi saflaştırıldıktan sonra analiz için numune hazırlanmıştır.



Şekil 4.11 Peptid-PAA konjugatlarının saflaştırılması

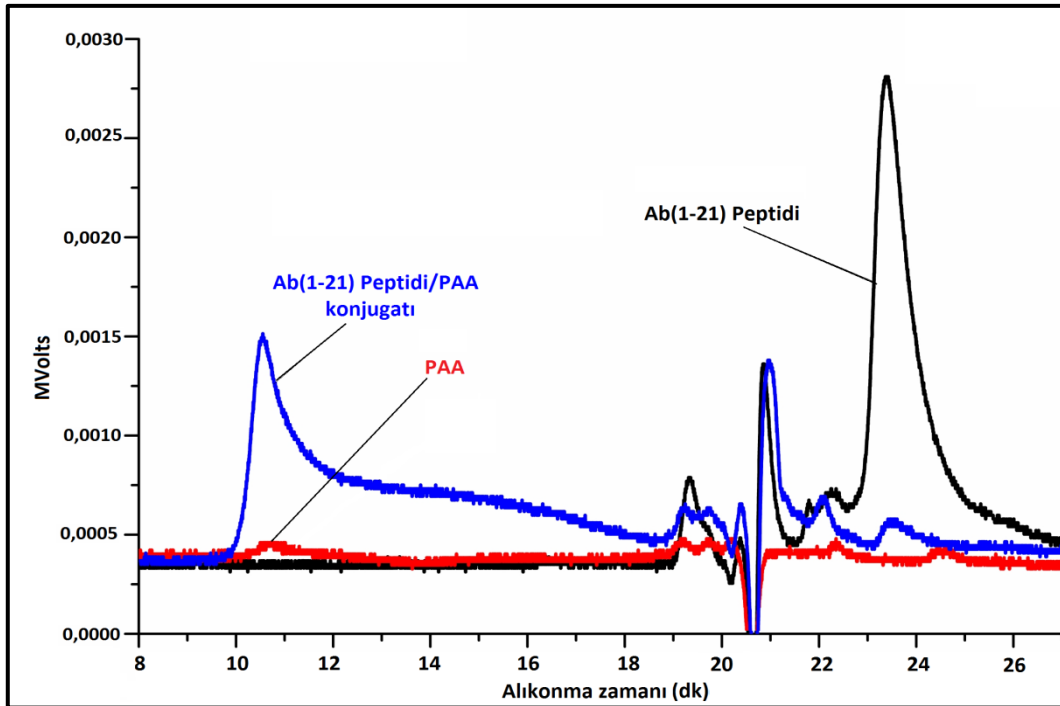
4.3.1 Analiz için Örnek Hazırlama

Özellikle HPLC ve GPC sistemlerinde kolona enjekte edilecek fiziksel kompleks ve konjugatlar, 0.22µm por çapına sahip, PES filtrelerden süzülerek viallere enjekte edilmiştir. Böylece bütün numuneler cihazlara verilmeye hazır hale getirilmişlerdir.

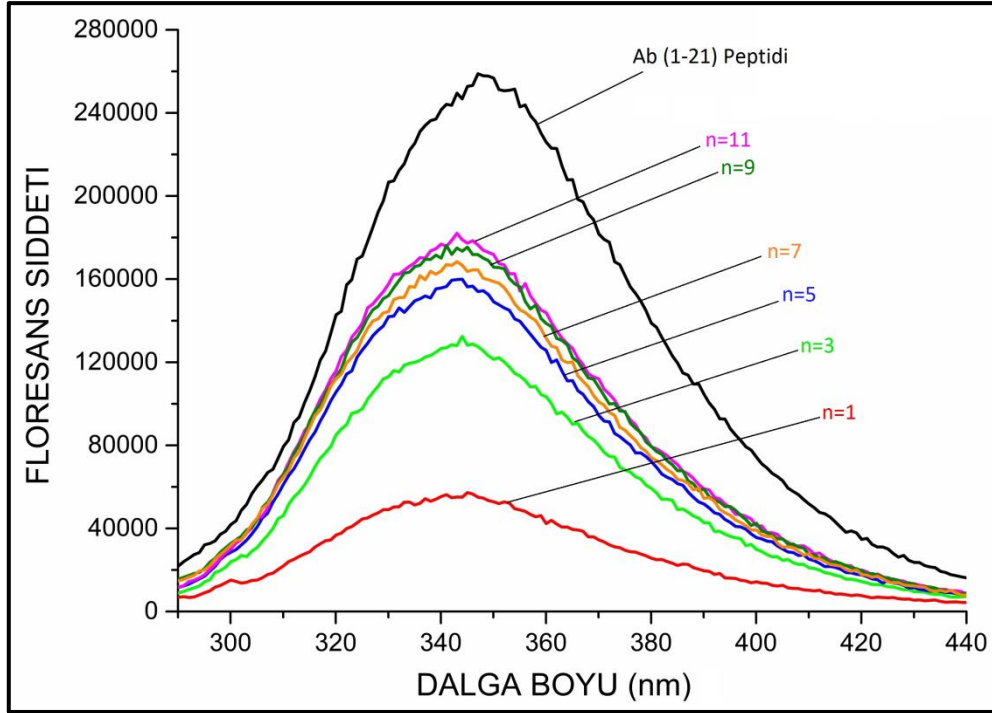


Şekil 4.12 (a) HPLC ve GPC için kullanılan vialler (b) Sentezlenen konjugatların PES filtrelerden viallere filtrasyonu

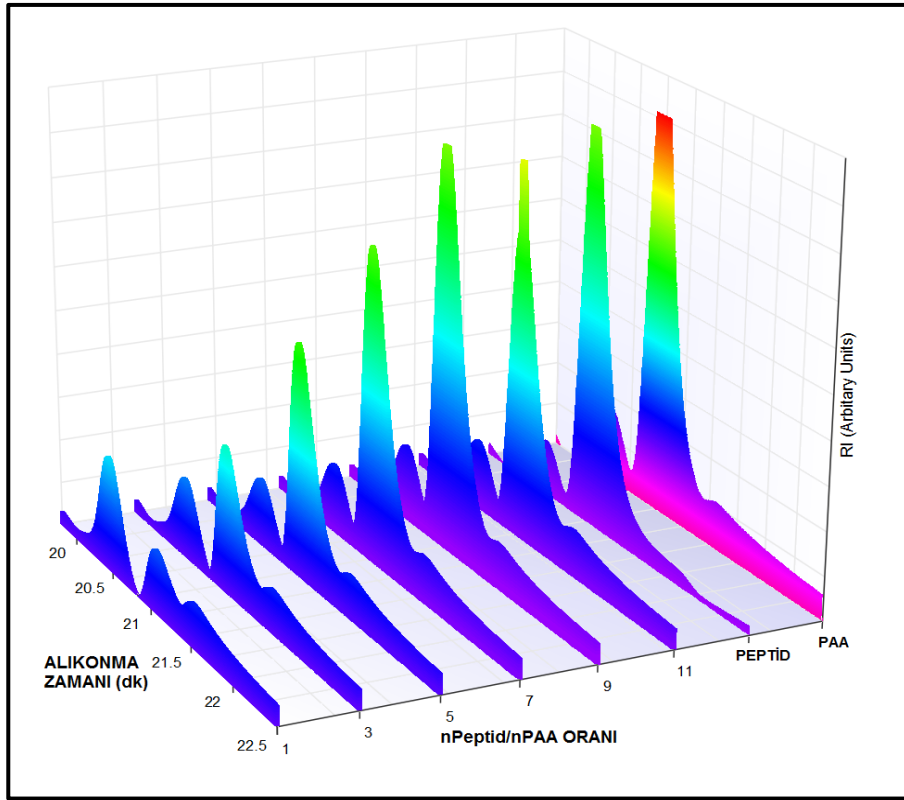
Saflaştırmadan sonra hazırlanan örneklerdeki konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



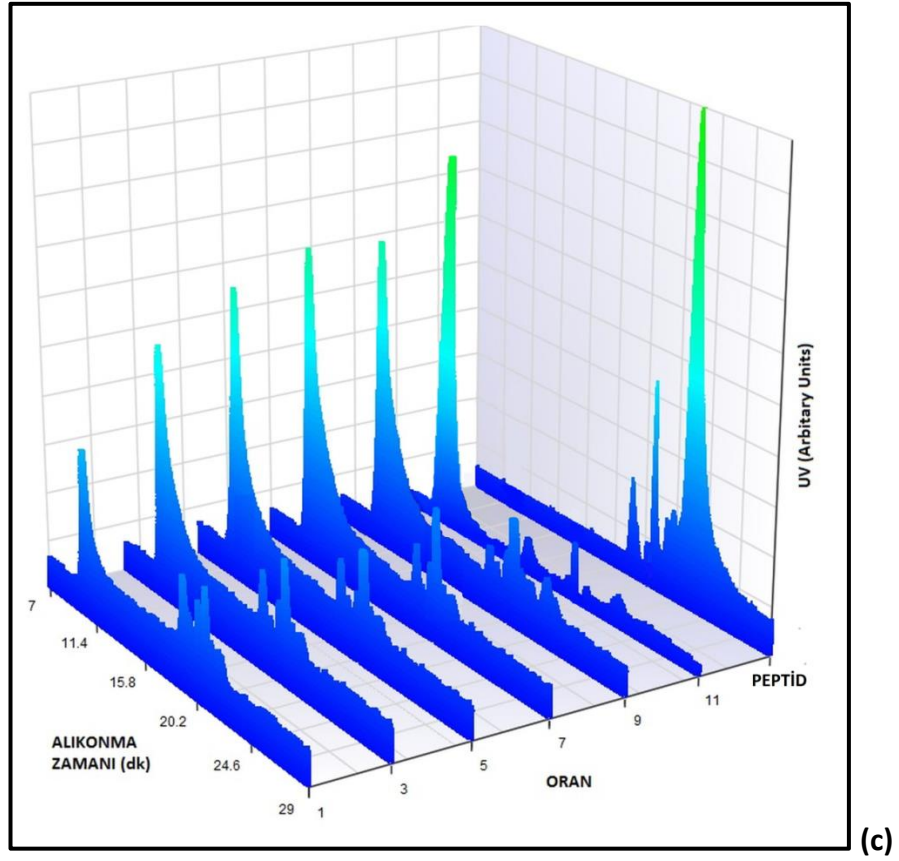
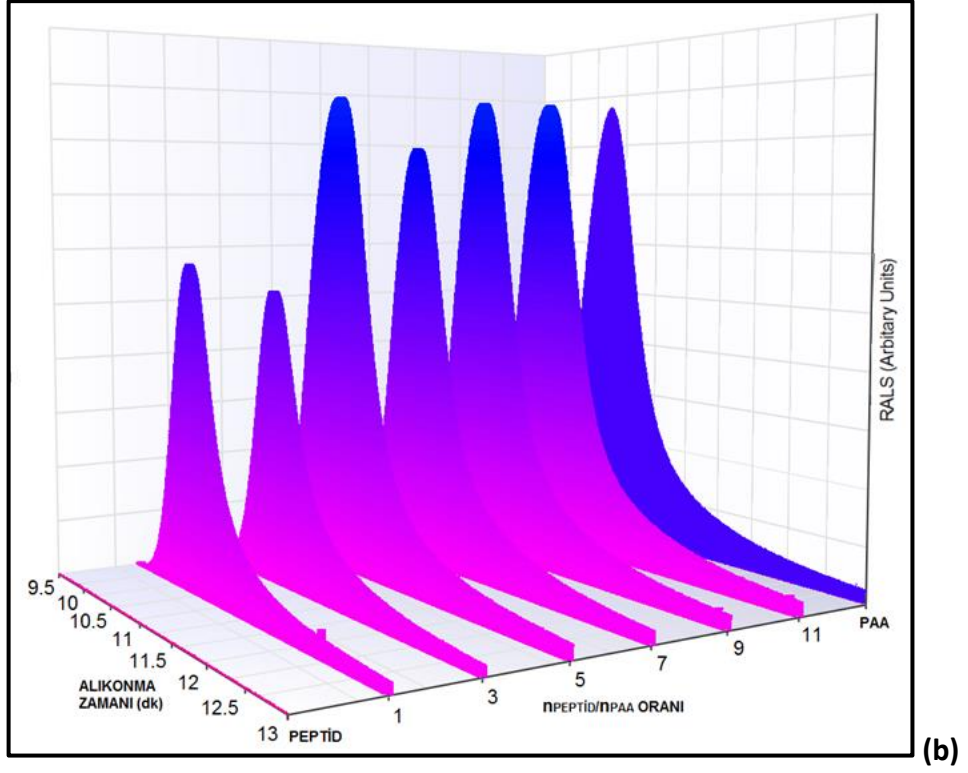
Şekil 4.13 Aβ (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ve tek başına polimer ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı



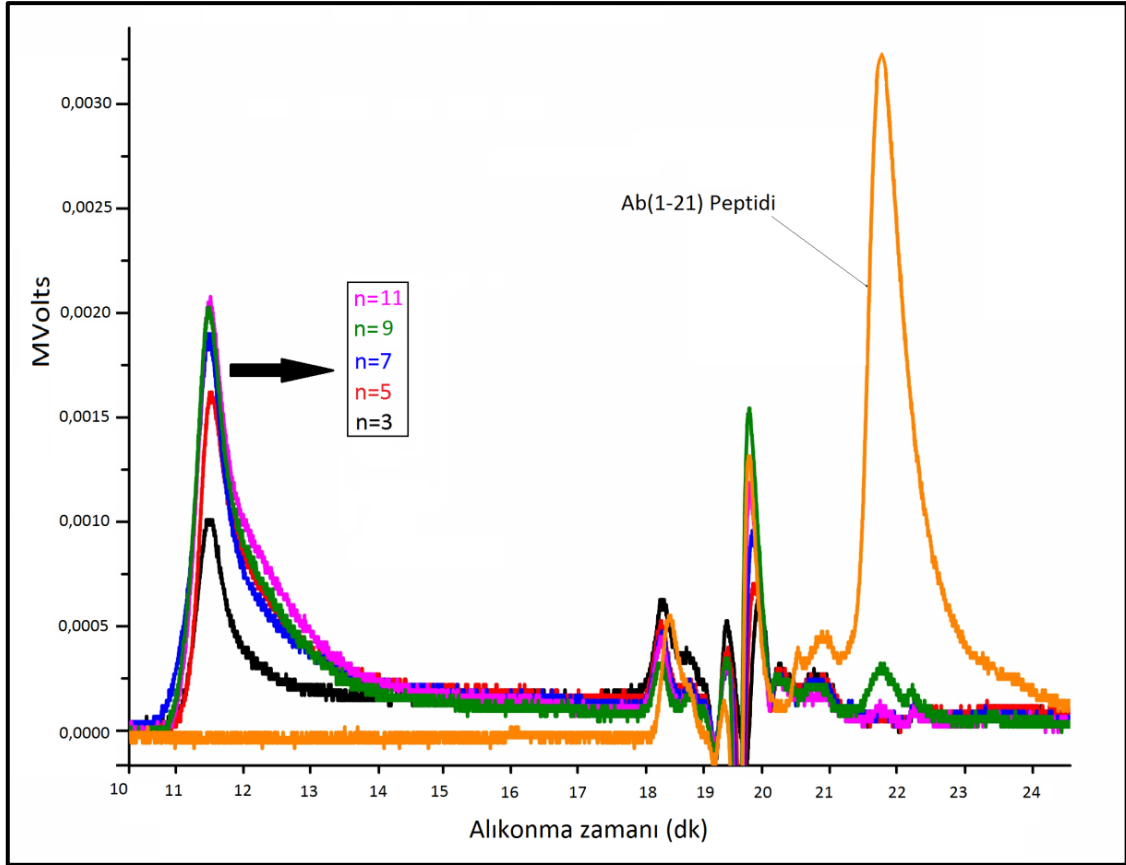
Şekil 4.14 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları:
nPeptid/nPAA=1 (■) (λ_{max} =344nm), 3 (■) (λ_{max} =344nm), 5 (■) (λ_{max} =343nm), 7 (■) (λ_{max} =343nm), 9 (■) (λ_{max} =342nm), 11 (■) (λ_{max} =342nm), Serbest peptid (■) (λ_{max} =347nm)



(a)



Şekil 4.15 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının (a) RI dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) Serbest peptid ile kıyaslamalı UV dedektörüne ait SEC kromatogramları



Şekil 4.16 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ(1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının serbest peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı

4.4 Aβ (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Peptid-PAA konjugasyonlarında öncelikle EDC aktivasyonu farklı aşamalarda yapılmış, daha sonra da aktivasyonun yapıldığı pH değerleri değiştirilerek bağlanmanın en iyi olduğu yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün PAA-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, polimerin konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki Denklem 4.1'deki eşitlikten reaksiyonlar için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2012,9 \times 5) / 100000 \quad \Rightarrow \quad C_{\text{peptid}} = 0,251 \text{ mg/5mL}$$

olarak bulunur. Daha sonra reaksiyon hacmine göre gerekli peptid miktarı ve kullanılacak aktivatör (EDC) miktarları belirlenir. Genellikle kullanılan taşıyıcı molekülün yaklaşık 2 katı kadar EDC kullanılmıştır. Bunun reaksiyon için bir sakıncası yoktur çünkü reaksiyona girmeyen EDC'nin fazlası, saflaştırma yöntemleri ile reaksiyon ortamında kolaylıkla ayrılabilir.

4.4.1 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar

- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

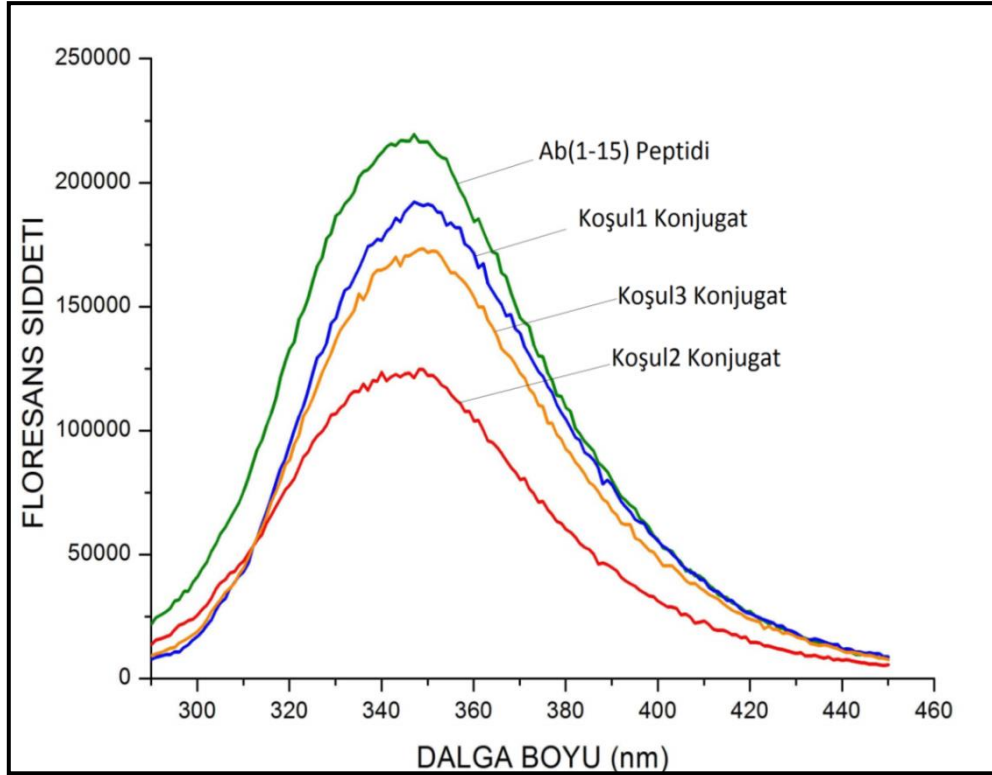
5 mg PAA, pH 5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. Daha sonra pH 5'teki bu çözeltiye 10 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat kadar karıştırıldı ($V_T=5$ mL). 2 saat sonra aktive olmuş PAA çözeltisinin üzerine 0.251 mg A β (1-15) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 gece boyunca, oda sıcaklığında konjugasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

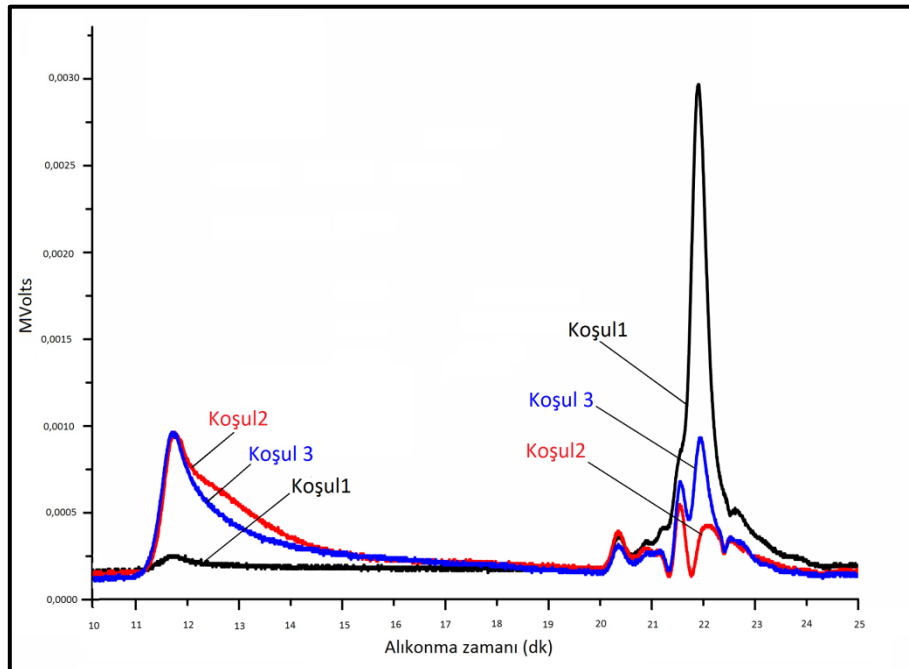
5 mg PAA, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. 0.251 mg A β (1-15) peptidi karışmakta olan PAA çözeltisine eklendi. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra pH 5'teki fiziksel karışıma 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

- **Koşul 3'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

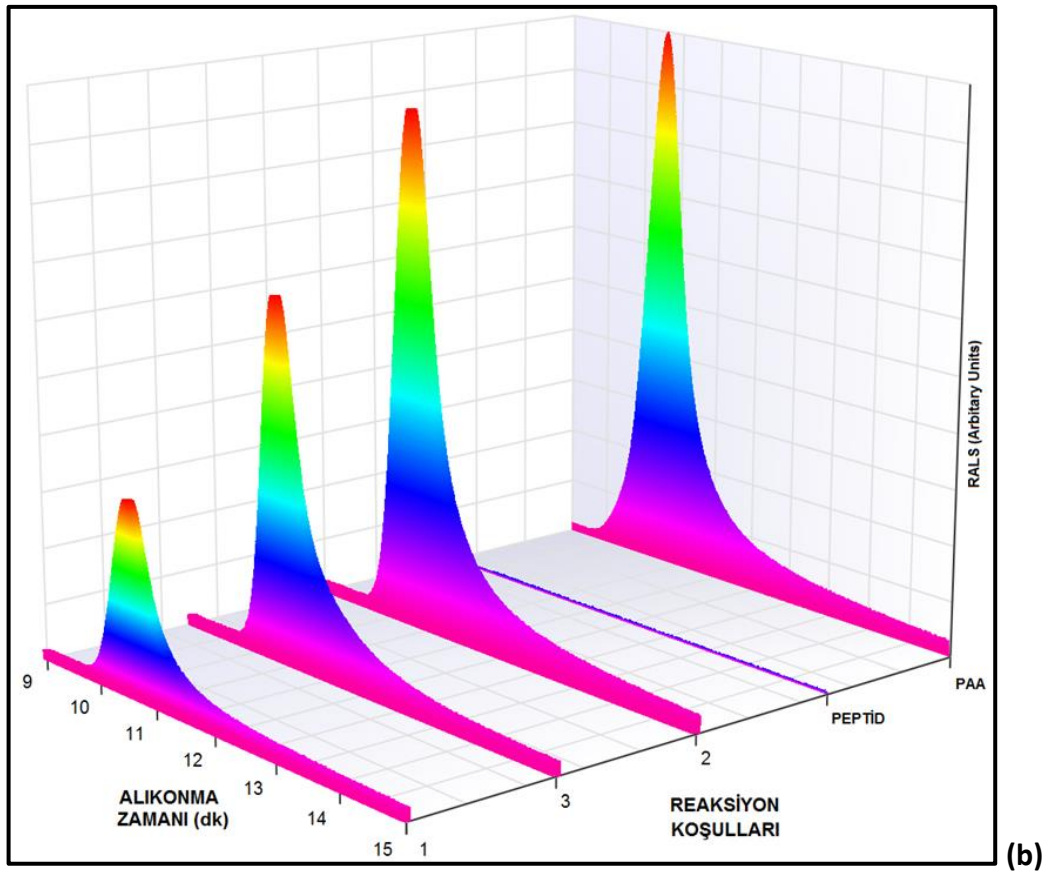
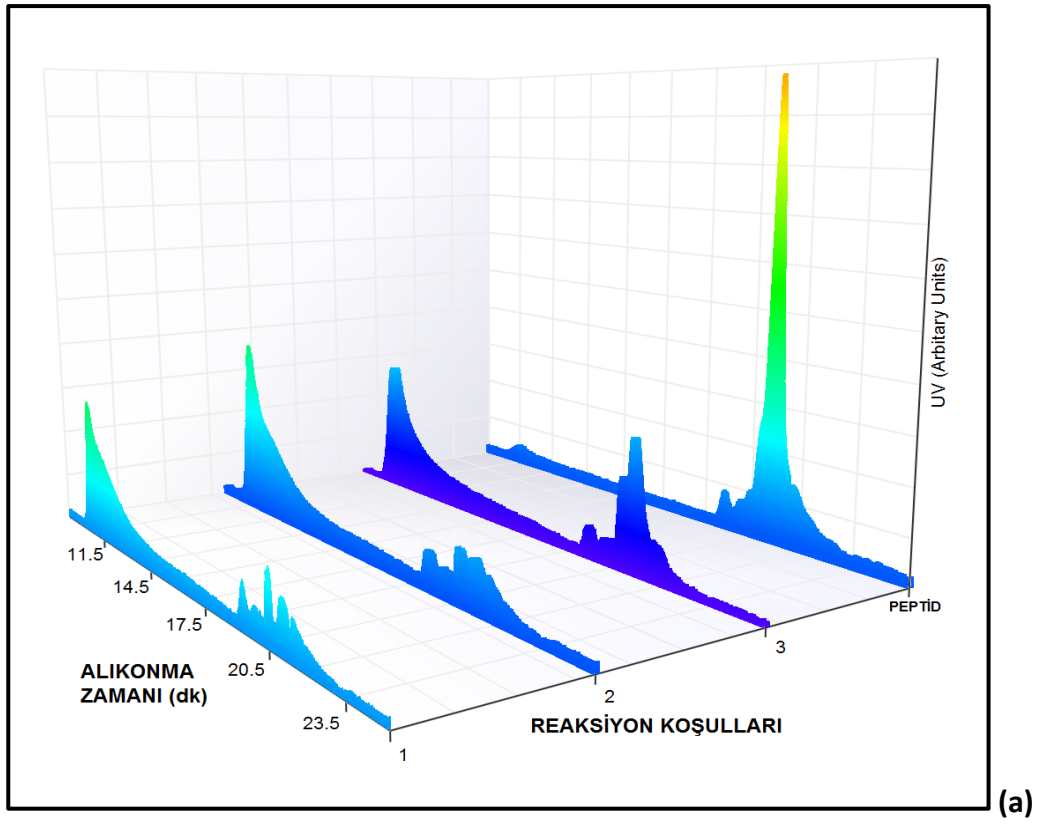
5mg PAA, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. 0.251 mg A β (1-15) peptidi karışmakta olan PAA çözeltisine eklendi. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. 2 saat sonunda, çözeltinin pH'ı 7'ye çekildi ve pH 7'de 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı. Sentezlenen bütün konjugatlar, önce membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırıldı, analiz için numune hazırlandı ve elde edilen konjugatların yapılarının ve karakterizasyonunun belirlenebilmesi için kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

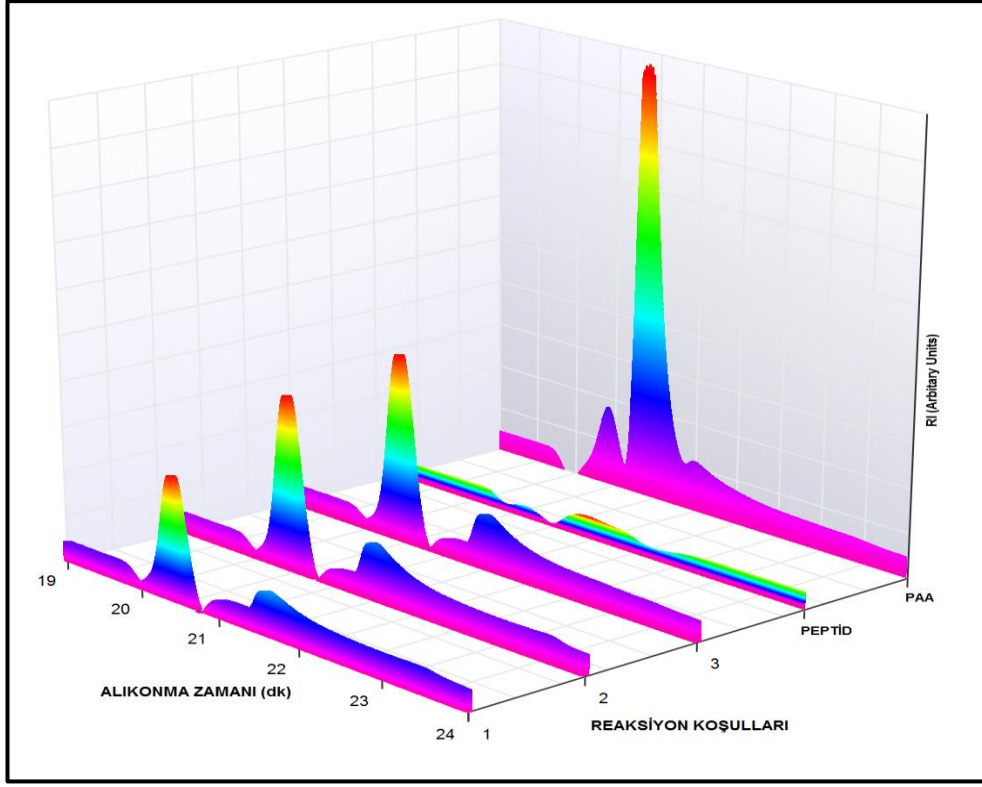


Şekil 4.17 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile konjugasyonunun floresans grafiği. (■) Tek başına peptid (λ_{max} :348 nm) ve (■) Koşul1(λ_{max} :348 nm), (■)Koşul2 (λ_{max} :338 nm), (■) Koşul3(λ_{max} :349 nm)'e göre sentezlenen konjugatlar



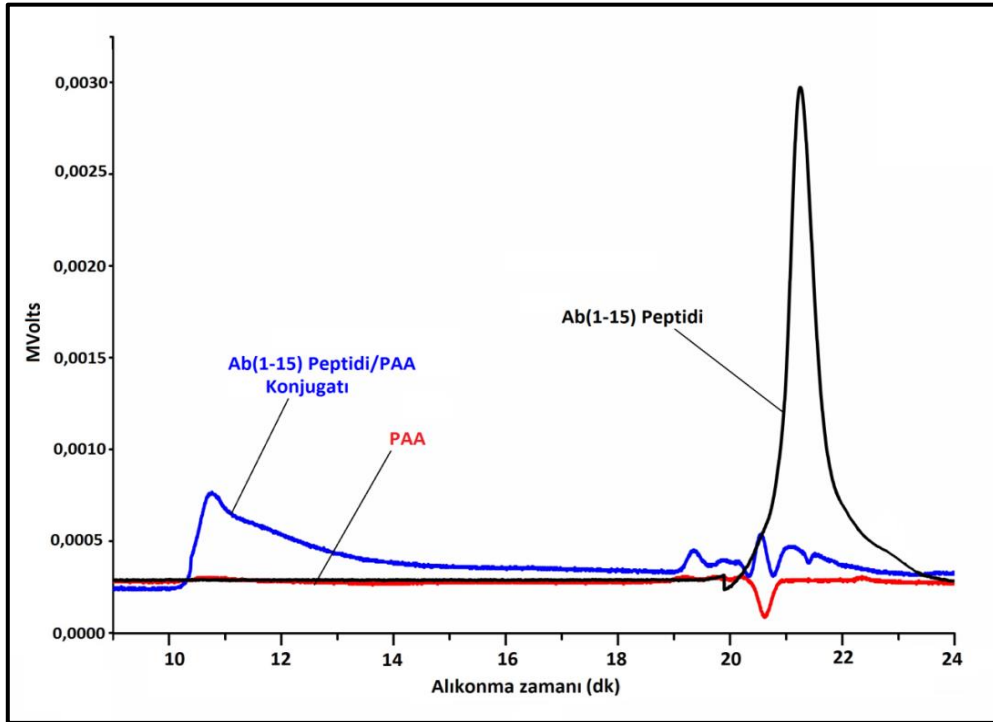
4.18 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC grafiği. ve (■) Koşul1 , (■)Koşul2, (■) Koşul3'e göre sentezlenen konjugatlar





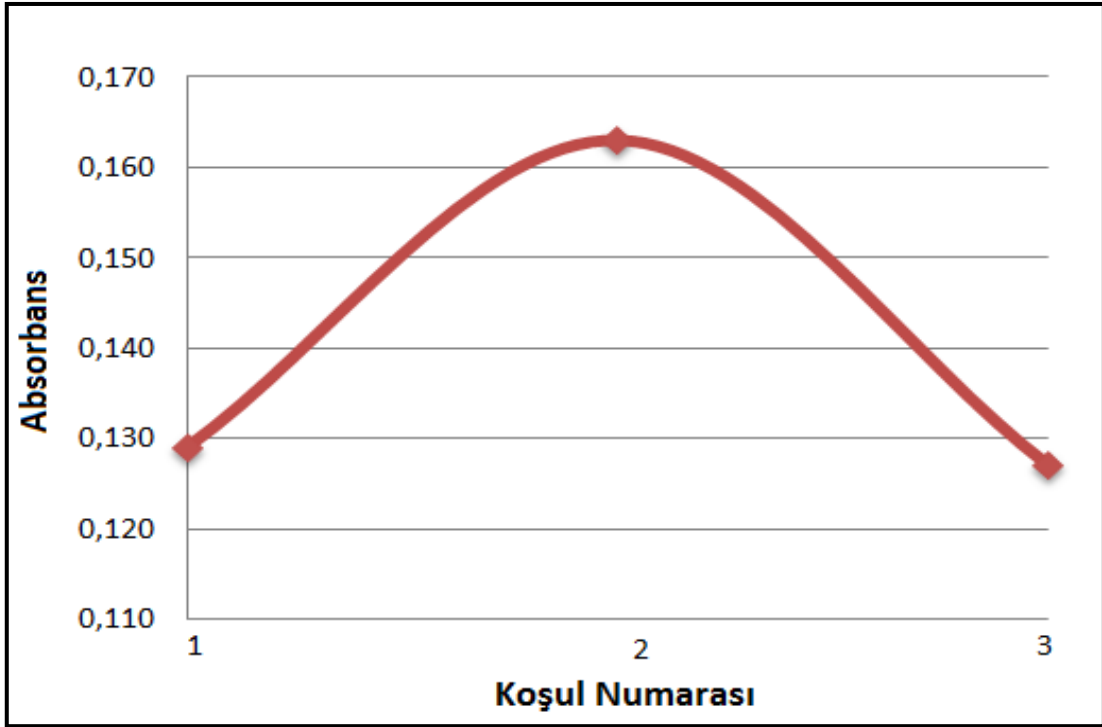
(c)

Şekil 4.19 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının serbest peptid ile kıyaslamalı; (a) UV, (b) Işık saçılması (RALS) ve (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları



Şekil 4.20 A β (1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve PAA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı

Bu üç farklı koşulda sentezlenen biyokonjugatların UV Spektrofotometre ile 280 nm'deki absorbans değerleri de ölçülmüştür.



Şekil 4.21 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ(1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatının UV spektrofotometre ile absorbans ölçümü

4.4.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen PAA-Aβ (1-15) Peptid Konjugatları

Aβ(1-15)-PAA peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, AB2 konjugatının sentezlendiği Koşul 2'de olduğu gibi yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında daha önce bahsedilen PAA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Bu peptid stok çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır:

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranında, $V_T = 5\text{mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır:

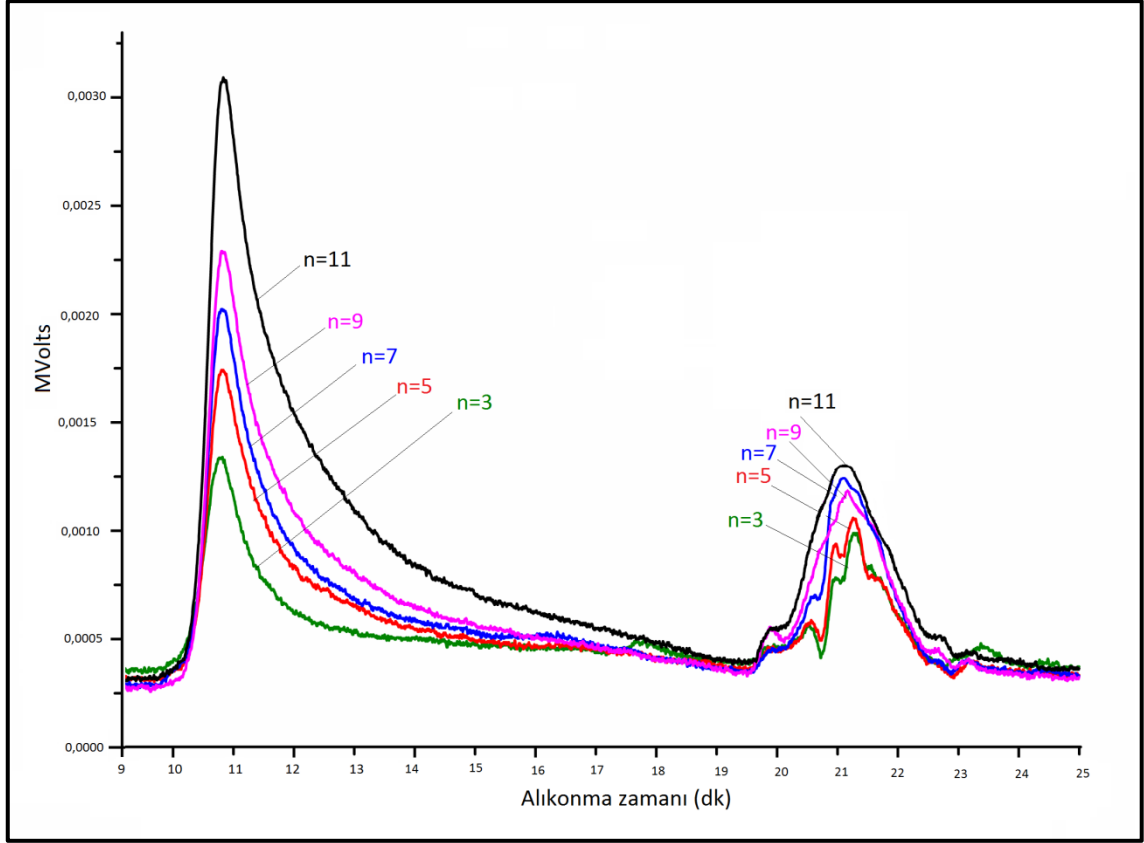
Çizelge 4.2 Farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranı	C_{pep} (mg/5mL)	A β (1-15) peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	0.05	50
3	0.151	151
5	0.252	252
7	0.352	352
9	0.453	453
11	0.553	553

Yukarıdaki tabloya göre ara stok çözeltisi için gereken toplam peptid 1.811 mg'dır. 2 mg peptid tartılıp, 2 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stoktan 28,5 μL PAA, pH=5 PBS tamponunda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine, A β (1-15) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için gerekli peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 10 mg EDC eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçüldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldı.

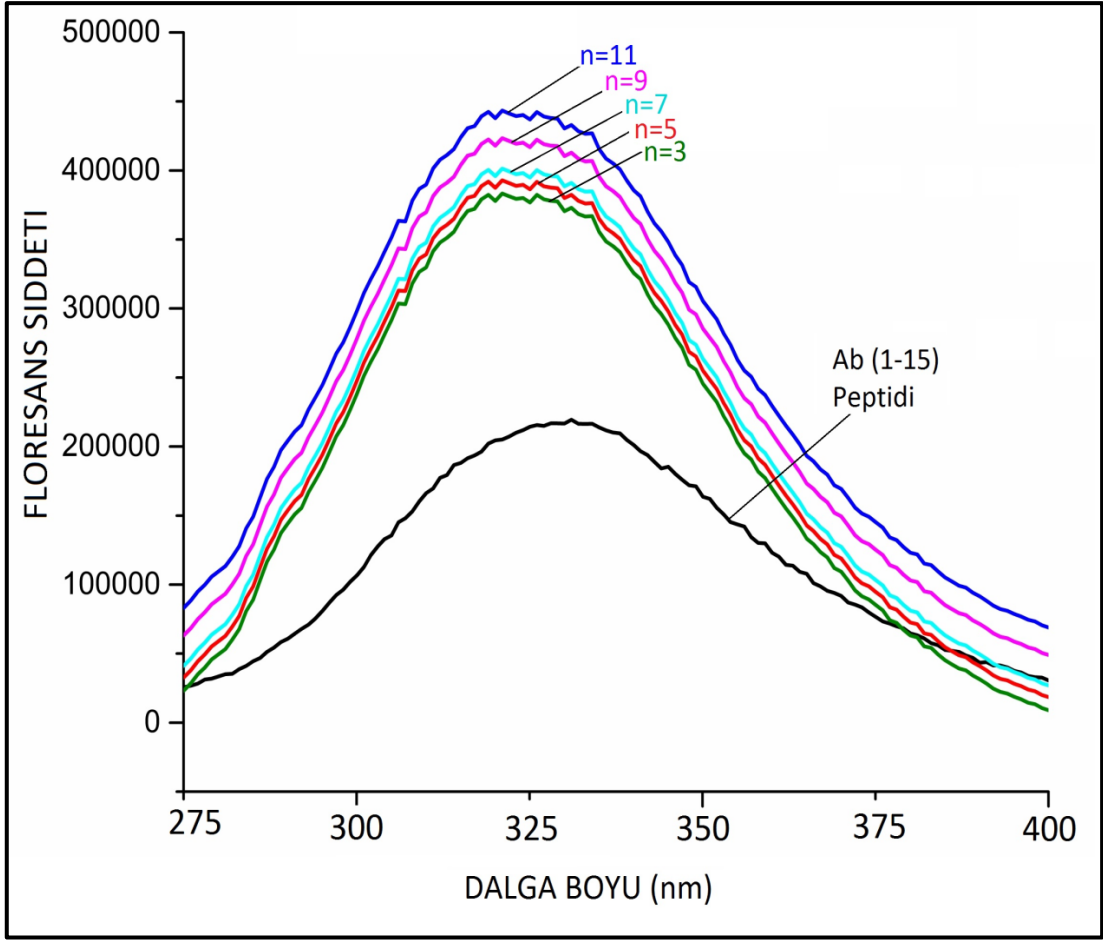
4.5 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması ve Örnek Hazırlanması

Sentezlenen bütün A β (1-15)-PAA konjugatları, konjugasyon mekanizmasında yan ürün olarak açığa çıkan üre türevi veya reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri) ile Şekil 4.13'de gösterildiği gibi saflaştırıldıktan sonra, Şekil 4.13'de gösterilen PES filtrelerden süzülerek viallere enjekte edilmiştir. Böylece bütün numuneler cihazlara verilmeye hazır hale getirilmişlerdir. Elde edilen bütün konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



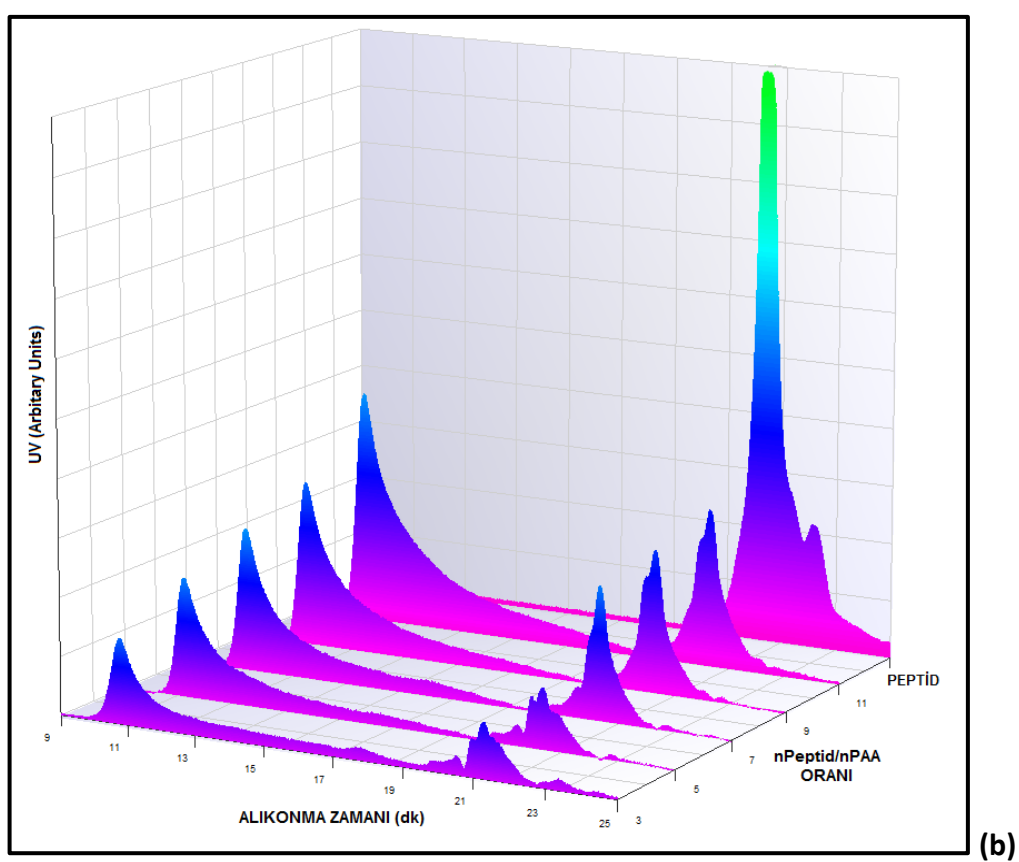
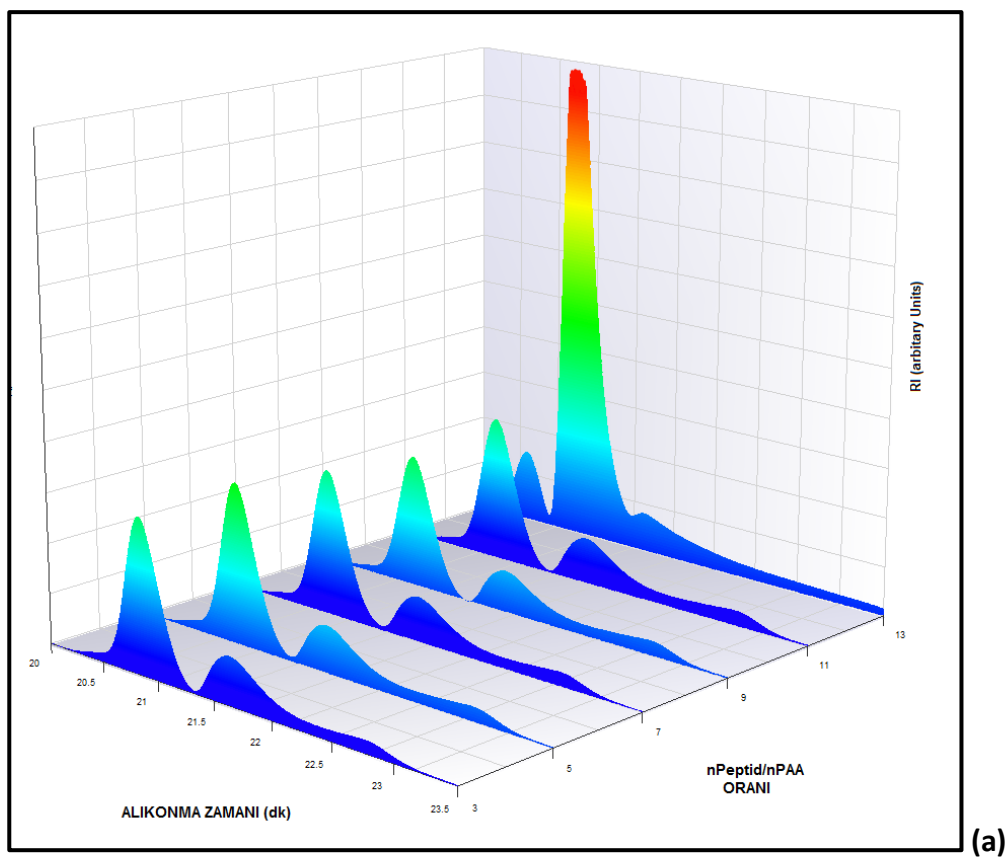
Şekil 4.22 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatlarının kıyaslamalı HPLC Spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 3$ (■), 5 (■), 7 (■), 9 (■), 11 (■).

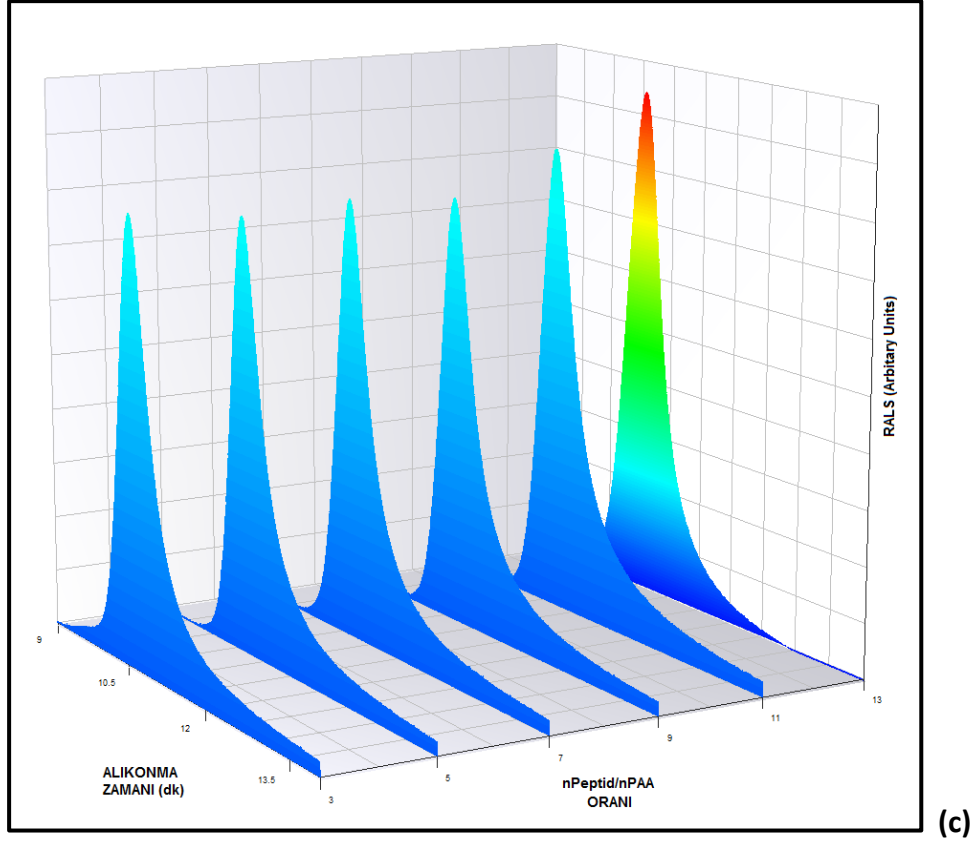
Şekilden de görüldüğü gibi A β (1-15) peptidinin PAA ile farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ başlangıç oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarında; peptidin artan oranlarında 10. dk ile 13. dk.lara arasında konjugata ait piklerin de arttığı görülmektedir. Bu da bize konjugat oluşumunun orana bağlı olarak arttığını göstermektedir. Benzer şekilde artan $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında reaksiyona girmemiş peptid miktarındaki artış, 20 ile 23. Dakikalardaki piklerden gözlenmektedir.



Şekil 4.23 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ (■) ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), 5 (■) ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$), Serbest peptid (■) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$): 7 (■) ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$): 9 (■) ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$): 11 (■) ($\lambda_{\text{max}}=336\text{nm}$)

Floresans spektroskopisi ile biyokonjugatlara ait floresans spektrumları incelendiğinde ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 348 nm’de gözlenmekte iken etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri 338 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 10 nm’lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki azalma net bir şekilde görülmektedir.





Şekil 4.24 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugatlarının PAA ile kıyaslamalı; (a) RI dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) Işık saçılması (RALS) ait dedektörüne SEC kromatogramları

4.6 P(VP-co-AA) ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları

4.6.1 A β (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Peptid-VPAA konjugasyonlarında öncelikle EDC aktivasyonu farklı aşamalarda yapılmış, daha sonra da aktivasyonun yapıldığı pH değerleri değiştirilerek bağlanmanın en iyi olduğu yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Hesaplamalar

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün VPAA-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{pep}}/n_{\text{VPAA}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, kopolimerin konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki Denklem 4.1'deki eşitlikten reaksiyonlar için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2719,9 \times 5) / 80000 \quad \Rightarrow \quad C_{\text{peptid}} = 0,425 \text{ mg/5mL}$$

4.6.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen VPAA-A β (1-21) Peptid Konjugatları

Farklı 2 koşul kullanılarak yapılan VPAA(1:2)-A β (1-21) peptid konjugatları, $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=5$ molar oranında sentezlenmiştir. Bu konjugatların sentezi sırasında bir VPAA (1:2) ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

VPAA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

2 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T=5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam VPAA(1:2) miktarı 5 mg'dır. 5 mg VPAA tartıldı, 5 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH'ı 5'e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan VPAA(1:2) ara stok çözeltisi hazırlandı.

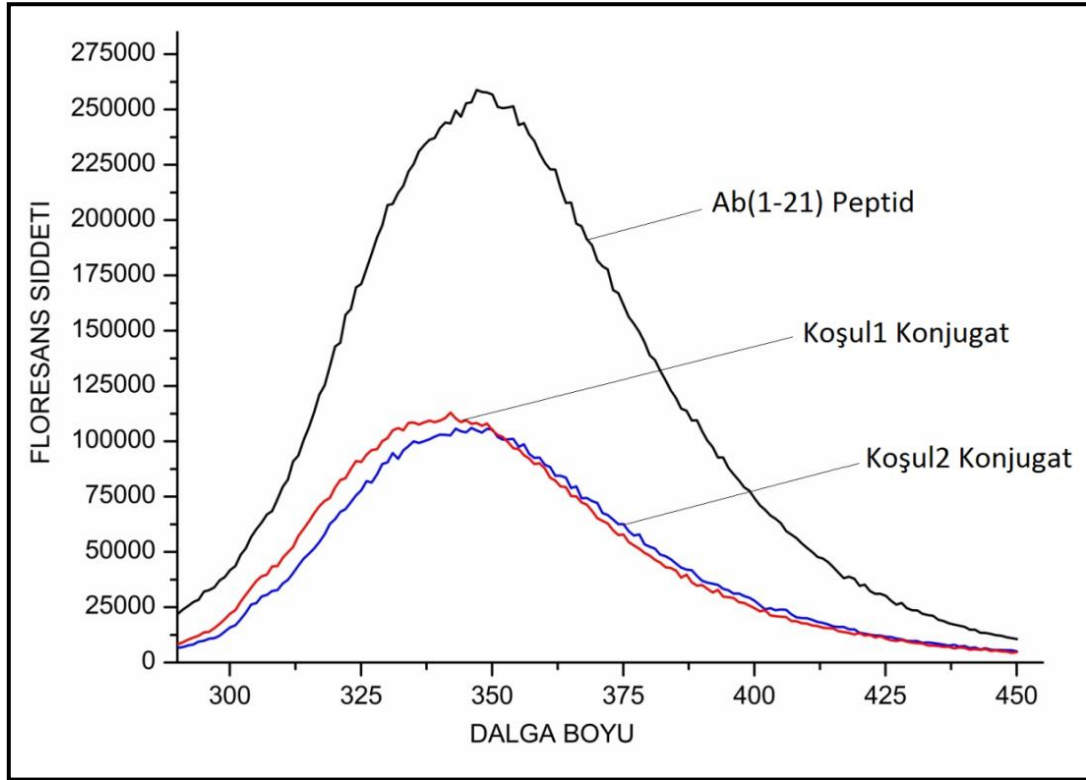
- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. Daha sonra karışmakta olan polimer çözeltisinin üzerine 0.425 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra **pH 5'teki** fiziksel karışıma 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, Kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

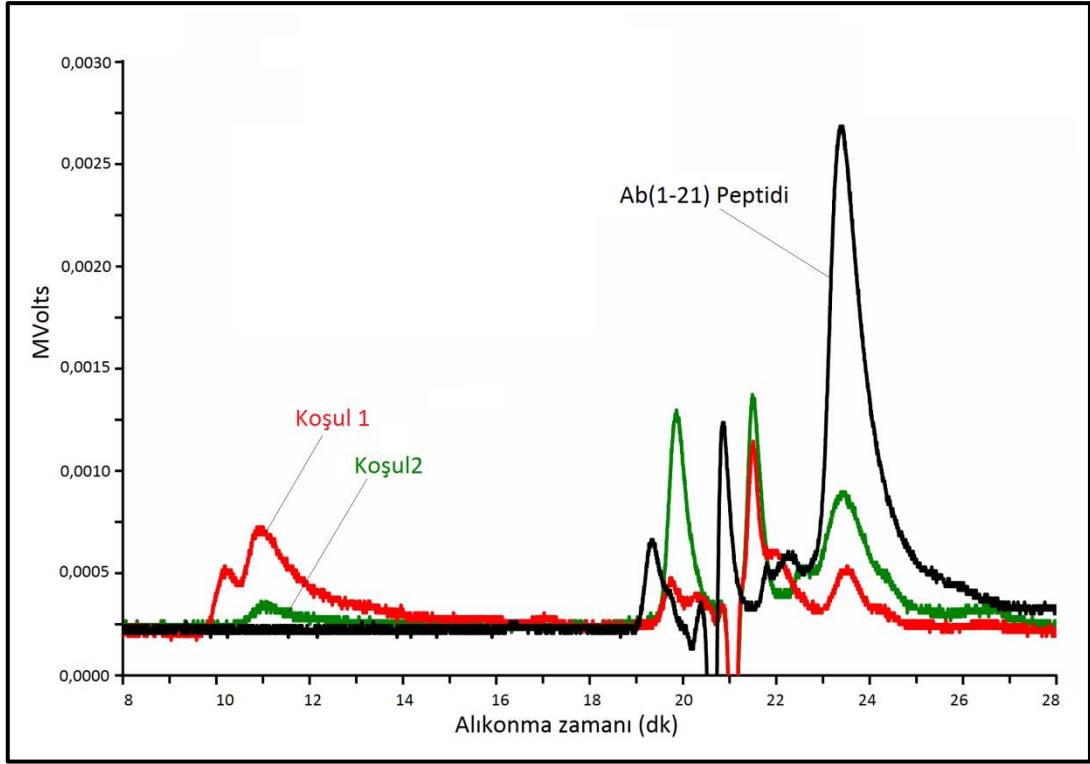
- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. 0.425mg A β (1-21) peptidi karışmakta olan VPAA çözeltisine eklendi. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. 2 saat sonunda, çözeltinin pH'ı 7'ye çekildi ve **pH 7'de** 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı. Yaklaşık 1 saat pH 7'de

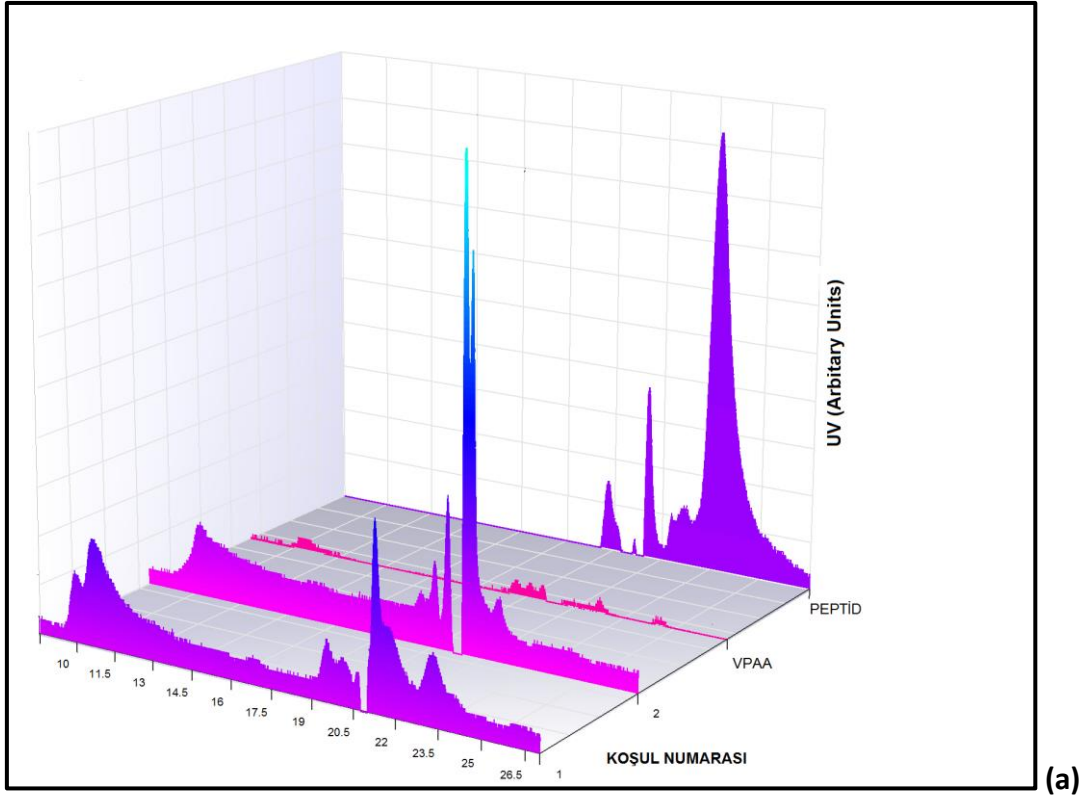
karıştırıldıktan sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırılır ve elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

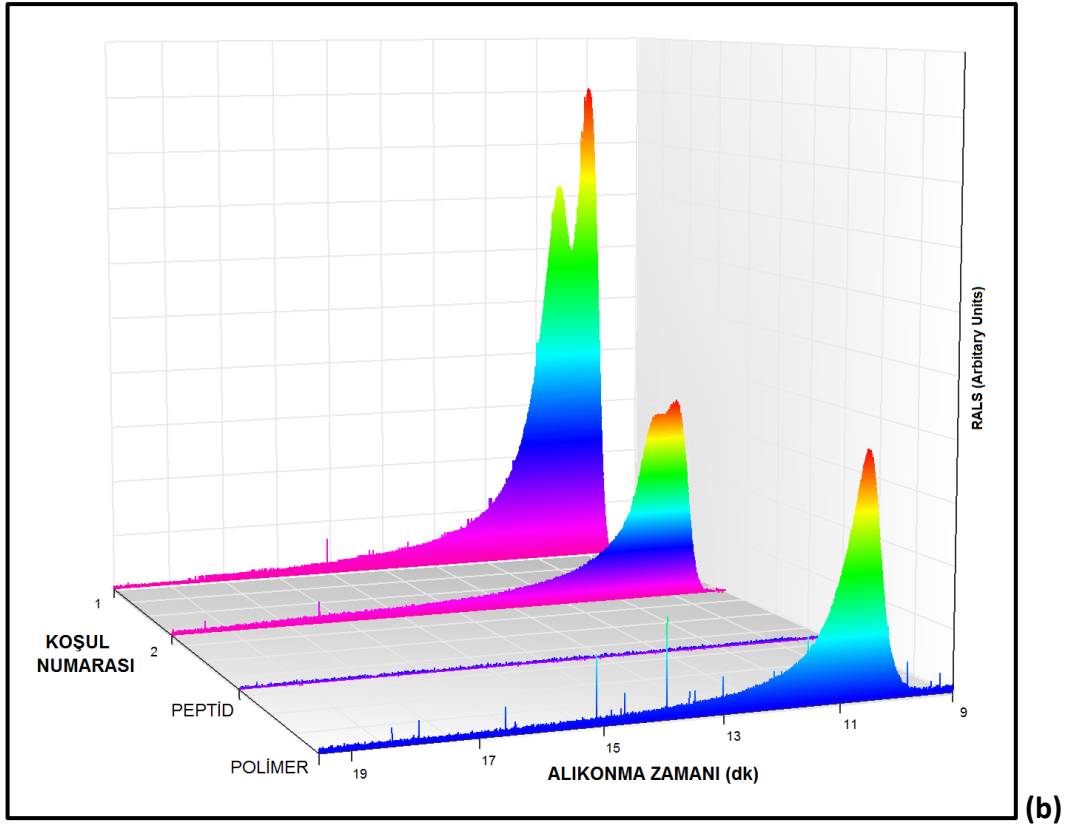


Şekil 4.25 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin [P(VP-ko-AA)] (Mw=80.000 Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: (■) Tek başına peptid (λ_{max} :347 nm), ve (■) Koşul1 (λ_{max} :342 nm), Koşul2 (■)(λ_{max} :348 nm)'ye göre sentezlenen konjugatlar



Şekil 4.26 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin [P(VP-ko-AA)] kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC kromatogramları: (■) Tek başına peptid ve (■) Koşul1, Koşul2 (■)'ye göre sentezlenen konjugatlar





Şekil 4.27 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.6.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen VPAA-A β (1-21) Peptid Konjugatları

VPAA-A β (1-21) peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, Koşul1'e göre yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında bir VPAA (1:2) ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T=5\text{mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 3.060 mg'dır. 3.1 mg peptid tartılıp, 3.1 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

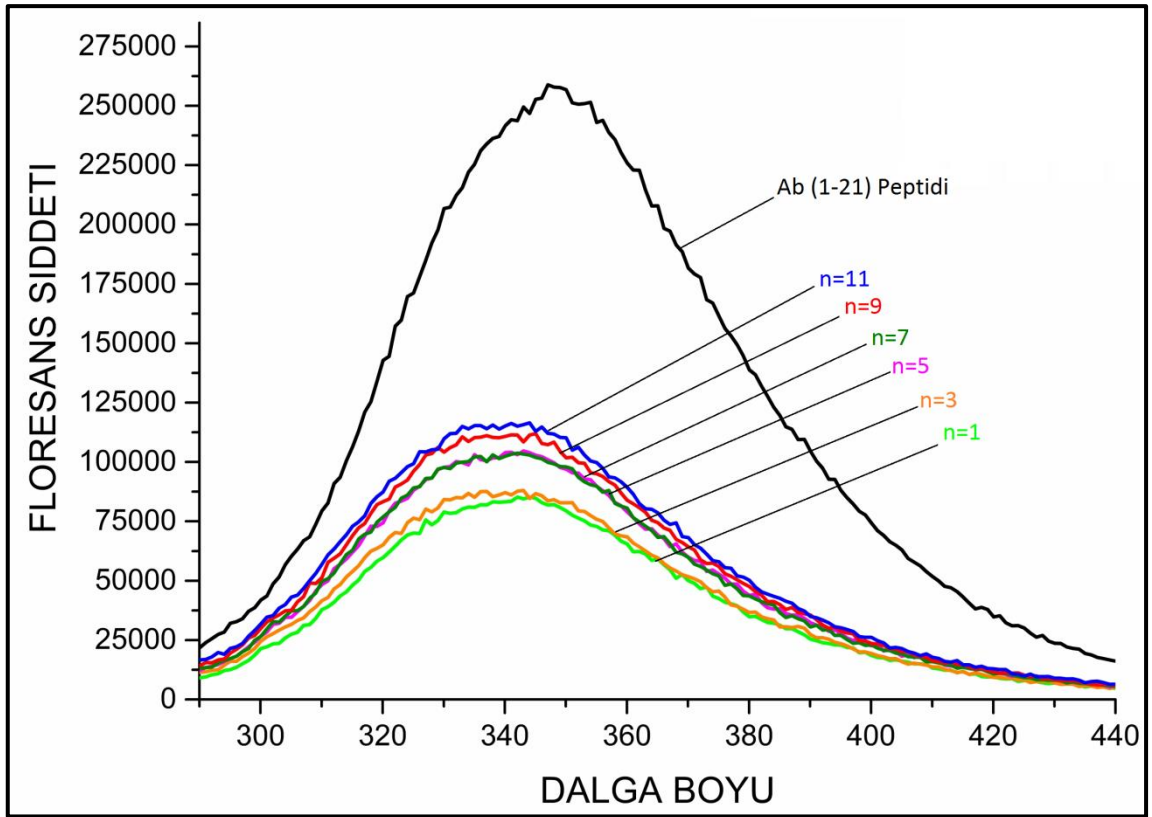
VPAA stok çözeltisinin hazırlanışı:

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam VPAA miktarı 15 mg'dır. 20 mg peptid tartılıp, 20 mL saf suda çözülerek, 1 mg/1 mL olan VPAA ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

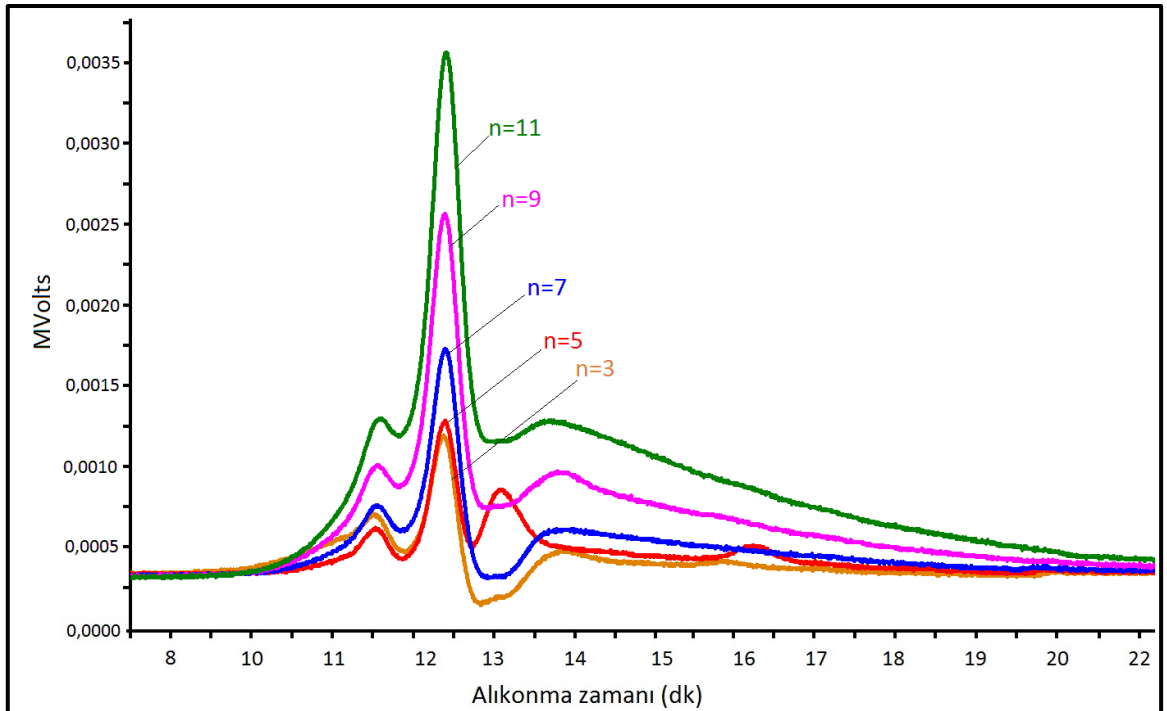
Çizelge 4.3 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranı	C_{VPAA} (mg/5mL)	VPAA ara stok çözeltisinden çekilecek miktar (mL)	C_{pep} (mg/5mL)	Peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	2.5	2.5	0.085	85
3	2.5	2.5	0.255	255
5	2.5	2.5	0.425	425
7	2.5	2.5	0.595	595
9	2.5	2.5	0.765	765
11	2.5	2.5	0.935	935

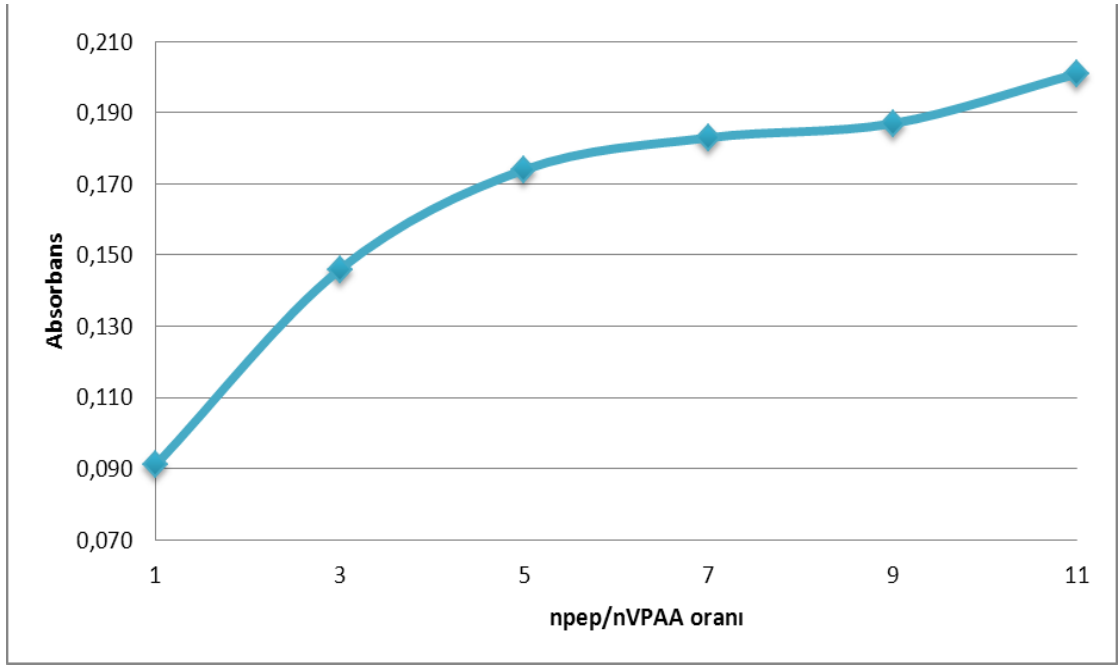
Her bir oran için ara stoktan alınan 2.5 mL VPAA (1:2) pH=5 PBS tamponunda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine, A β (1-21) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için gerekli peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 10 mg EDC eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçüldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



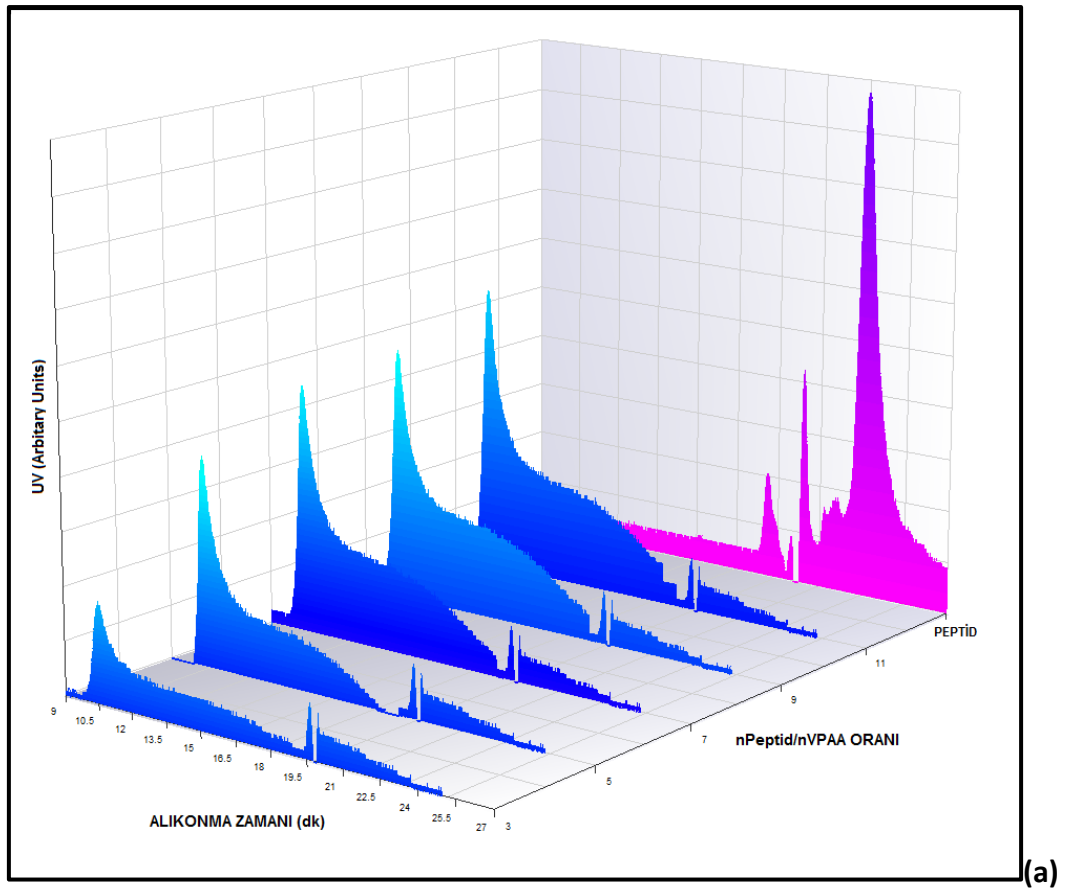
Şekil 4.28 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Serbest peptid (■) ($\lambda_{max}=347nm$), $n_{peptid}/n_{VPAA}=1$ (■) ($\lambda_{max}=343nm$), 3 (■) ($\lambda_{max}=341nm$), 5 (■) ($\lambda_{max}=344nm$), 7 (■) ($\lambda_{max}=344nm$), 9 (■) ($\lambda_{max}=341nm$), 11 (■) ($\lambda_{max}=342nm$)

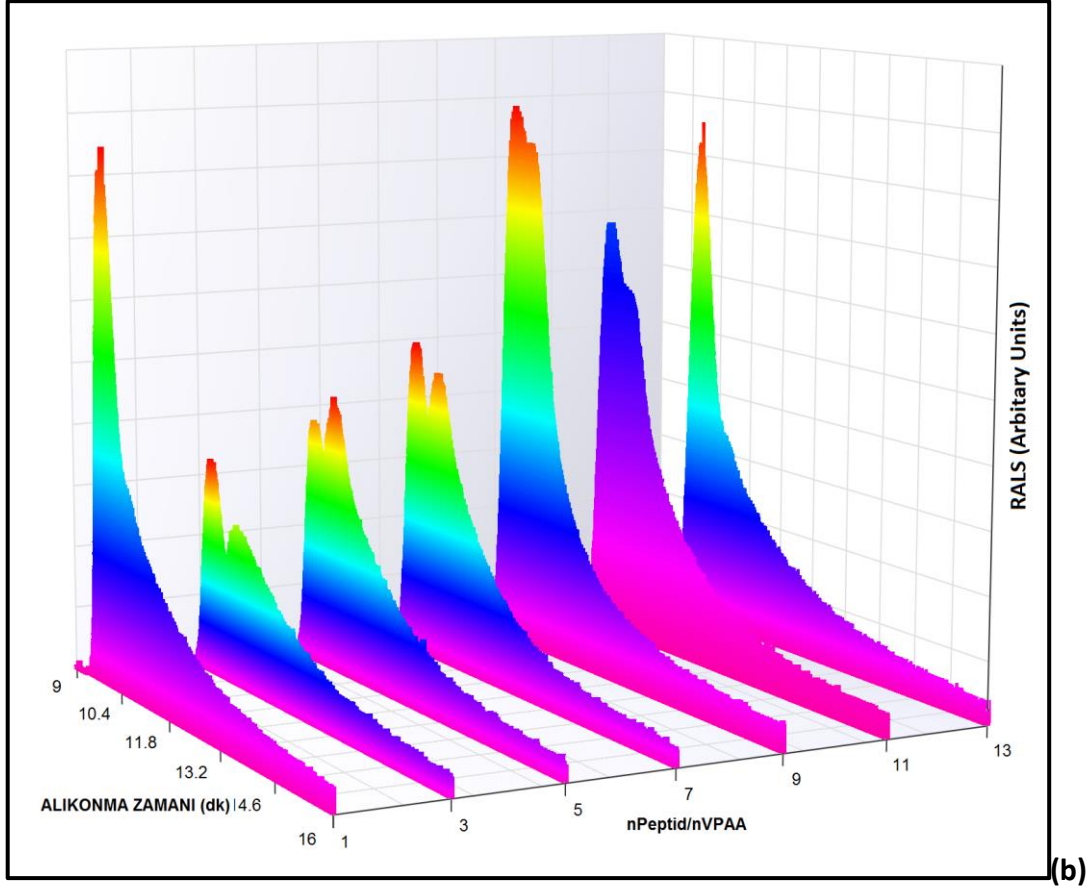


Şekil 4.29 Aβ(1-21) peptidinin VPAA ile farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.30 Aβ peptidi(1-21)-VPAA Konjugatlarına ait UV Absorbansları





Şekil 4.31 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) detektörüne ait SEC kromatogramları

4.7 A β (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Peptid-VPAA konjugasyonlarında öncelikle EDC aktivasyonu farklı aşamalarda yapılmış, daha sonra da aktivasyonun yapıldığı pH değerleri değiştirilerek bağlanmanın en iyi olduğu yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Hesaplamalar

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün VPAA-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{pep}}/n_{\text{VPAA}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, kopolimerin konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki Denklem 4.1'deki eşitlikten reaksiyonlar için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2012,9 \times 5) / 80000 \implies C_{\text{peptid}} = 0,315 \text{ mg/5mL}$$

4.7.1 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen VPAA-A β (1-15) Peptid Konjugatları

Farklı 2 koşul kullanılarak yapılan VPAA(1:2)-A β (1-15) peptid konjugatları, $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=5$ molar oranında sentezlenmiştir. Bu konjugatların sentezi sırasında bir VPAA (1:2) ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

VPAA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

2 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T=5$ mL olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam VPAA(1:2) miktarı 5 mg'dır. 5 mg VPAA tartıldı, 5 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH'ı 5'e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan VPAA(1:2) ara stok çözeltisi hazırlandı.

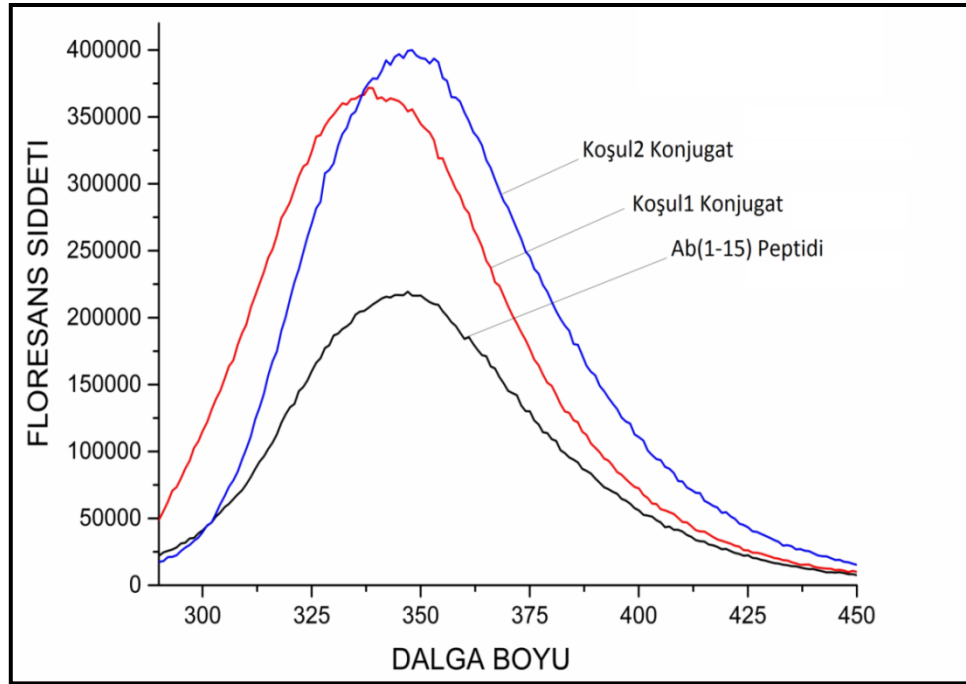
- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. Daha sonra karışmakta olan polimer çözeltisinin üzerine 0.315 mg A β (1-15) peptidi eklendi ve bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra **pH 5'teki** fiziksel karışıma 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, Kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

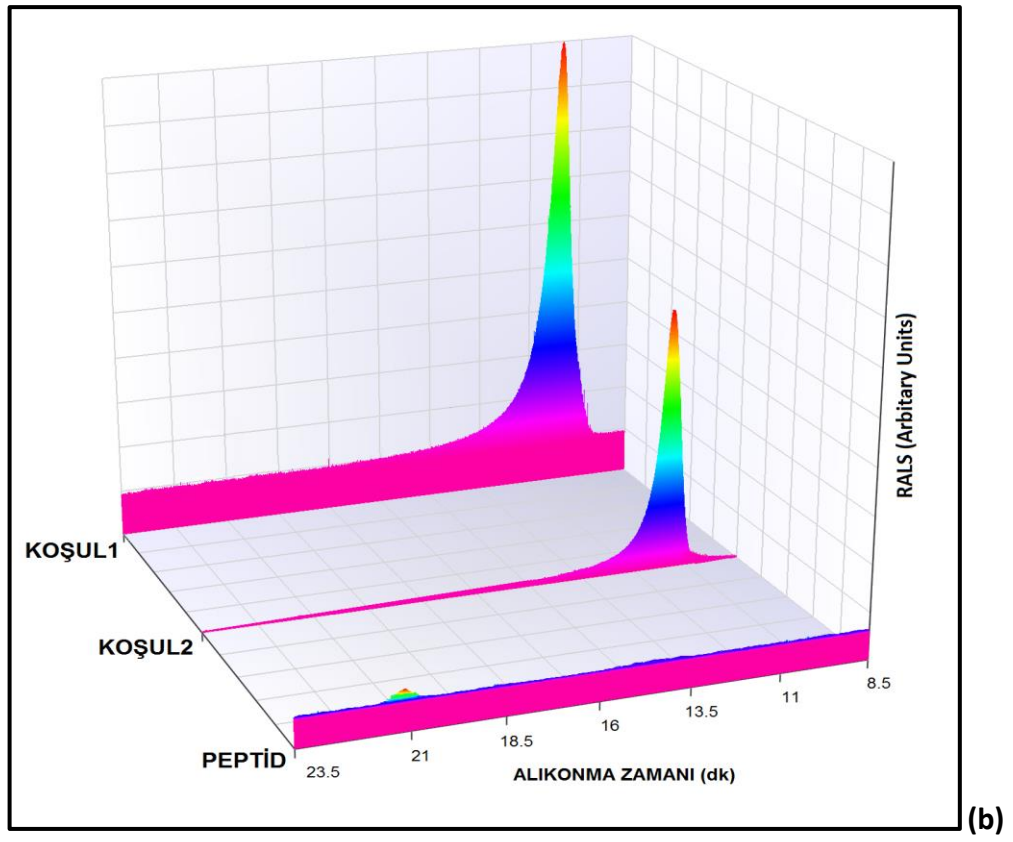
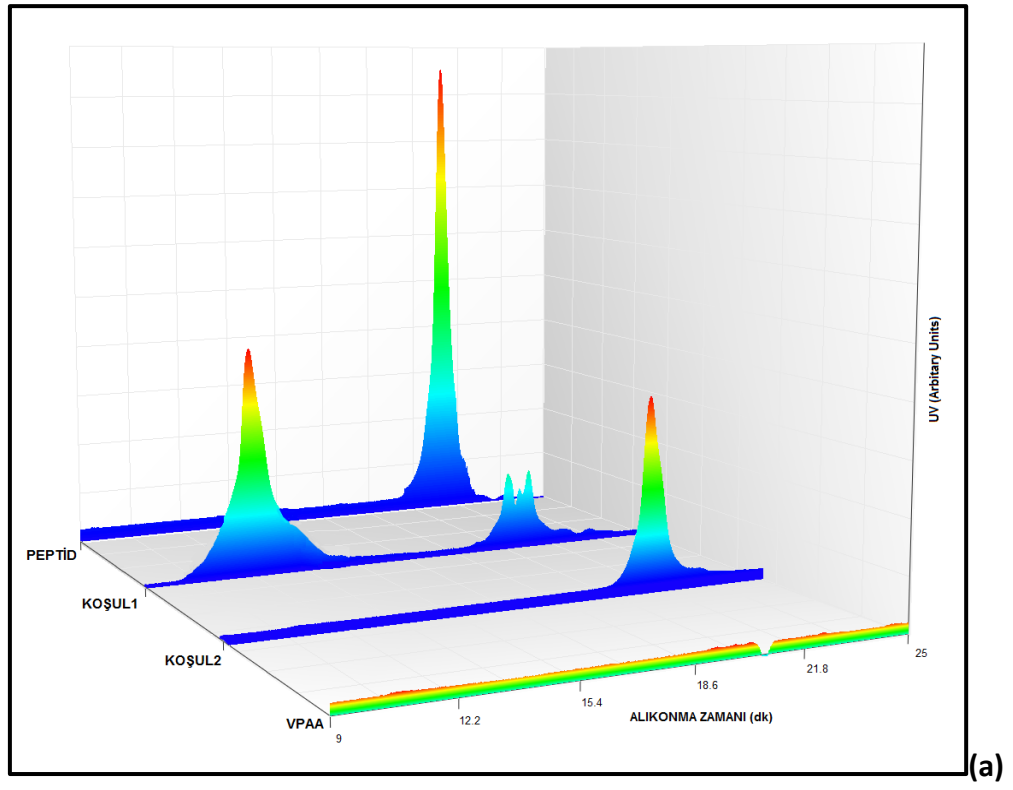
- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

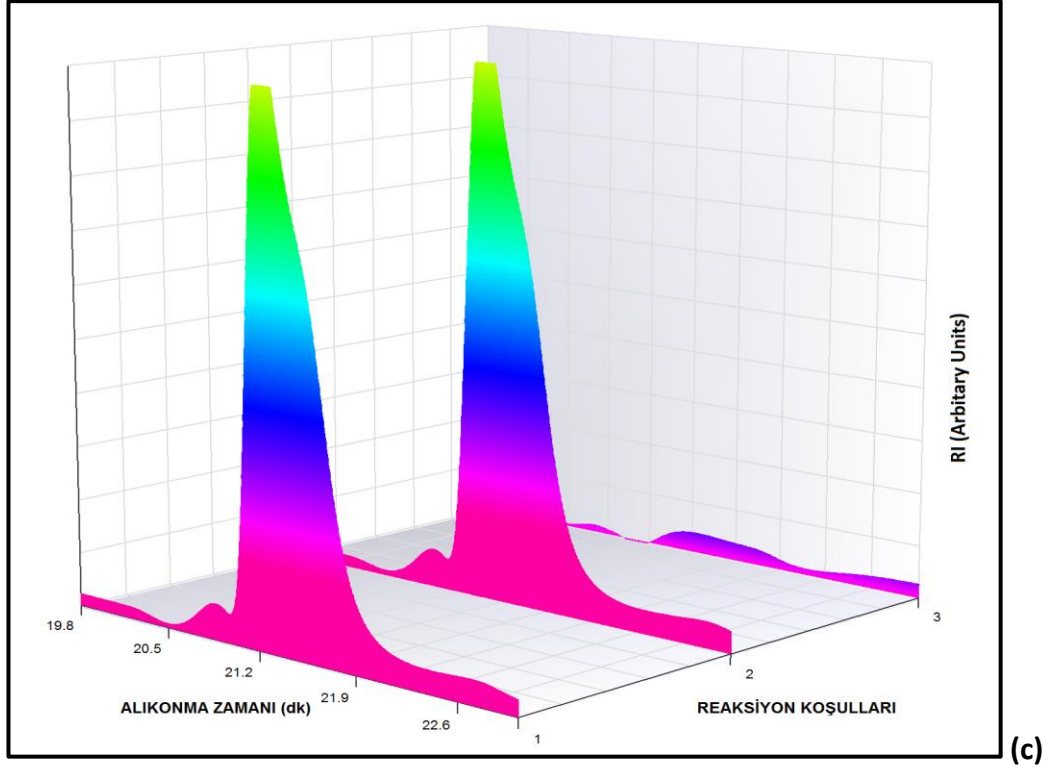
2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. Daha sonra **pH 5'teki** bu çözeltiye 10 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı ($V_T=5$ mL). 2 saat sonra aktive olmuş VPAA çözeltisinin üzerine 0.315 mg A β (1-15) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 gece boyunca, oda sıcaklığında konjugasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV,

Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, Kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 4.32 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin [P(VP-ko-AA)] (Mw=80.000 Da) kopolimeri ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: (■) Tek başına peptid (λ_{max} :348 nm), ve (■) Koşul1 (λ_{max} :338 nm), Koşul2 (■)(λ_{max} :348 nm)'ye göre sentezlenen konjugatlar.





Şekil 4.33 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.7.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen VPAA-A β (1-15) Peptid Konjugatları

VPAA-A β (1-15) peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, Koşul1'e göre yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında bir VPAA (1:2) ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T=5\text{mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 2.2176 mg'dır. 2.5 mg peptid tartılıp, 2.5 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

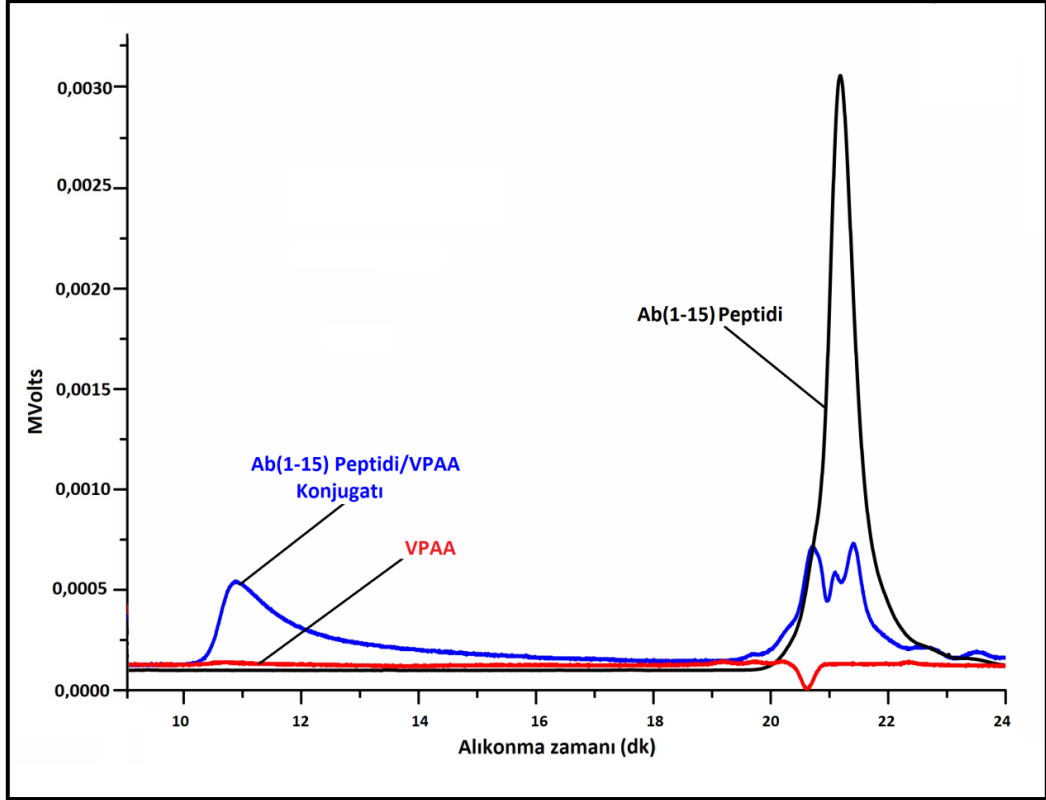
VPAA stok çözeltisinin hazırlanışı:

5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam VPAA miktarı 15 mg'dır. 15 mg polimer tartılıp, 15 mL saf suda çözülerek, 1 mg/1 mL olan VPAA ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

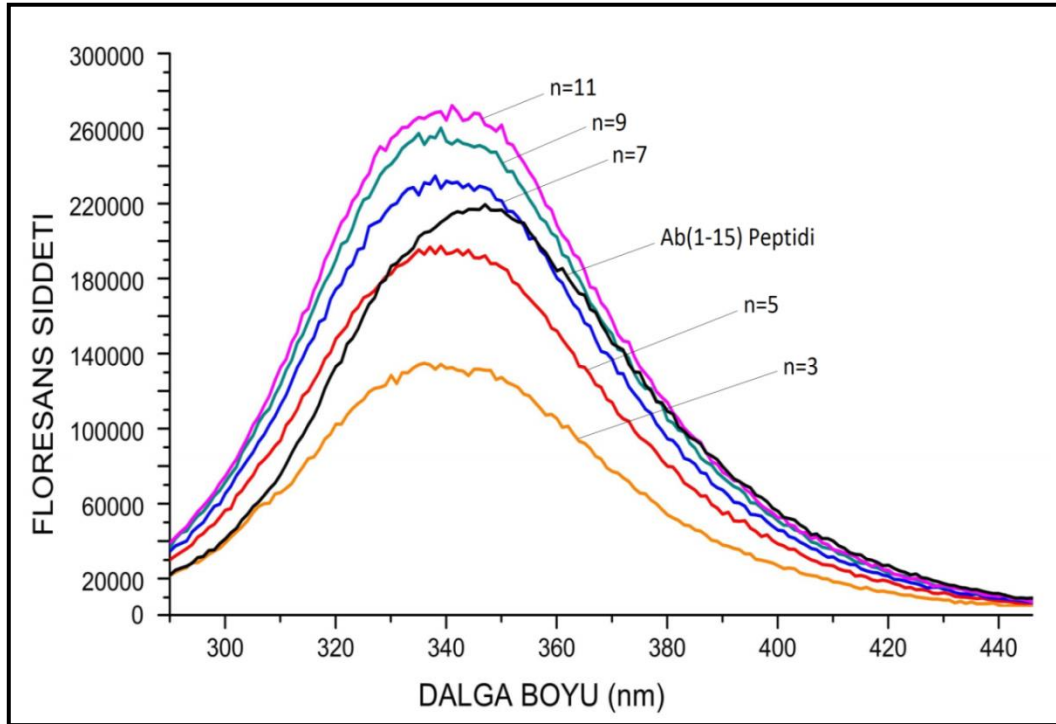
Çizelge 4.4 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranı	C_{VPAA} (mg/5mL)	VPAA ara stok çözeltisinden çekilecek miktar (mL)	C_{pep} (mg/5mL)	Peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	2.5	2.5	0.0126	12.6
3	2.5	2.5	0.189	189
5	2.5	2.5	0.315	315
7	2.5	2.5	0.441	189
9	2.5	2.5	0.567	567
11	2.5	2.5	0.693	693

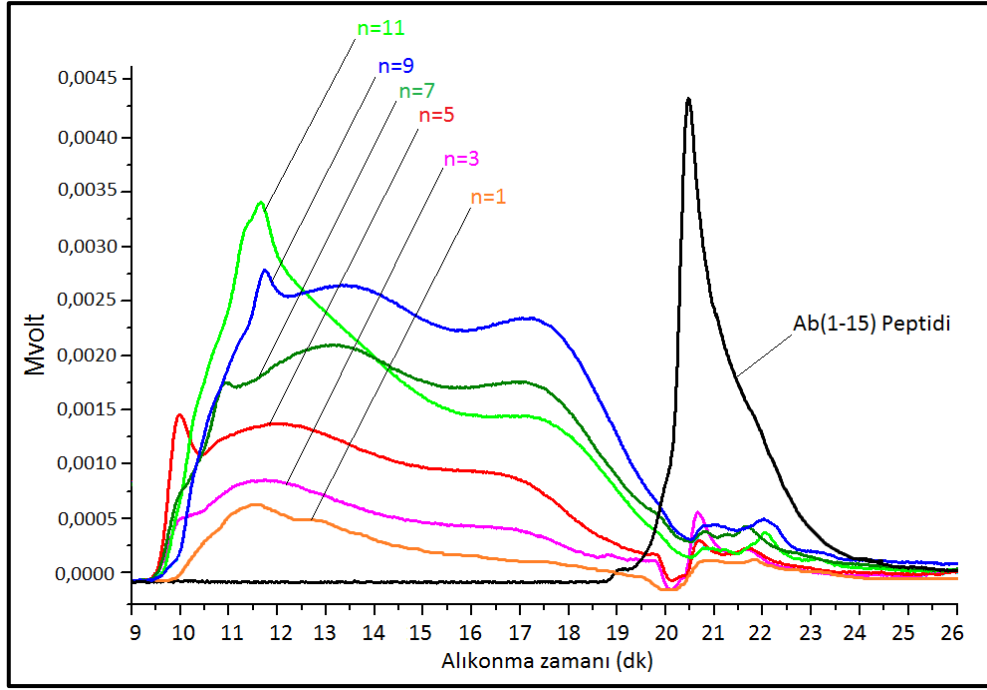
Her bir oran için ara stoktan alınan 2.5 mL VPAA (1:2) pH=5 PBS tamponunda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine, A β (1-15) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için Çizelge 4.4'te belirtilen peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 10 mg EDC eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçüldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



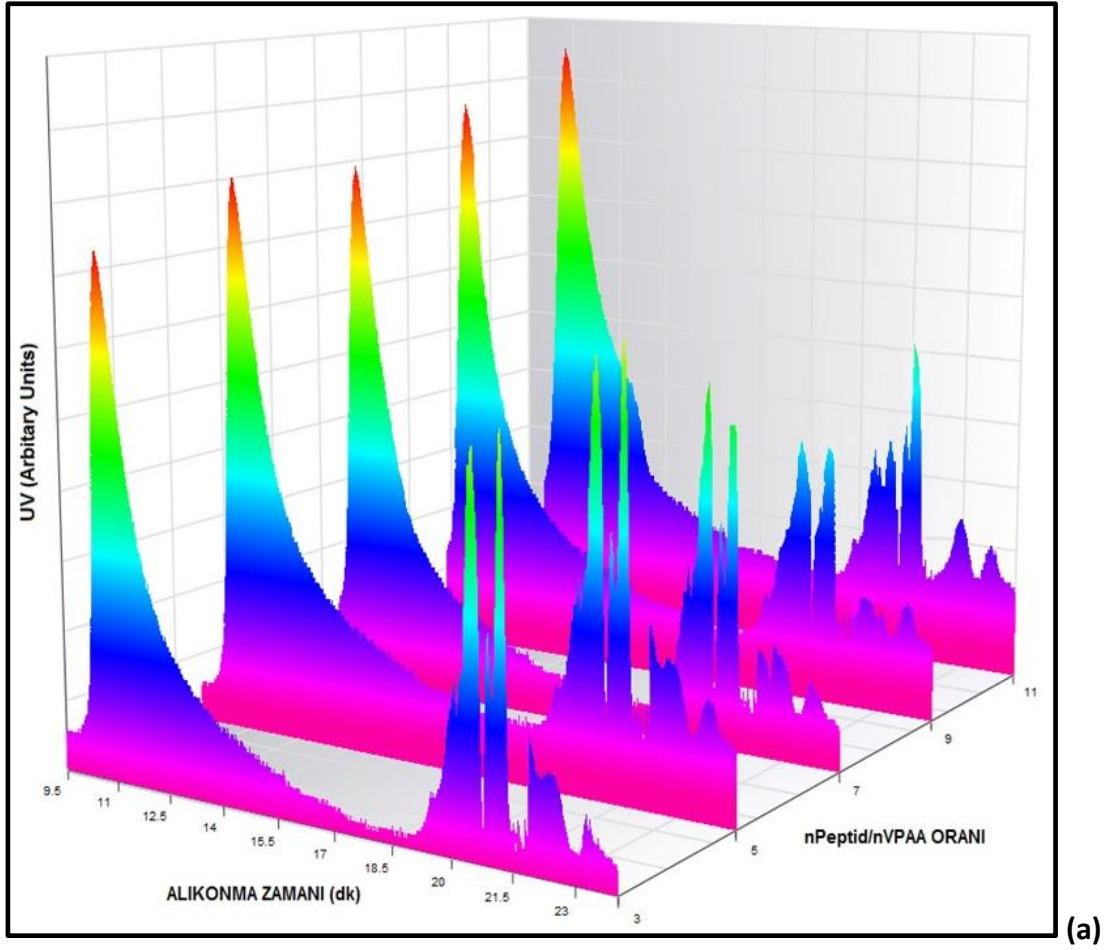
Şekil 4.34 A β (1-15) peptidinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve VPAA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı



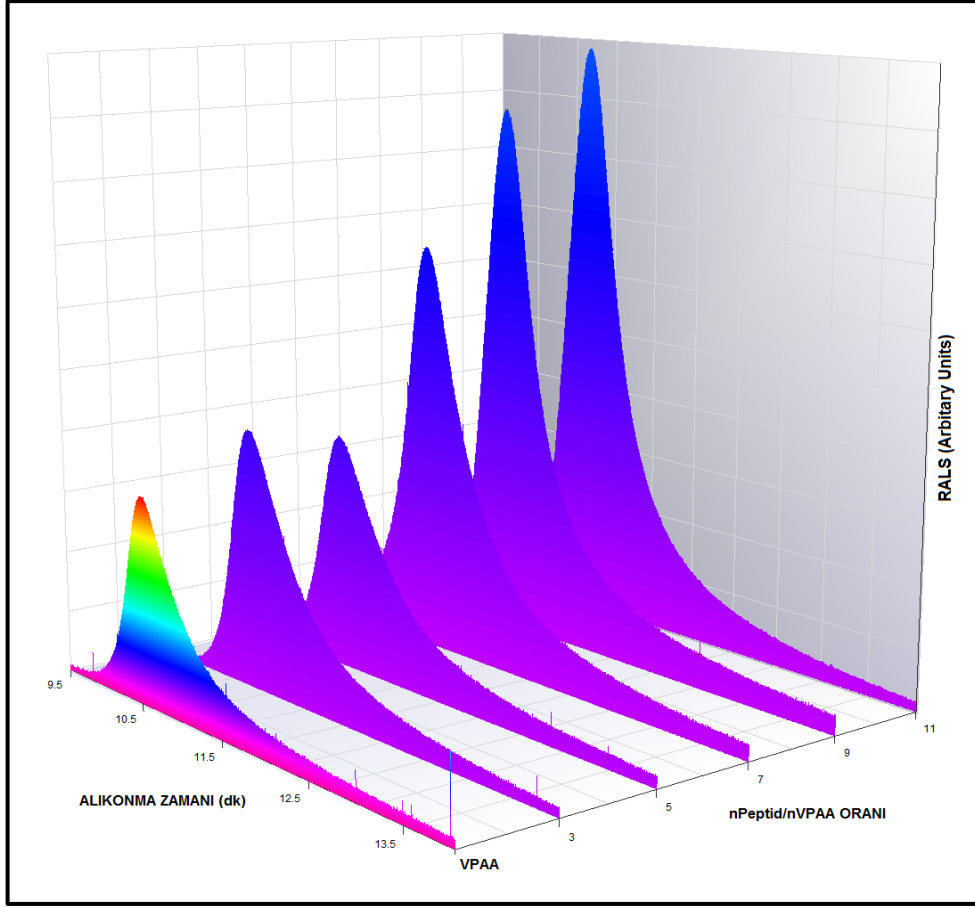
Şekil 4.35 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}} = 3$ (■) ($\lambda_{\text{max}}=338$ nm), 5 (■) ($\lambda_{\text{max}}=338$ nm), Serbest peptid (■) ($\lambda_{\text{max}}=348$ nm), 7 (■) ($\lambda_{\text{max}}=338$ nm), 9 (■) ($\lambda_{\text{max}}=339$ nm), 11 (■) ($\lambda_{\text{max}}=340$ nm)



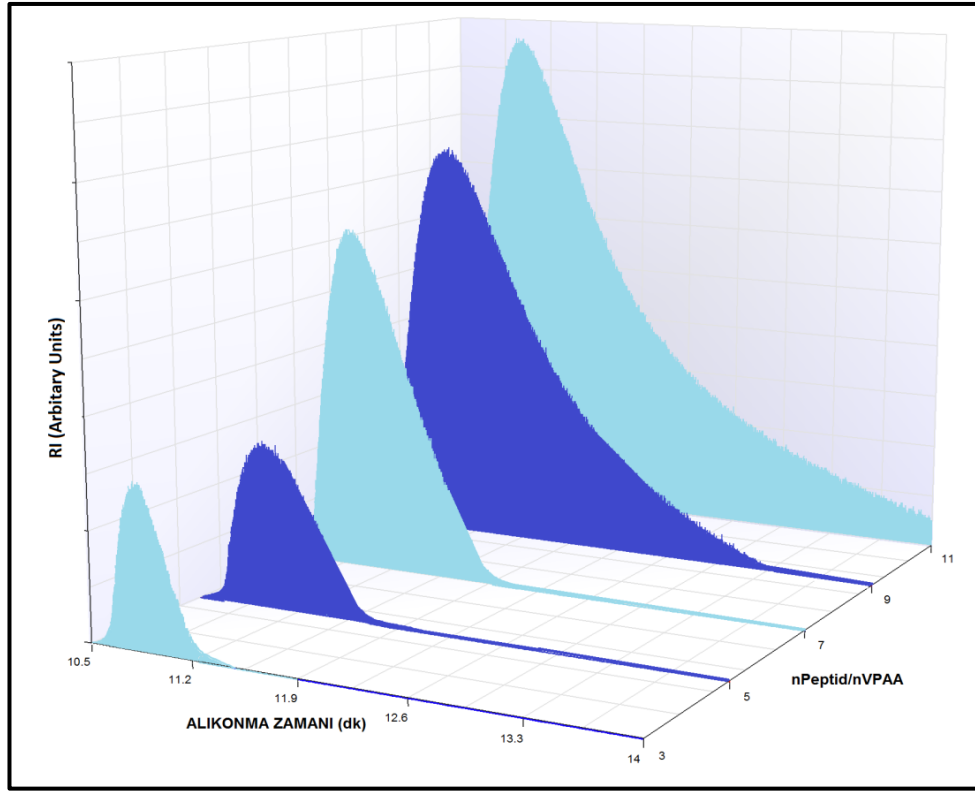
Şekil 4.36 A β (1-15) peptidinin VPAA ile farklı mol oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.37 Farklı bağlanma oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.8 Bovine Serum Albumin (BSA) ile Yapılan Konjugasyon Reaksiyonları

4.8.1 Aβ (1-21) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Peptid-BSA konjugasyonlarında farklı pH'larda aktivasyonlar yapılarak bağlanmanın en iyi gerçekleştiği koşul belirlenmeye çalışılmıştır. BSA protein yapıda bir taşıyıcı makromolekül olduğundan, pH değişimlerinden diğer taşıyıcı moleküllere göre kıyaslandığında çok daha fazla etkilenmektedir.

Hesaplamalar

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün BSA-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, BSA'nın konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki eşitlikten reaksiyonlar için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2719,9 \times 5) / 66000 \quad \Rightarrow \quad C_{\text{peptid}} = 0,515 \text{ mg/5mL}$$

BSA Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

4 farklı koşulda sentezlenen $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ konjugatı, $V_T= 5\text{mL}$ olacak şekilde sentez yapılacağından, öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 10 mg'dır. 10 mg BSA tartıldı, 10 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH'ı 5'e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlandı.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için gerekli miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 2.060 mg'dır. 2.1 mg peptid tartılıp, 2.1 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

4.8.2 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen Konjugatlar

- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg BSA, pH=7 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 7'ye** ayarlandı. Daha sonra **pH 7'deki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 saatin sonunda, çözeltinin pH'ı 5'e çekildi ve bu çözeltiye **pH 5'de** 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı. Yaklaşık 1 saat pH 7'de karıştırıldıktan sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırılır ve elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg BSA, pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. Daha sonra **pH 5'teki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 saatin sonunda, **pH 5'deki** bu çözeltiye 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı. Yaklaşık 1 saat pH 7'de karıştırıldıktan sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırılır ve elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

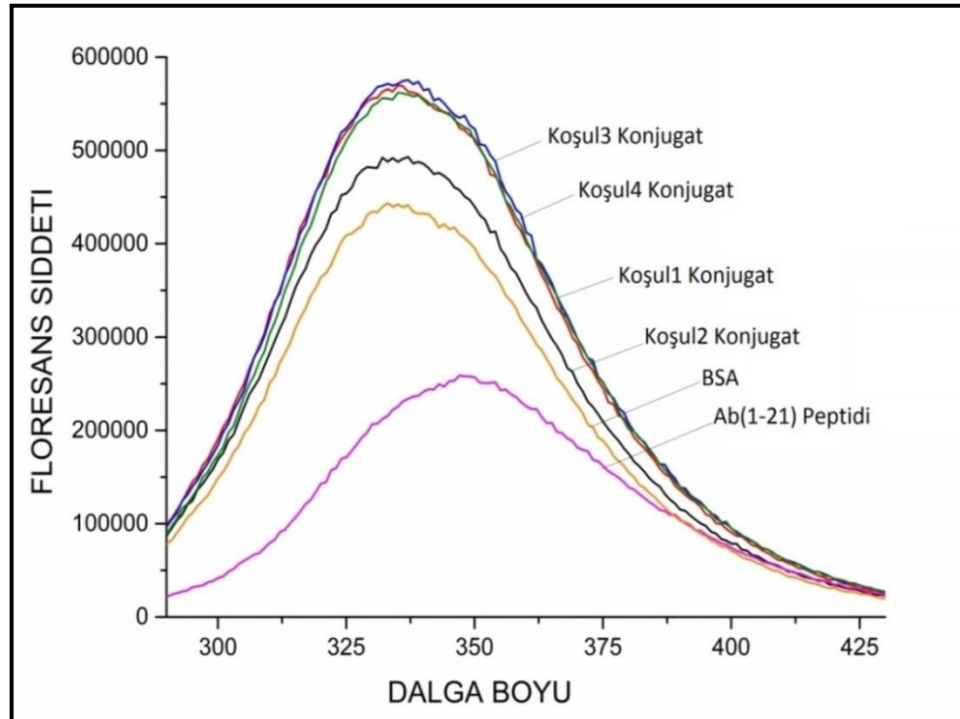
- **Koşul 3'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg BSA, pH=7 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 7'ye** ayarlandı. Daha sonra **pH 7'teki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi içeren çözelti eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 saatin sonunda, çözeltinin pH'ı 6'ya çekildi ve bu çözeltiye **pH 6'da** 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı. Yaklaşık 1 saat pH 7'de karıştırıldıktan

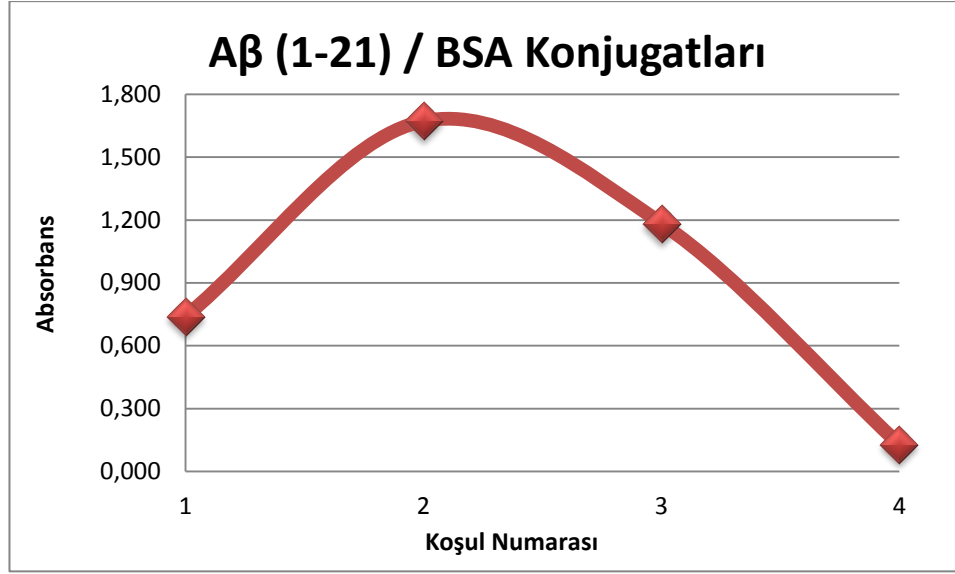
sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırılır ve elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

- **Koşul 4'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

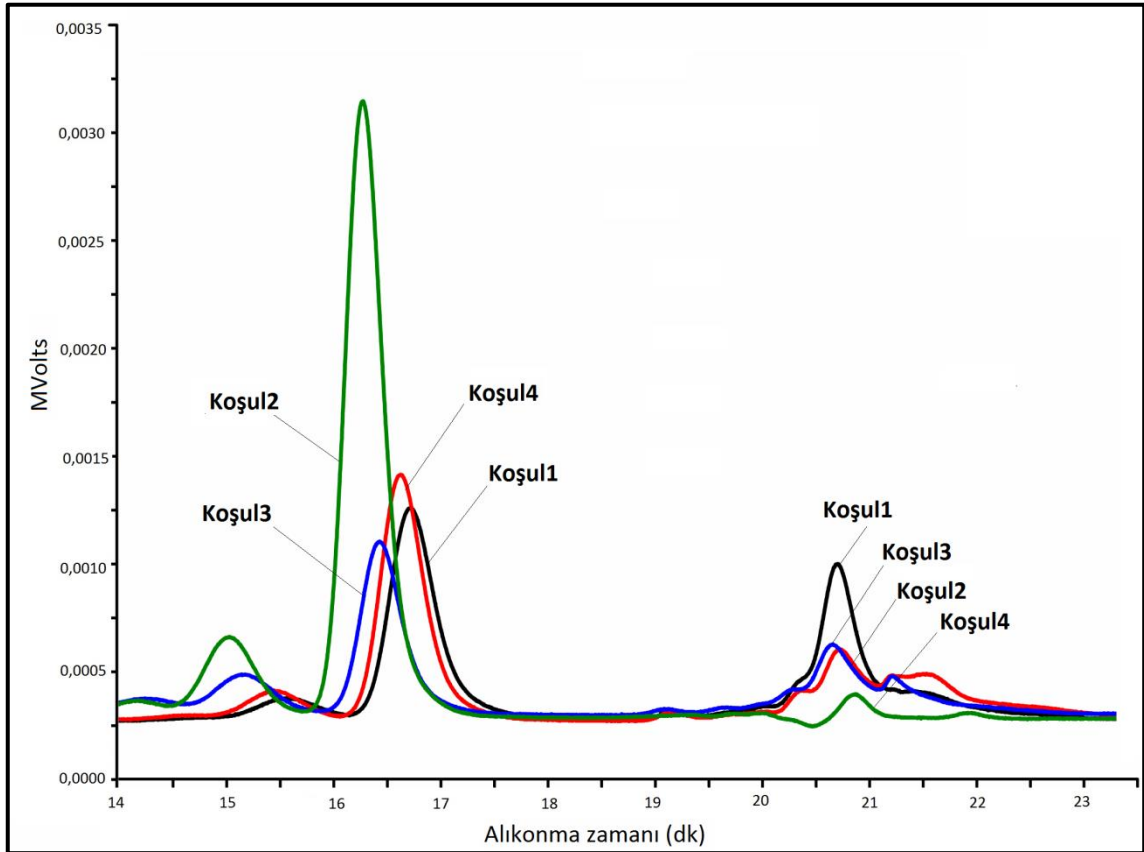
3 mg BSA, pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 5.7'ye (peptidin izoelektrik noktası)** ayarlandı. Daha sonra **pH 5.7'deki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 saatin sonunda, **pH 5'deki** bu çözeltiye 10 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı. Yaklaşık 1 saat pH 7'de karıştırıldıktan sonra, membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırılır ve elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 4.38 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: (■) Tek başına peptid (λ_{max} =347nm), (■) BSA (λ_{max} =334nm), (■) Koşul1 (λ_{max} =336nm), (■) Koşul2 (λ_{max} =332nm), (■) Koşul3 (λ_{max} =337nm), (■) Koşul4 (λ_{max} =335nm)'ye göre sentezlenen konjugatlar



Şekil 4.39 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının koşula bağlı absorbans değişimi grafiği



Şekil 4.40 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı

4.8.3 Farklı Oranlarda Sentezlenen BSA-A β (1-21) Peptid Konjugatları

A β (1-21)/BSA peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu Koşul 2’de olduğu gibi yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında daha önce bahsedilen BSA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması

6 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1’e uygun olarak her bir konjugat için Çizelge 4.5’te verilen miktarlar hesaplanmıştır. Toplam kullanılacak peptid miktarı 4.408 mg’dır. 4.5 mg peptid tartıldı ve 4.5 mL pH=5 olan PBS’te çözülerek, 1mg/1 mL olan çözelti hazırlandı.

BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

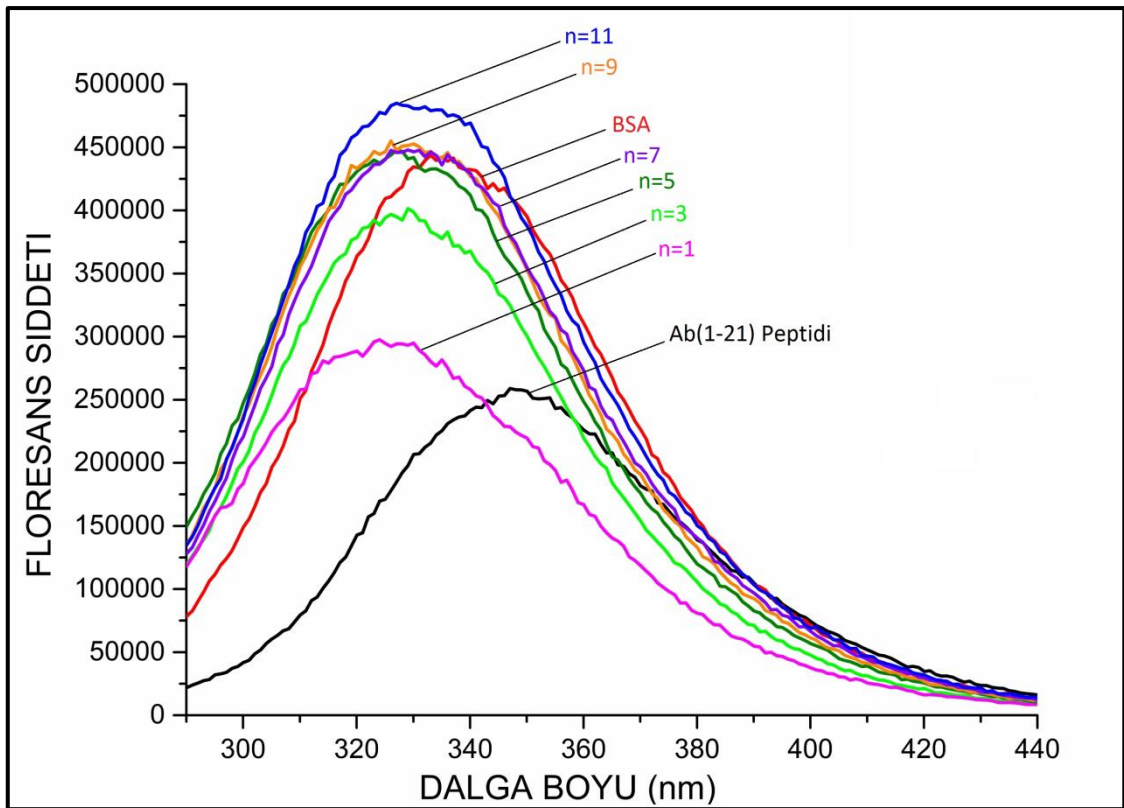
6 farklı koşulda sentezlenen $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ konjugatı , $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde sentez yapılacağından, öncelikle Denklem 4.1’e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 15 mg’dır. 15 mg BSA tartıldı, 15 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH’ı 5’e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 4.5 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

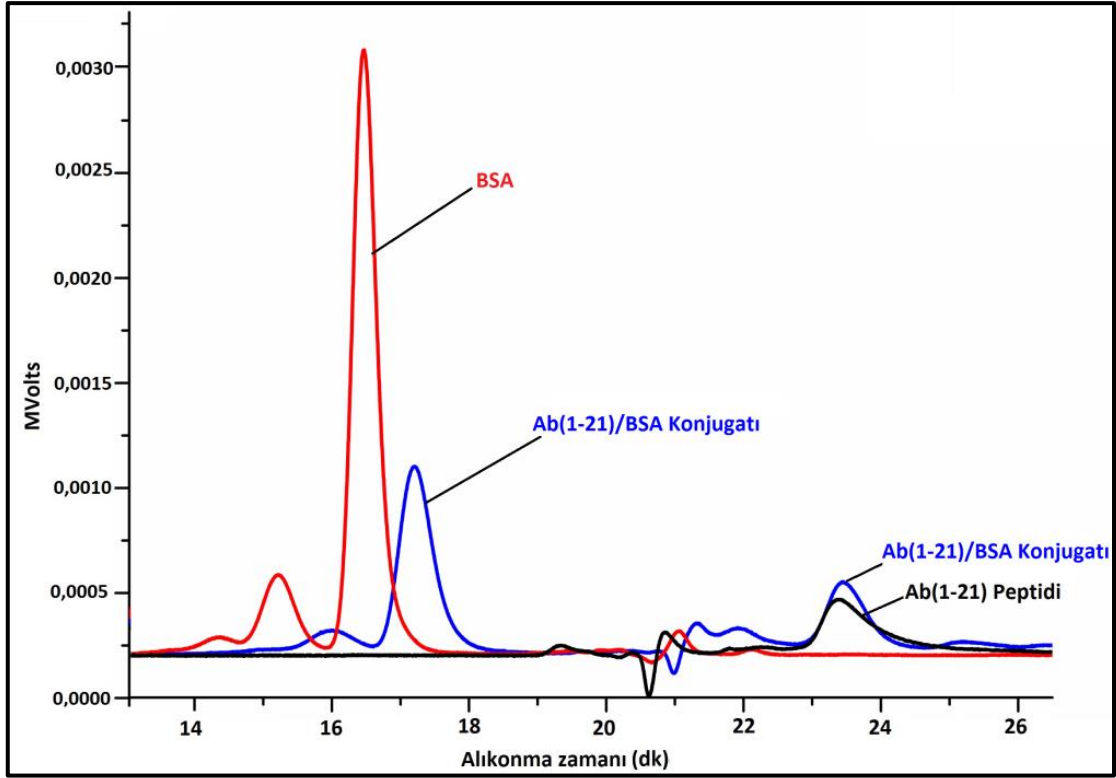
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranı	C_{pep} (mg/5mL)	A β (1-21) peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	0.103	103
3	0.309	151
5	0.515	252
7	0.721	352
9	0.927	453
11	1.133	553

Ara stoktan alınan 2.5 mL BSA, üzerine tamamlanacak miktarda pH=5 PBS tamponu eklendi ve çözeltinin pH’sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5’e ayarlandı. Bu BSA çözeltisine, A β (1-21) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için gerekli olan ve Çizelge 4.5’te belirtilen peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık

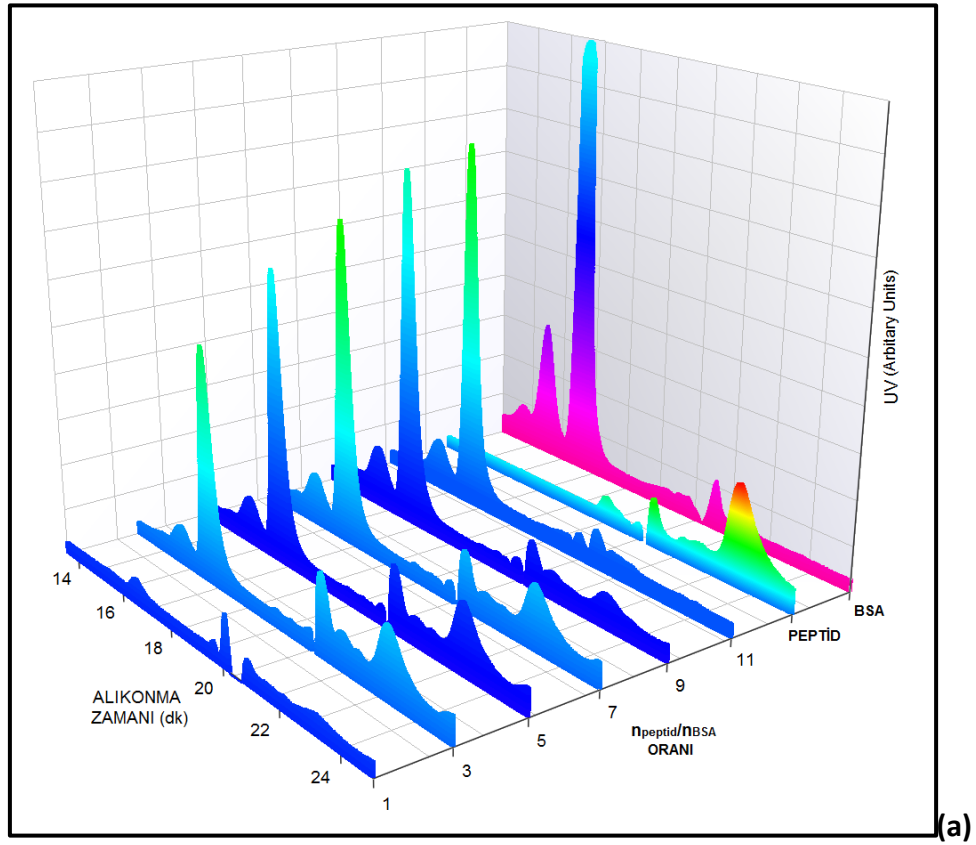
2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 10 mg EDC eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçüldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

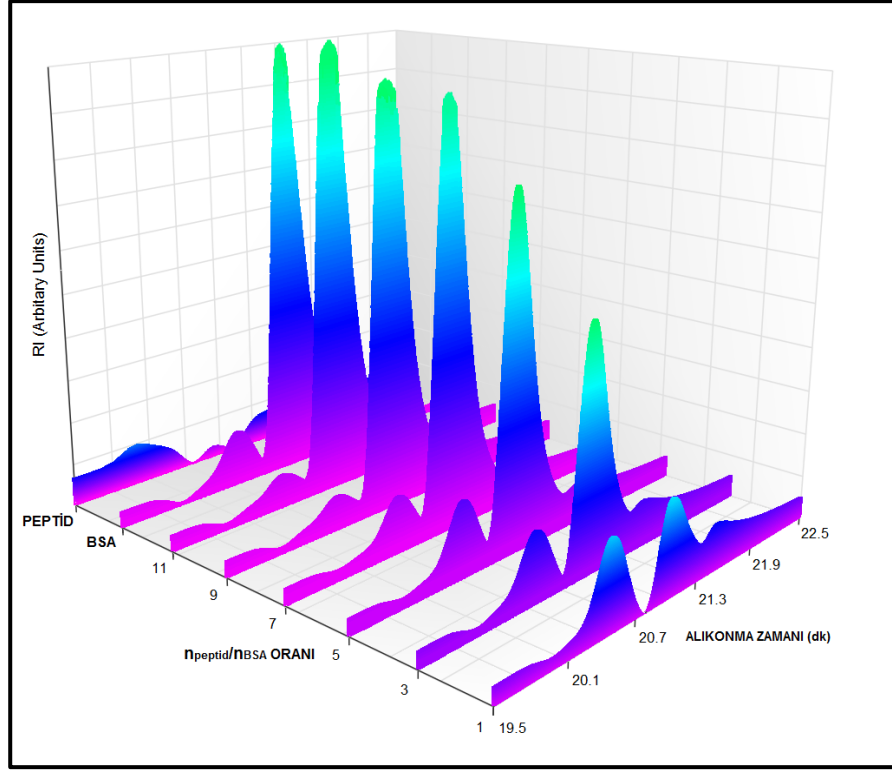


Şekil 4.41 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Serbest peptid (■) (λ_{max}=347nm): nPeptid/nBSA= 1(■) (λ_{max}=324nm): 3(■) (λ_{max}=329nm): 5(■) (λ_{max}=326nm): 7(■) (λ_{max}=329nm): 9 (■) (λ_{max}=326nm): 11 (■) (λ_{max}=327nm)

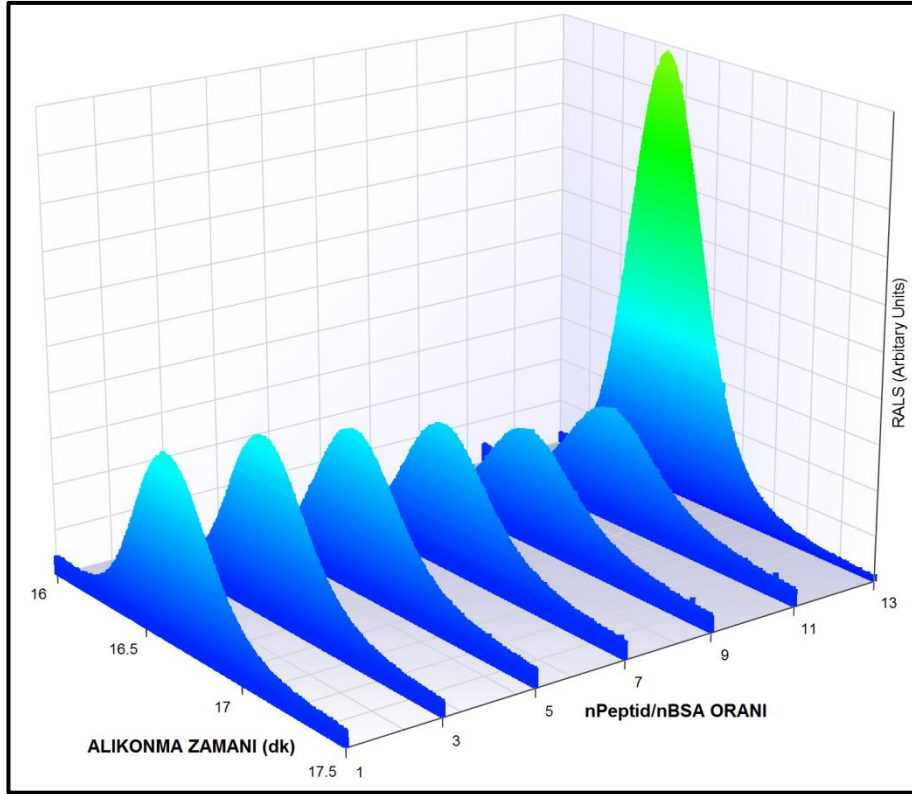


Şekil 4.42 A β (1-21) peptidinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve BSA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı



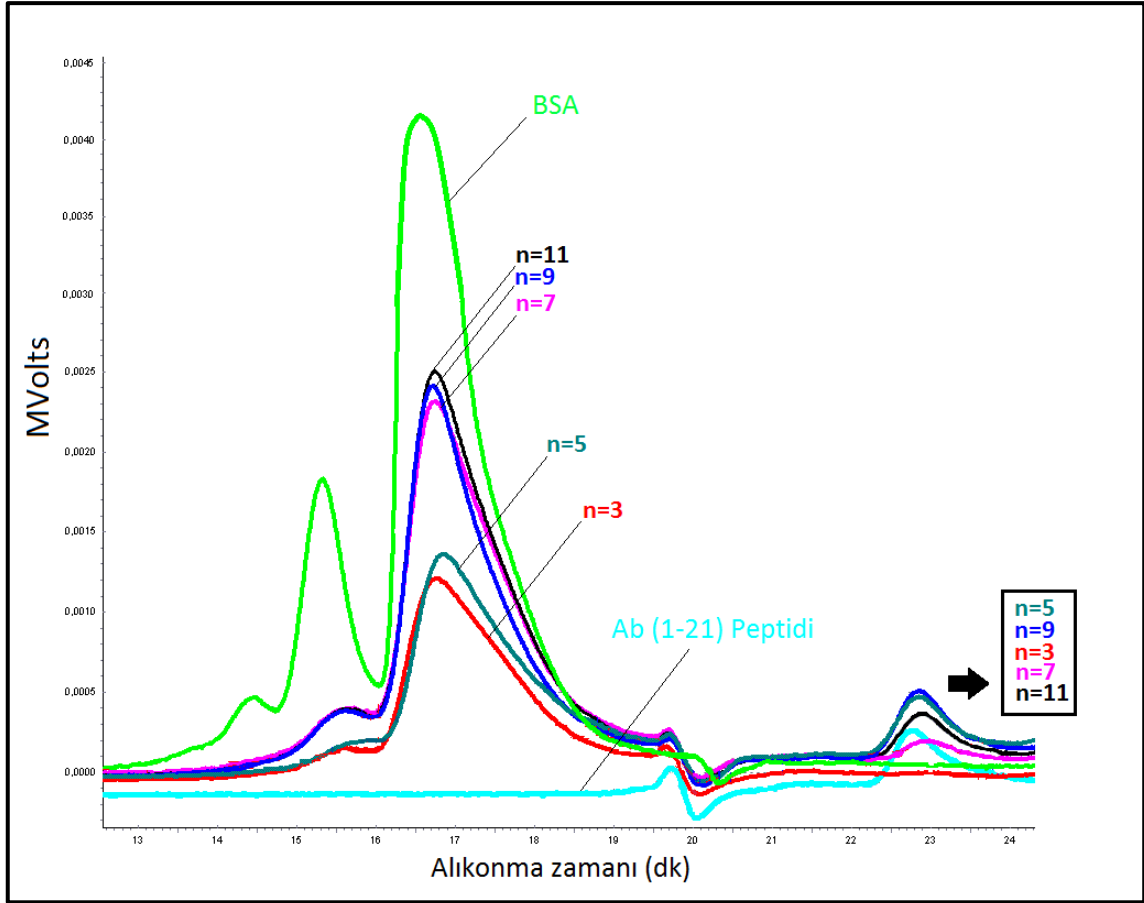


(b)



(c)

Şekil 4.43 Farklı bağlanma oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugatlarının; (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları



Şekil 4.44 A β (1-21) peptidinin BSA ile farklı bağlanma oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramları

4.8.4 A β (1-15) Dizisi Kullanılarak Sentezlenen Konjugatlar

Bu peptid dizisi ile BSA arasında yapılan konjugasyonlarında öncelikle farklı pH'larda aktivasyonlar yapılarak bağlanmanın en iyi gerçekleştiği koşul belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra farklı bağlanma oranlarında konjugasyonlar yapılarak, en iyi bağlanma oranı belirlenmeye çalışılmıştır.

İlk olarak farklı koşullarda yapılacak olan konjugasyonlar için gerekli hesaplamalar yapılmıştır:

Hesaplamalar

Koşullar arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün BSA-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranında sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda, BSA'nın konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki eşitlikten reaksiyonlar için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$C_{\text{peptid}} = (0.5 \times 2012,9 \times 5) / 66000 \implies C_{\text{peptid}} = 0,515 \text{ mg/5mL}$$

BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

3 farklı koşulda sentezlenen $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ konjugatı , $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde sentez yapılacağından, öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 7.5 mg'dır. 7.5 mg BSA tartıldı, 7.5 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH'ı 5'e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlandı.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

2 farklı konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 1,143 mg'dır. 1.2 mg peptid tartılıp, 1.2 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

4.8.5 Farklı Reaksiyon Koşullarında Sentezlenen A β (1-15) – BSA Konjugatları

- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

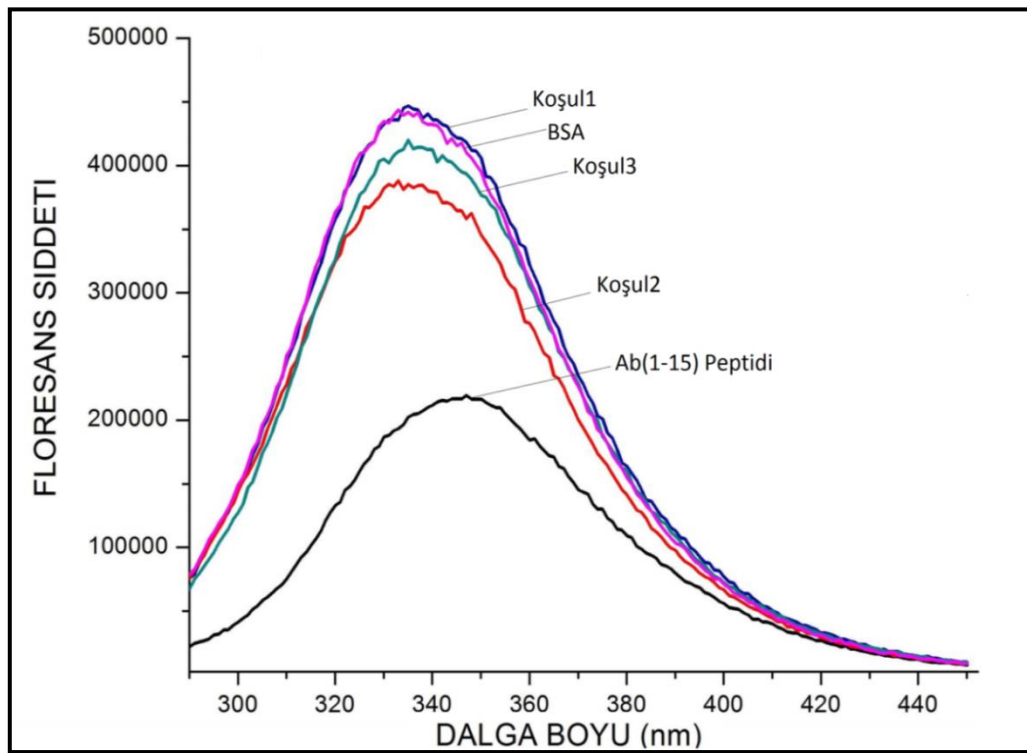
2.5 mg BSA ara stok çözeltisinden alındı ve üzerine 2.119 mL pH 5 olan PBS eklendi. Daha sonra **pH 5'teki** bu çözeltiye 7.5 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat kadar karıştırıldı. 1 saat sonra aktive olmuş BSA moleküllerinin üzerine, 381 μL A β (1-15) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 gece boyunca, oda sıcaklığında konjugasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'sı kontrol edildi ve pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

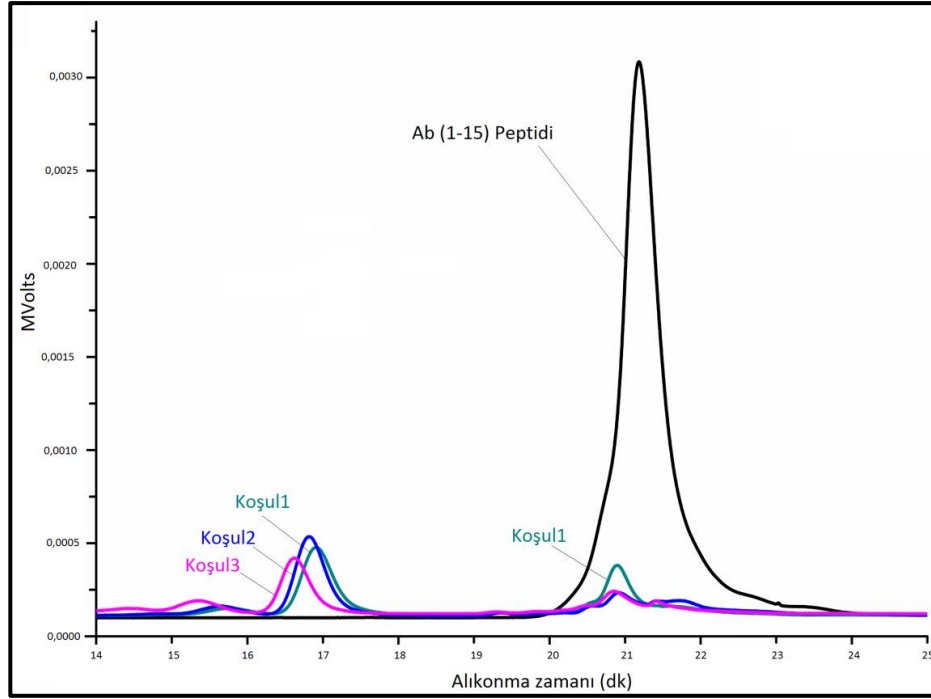
2.5 mg BSA ara stok çözeltisinden alındı ve üzerine 2.119 mL pH 5 olan PBS eklendi. Daha sonra **pH 5'teki** bu BSA çözeltisinin üzerine 381 μL A β (1-15) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıldı. 2 saatin sonunda, 7.5 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

- **Koşul 3'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

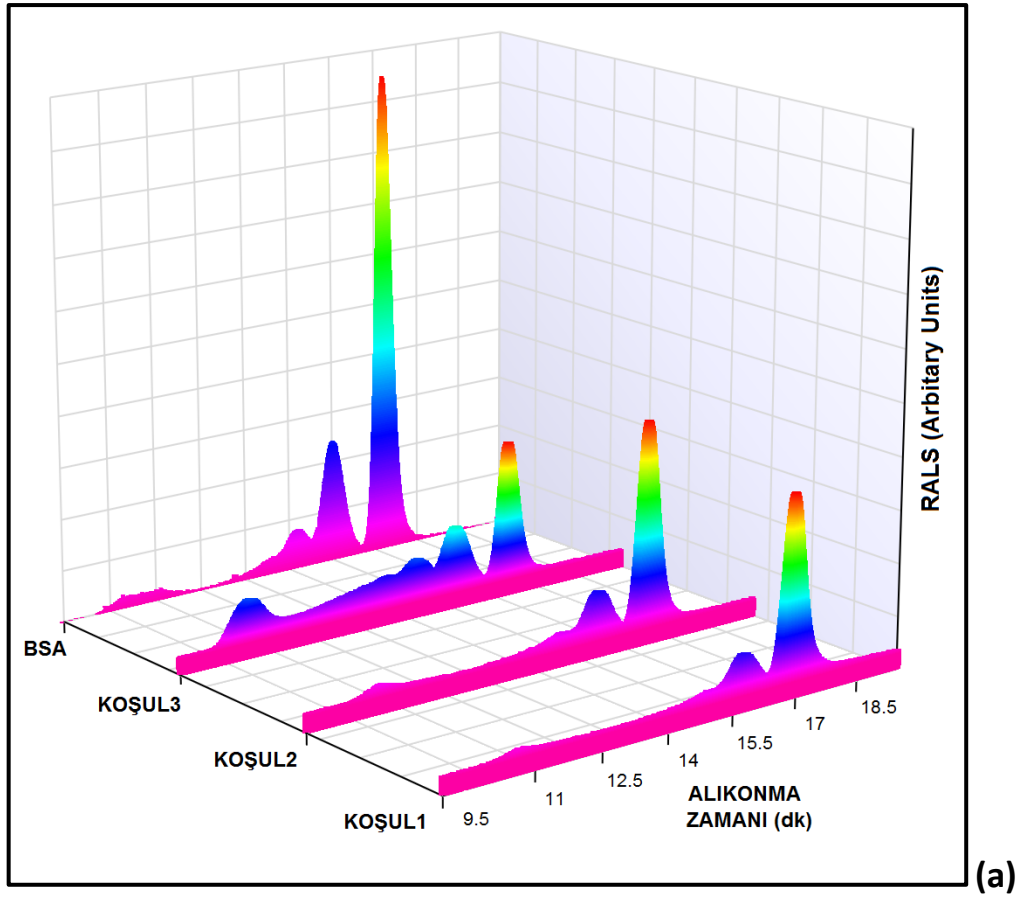
2.5 mg BSA ara stok çözeltisinden alındı ve üzerine 2.119 mL pH 5 olan PBS eklendi. Daha sonra **pH 5'teki** bu BSA çözeltisinin üzerine 381 µL Aβ (1-15) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. 2 saatin sonunda, çözeltinin pH'ı 7'ye çekildi ve bu çözeltiye **pH 7'de** 7.5 mg EDC ilave edilerek 1 gece boyunca, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Ertesi sabah, çözeltinin pH'ı ölçüldü ve 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat de pH=7'de karıştırıldı.

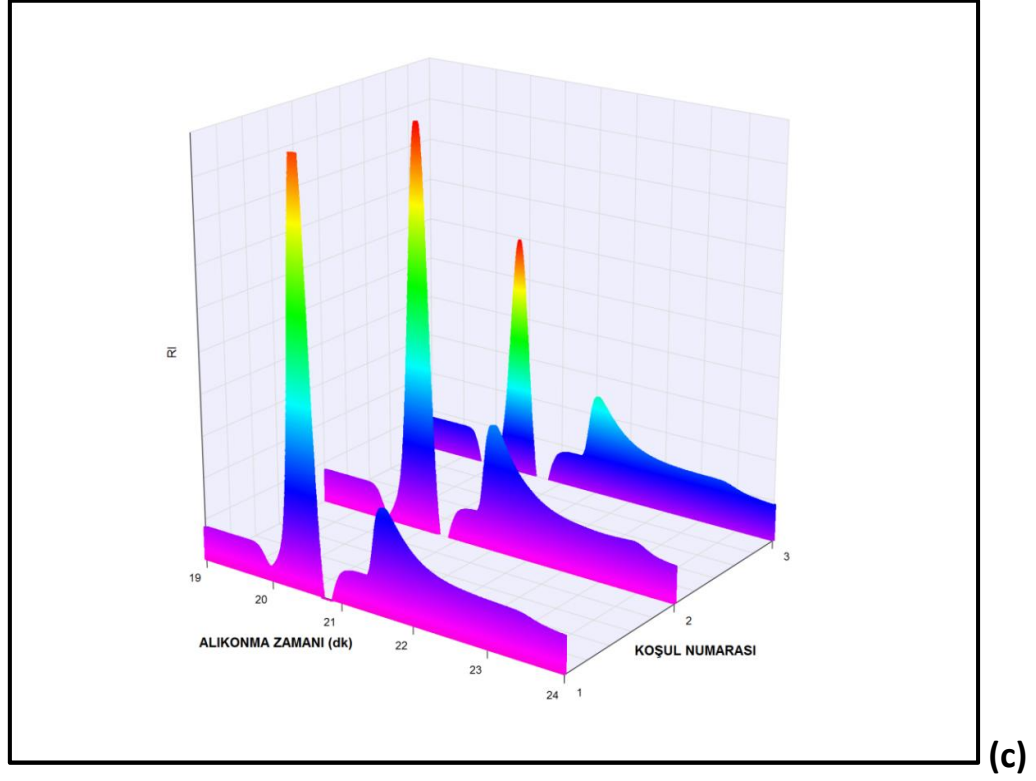
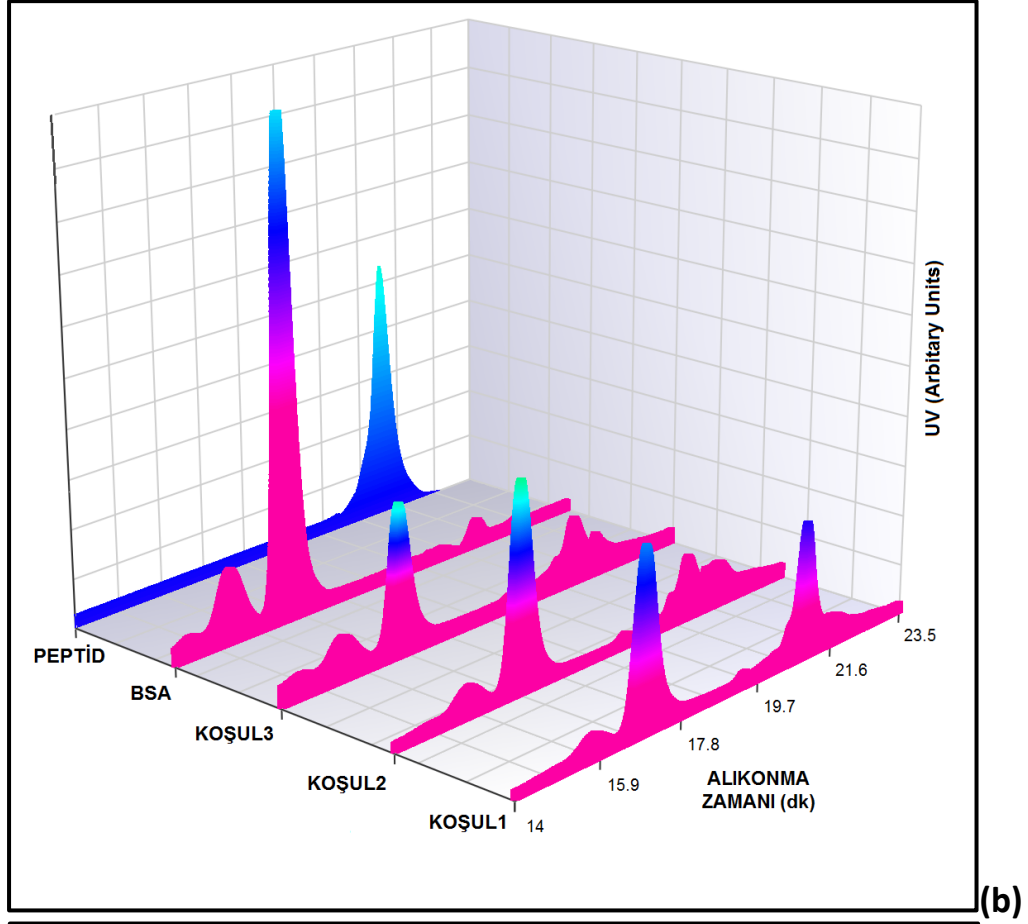


Şekil 4.45 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Tek başına peptid (■) (λ_{max}:348 nm), BSA (λ_{max}:334 nm), Koşul1 (■) (λ_{max}:334 nm), Koşul2 (■) (λ_{max}:330 nm), Koşul3 (■)(λ_{max}:335 nm)'e göre sentezlenen konjugatlar



Şekil 4.46 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarına ait HPLC kromatogramı





Şekil 4.47 Farklı koşullarda sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.8.6 Farklı Oranlarda Sentezlenen BSA-A β (1-15) Peptid Konjugatları

A β (1-15) peptidinin BSA ile farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, Koşul 2’de olduğu gibi yapılmıştır. Bu konjugatların sentezi sırasında daha önce bahsedilen BSA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması

5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 4.1’e uygun olarak her bir konjugat için Çizelge 4.6’da verilen miktarlar hesaplanmıştır. Toplam kullanılacak peptid miktarı 2.658 mg’dır. 2.7 mg peptid tartıldı ve 2.7 mL pH=5 olan PBS’te çözülerek, 1mg/1 mL olan çözelti hazırlandı.

BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

5 farklı oranda sentezlenen $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ konjugatı, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde sentez yapılacağından, öncelikle Denklem 4.1’e uygun olarak her bir konjugat için gereken reaktif madde miktarları hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 12.5 mg’dır. 12.5 mg BSA tartıldı, 12.5 mL PBS (pH=5) çözüldü ve çözeltinin pH’ı 5’e ayarlanarak, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 4.6 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

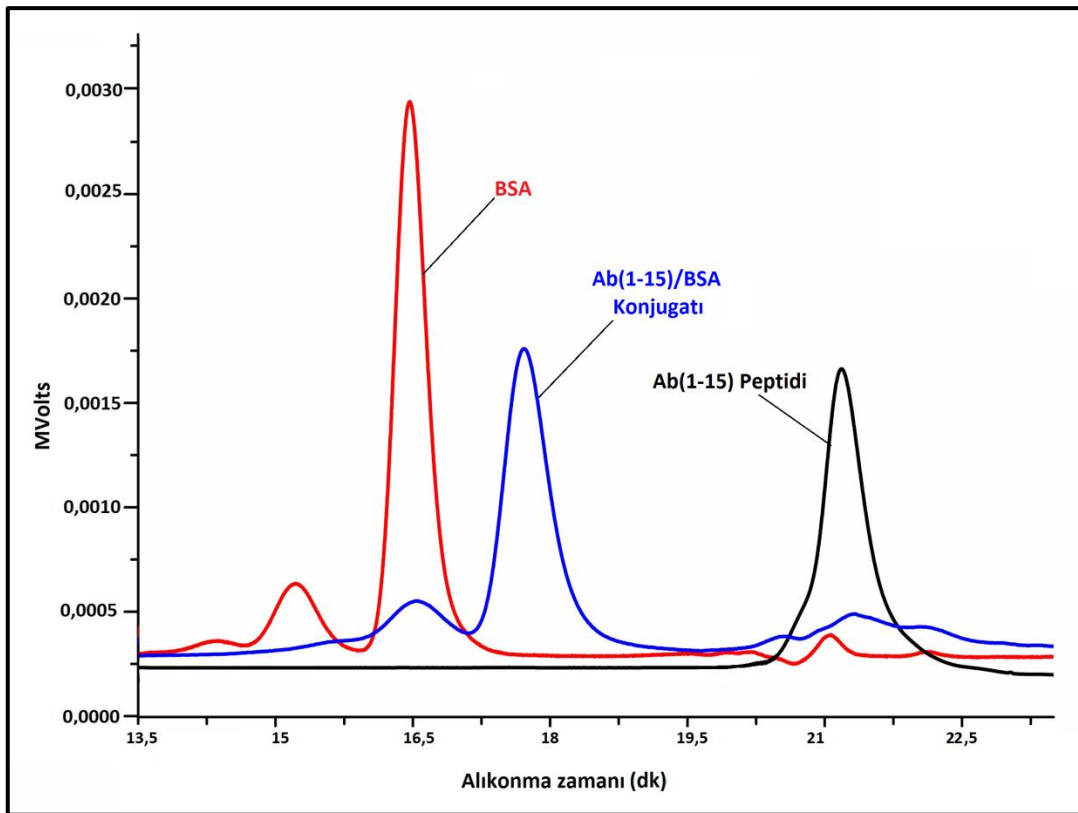
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranı	C_{pep} (mg/5mL)	A β (1-15) peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
3	0.228	228
5	0.38	380
7	0.53	530
9	0.684	684
11	0.836	836

Ara stoktan alınan 2.5 mL BSA, üzerine tamamlanacak miktarda pH=5 PBS tamponu eklendi ve çözeltinin pH’sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5’e ayarlandı. Bu BSA çözeltisine, A β (1-15) peptid ara stok çözeltisinden her bir oran için gerekli olan ve Çizelge 4.6’da belirtilen peptid miktarları kısım kısım eklendi ve yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH’sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, her bir oran için reaksiyon ortamına 7.5 mg EDC eklendi ve 1

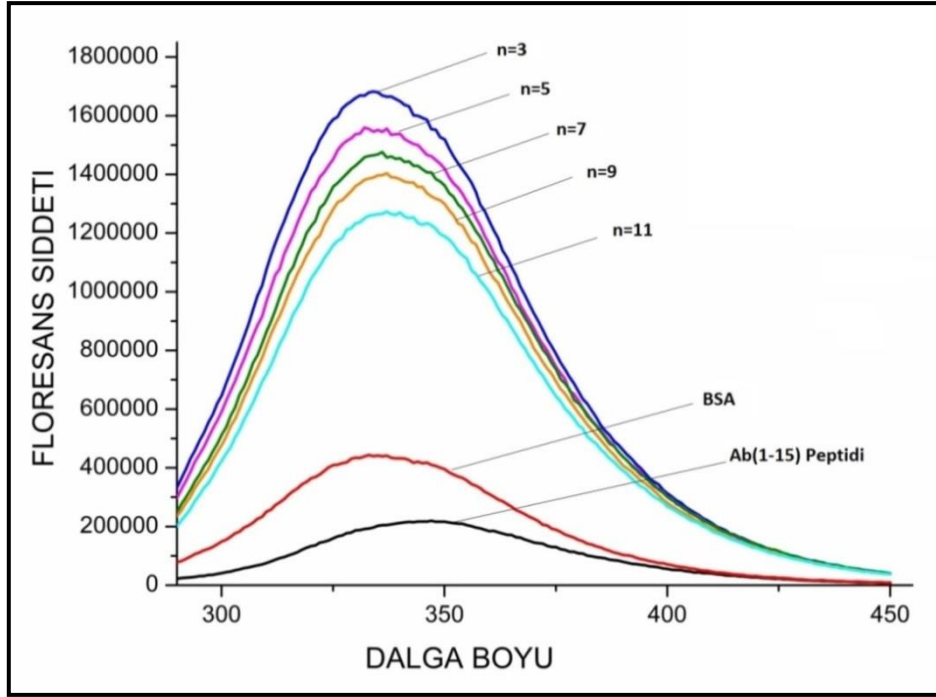
gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyon için karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH'ları tekrar ölçüldü, pH=7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldı.

4.8.7 Sentezlenen Konjugatların Saflaştırması ve Örnek Hazırlanması

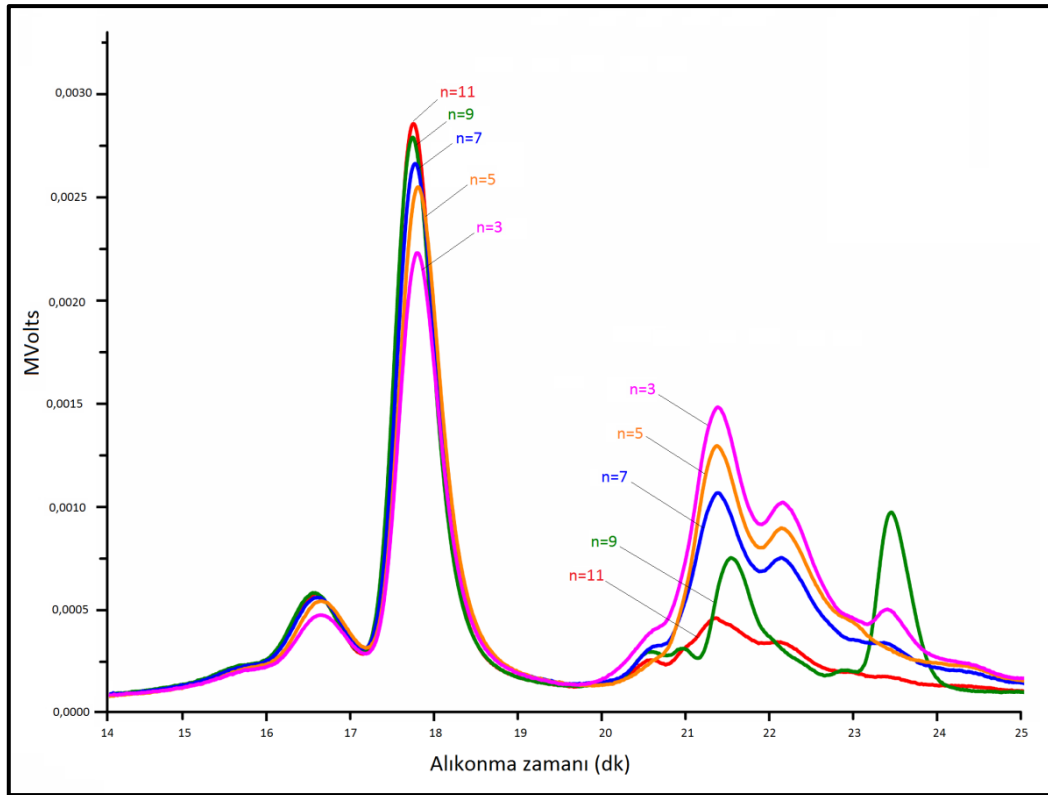
Sentezlenen bütün A β (1-15)-BSA konjugatları, konjugasyon mekanizmasında yan ürün olarak açığa çıkan üre türevi veya reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri) saflaştırıldıktan sonra, PES filtrelerden süzülerek viallere enjekte edilmiştir. Böylece bütün numuneler cihazlara verilmeye hazır hale getirilmişlerdir. Elde edilen bütün konjugatların yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik ve florimetrik yöntemlerle incelenmiştir.



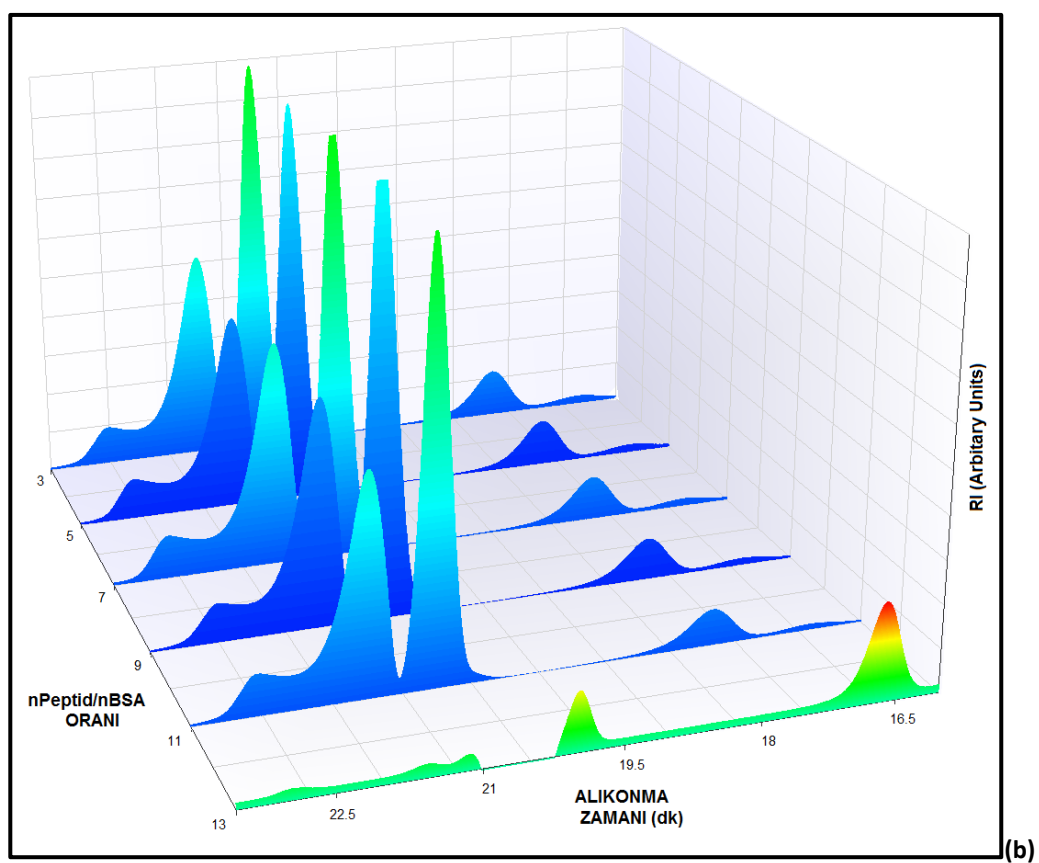
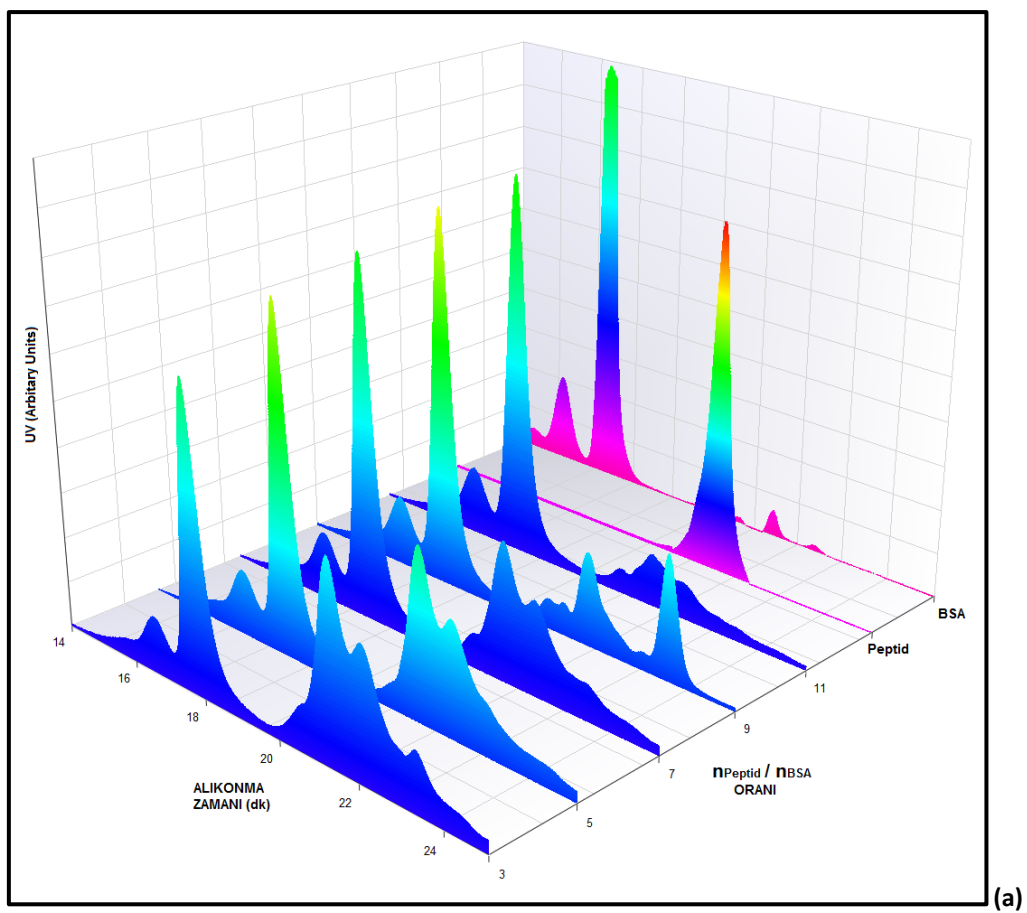
Şekil 4.48 A β (1-15) peptidinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatının serbest peptid ve BSA ile kıyaslamalı HPLC kromatogramı

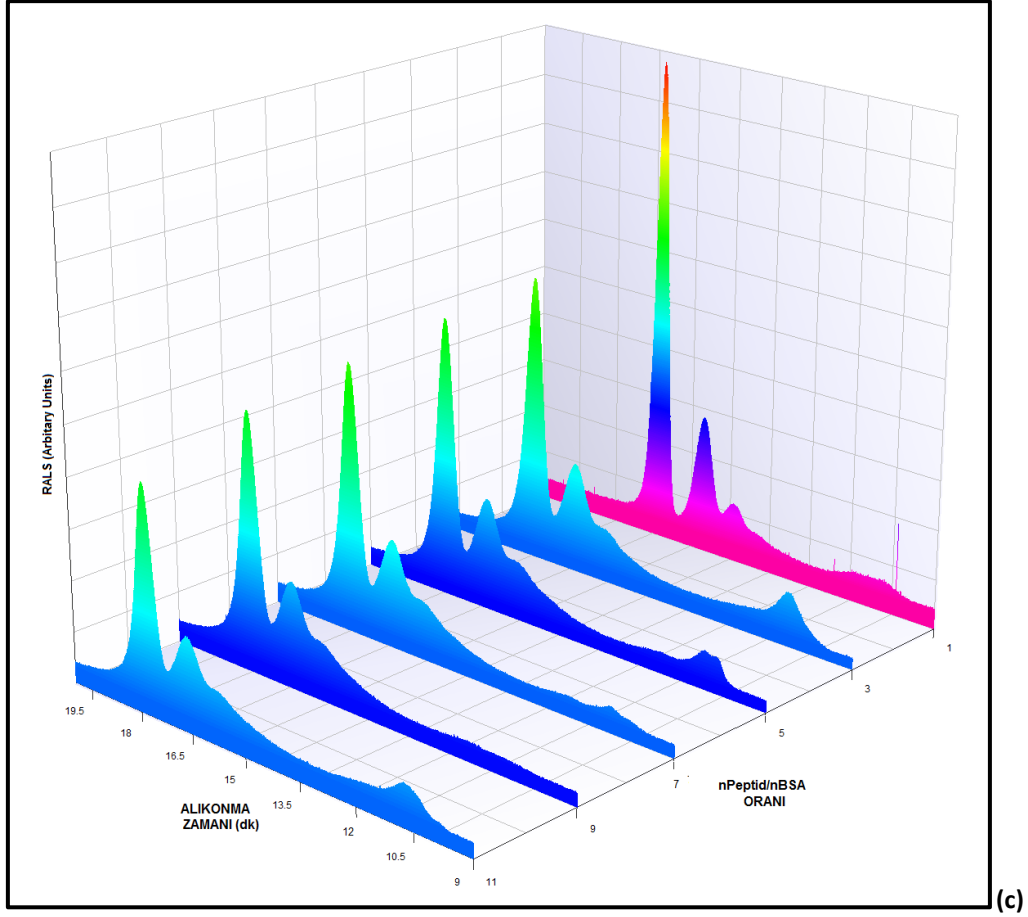


Şekil 4.49 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Serbest peptid (■) (λ_{max} =348nm): nPeptid/nBSA= 3(■) (λ_{max} =324nm): 5(■) (λ_{max} =348nm): 7(■) (λ_{max} =348nm): 9 (■) (λ_{max} =348nm): 11 (■) (λ_{max} =348nm)



Şekil 4.50 Gösterilen yöntem uygulanarak, A β peptidinin (1-15) dizisinin BSA ile olan n=3, 5, 7, 9, 11 mol oranlarında sentezlenen konjugatlarına ait HPLC kromatogramı





Şekil 4.51 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugatlarının (a) UV detektörüne, (b) RI dedektörüne, (c) Işık saçılması (RALS)dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.9 Dekstran Aldehid (DA) Biyokonjugatlarının Sentezi

Sentezlenen Dekstranın aldehit (75000 Da) türevinde, aldehidin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondenzasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu, bir Schiff bazı olan Deptid-DA konjugatı elde edildi. Dekstran-aldehit türevi ile peptidin bütün biyokonjugatlarının sentezinde tampon çözelti olarak pH'ı 8 olan Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3) kullanılmıştır.

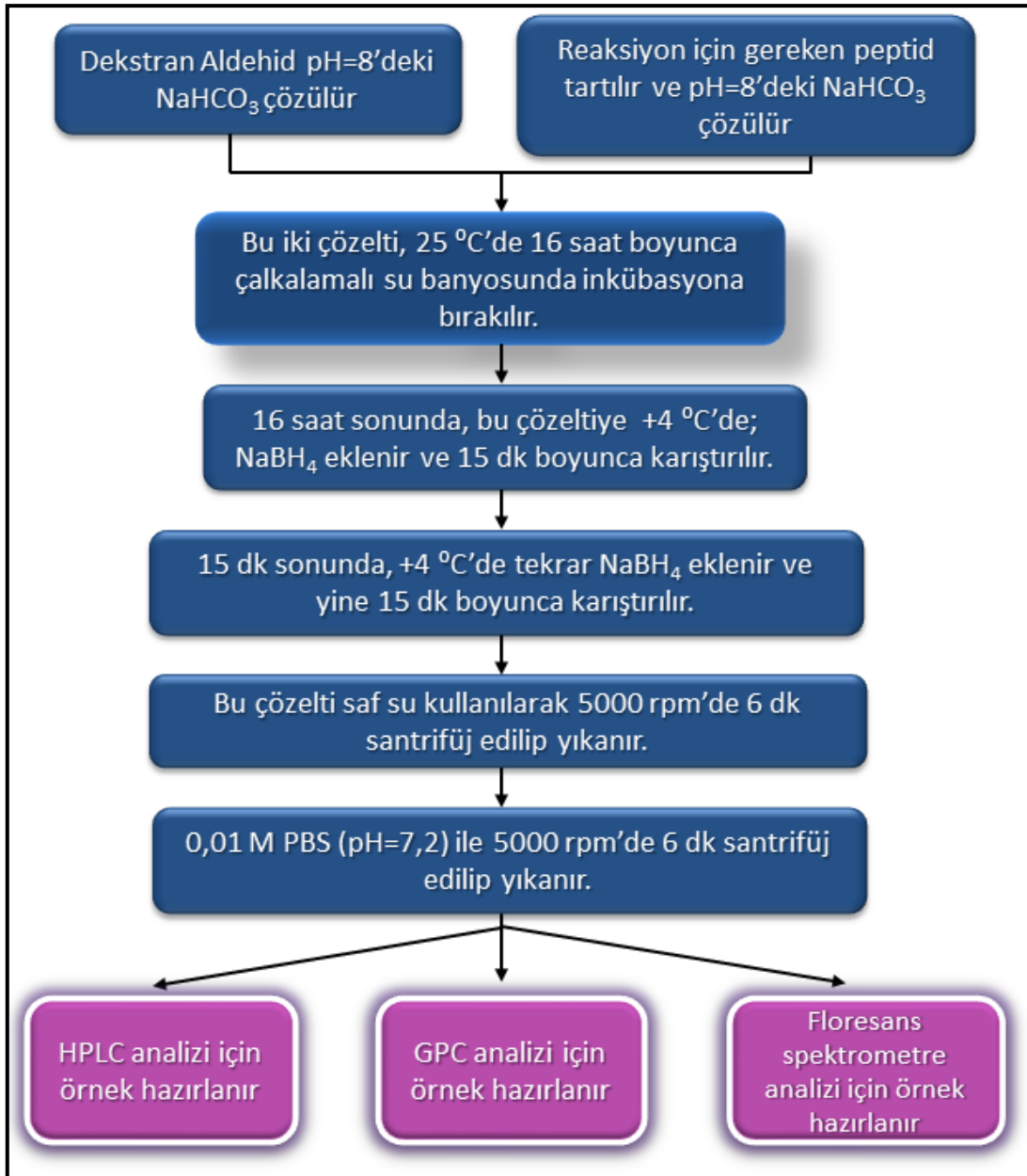
Çizelge 4.7 Farklı $n_{(1-15) \text{ Peptidi}}/n_{\text{DA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{(1-15) \text{ Peptidi}}/n_{\text{DA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan NaBH ₄ Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
3	0.272	10	5
5	0.453	10	5
7	0.635	10	5
9	0.816	10	5
11	0.997	10	5

Çizelge 4.8 Farklı $n_{(1-21) \text{ Peptidi}}/n_{\text{DA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

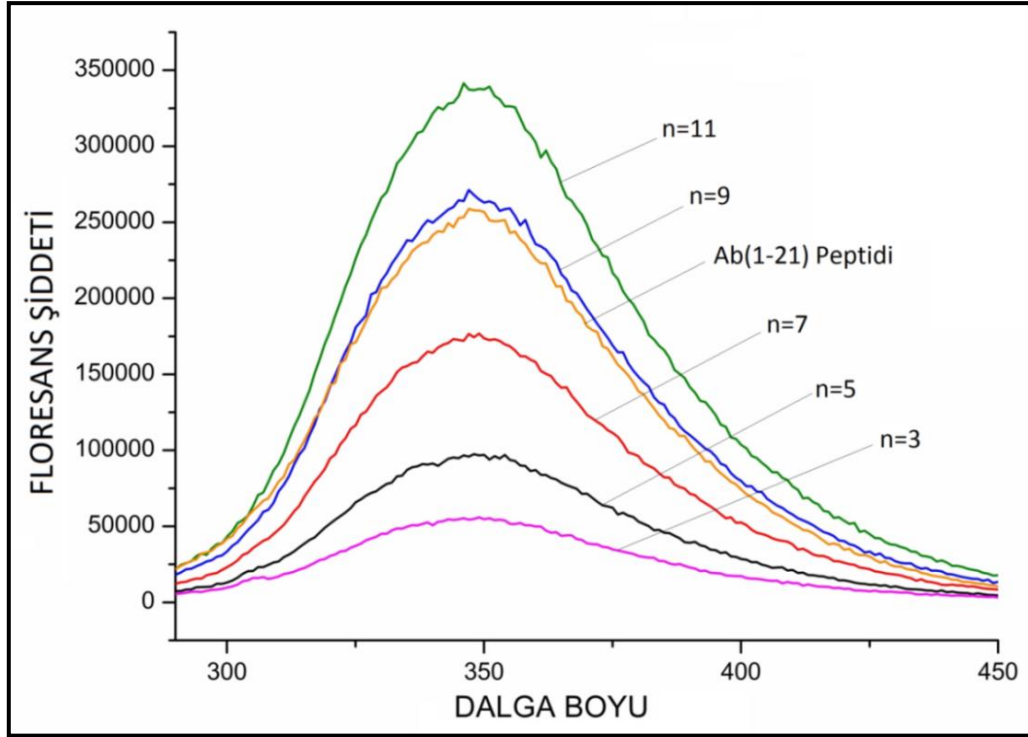
$n_{(1-21) \text{ Peptidi}}/n_{\text{DA}}$ Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan NaBH ₄ Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
3	0.201	10	5
5	0.335	10	5
7	0.469	10	5
9	0.603	10	5
11	0.737	10	5

Toplam 5 mL hacminde konjugasyon reaksiyonu yapıldı. Kapaklı penisilin şişelerinde, Peptid-DA (1mL peptid + 4mL DA) reaksiyonu 25 °C'da 16 saat bekletildi. Daha sonra, +4 °C'daki 100 mM, pH 8.5 olan NaHCO₃ çözeltisinden pH yükseltmek için 7 mL eklendi. Sonra, 5 mg (1 mg/mL) Sodyum Borhidrür (NaBH₄) aldehid gruplarını ve amino-aldehid bağlarını indirgemek için eklendi [170]. Bu çözelti 15 dk. +4 °C karıştırıldıktan sonra tekrar aynı miktarda NaBH₄ eklendi. Tekrar 15 dk. +4 °C karıştırıldı ve pH 7.0' a ayarlandı [167]. Reaksiyon içeriği konsantre edildi. İki kez destile su ve iki kez de fosfat tamponu ile ultrafiltrasyon cihazında yıkandı. Konsantre hale getirildi. Tüm konjugatlarda yaklaşık protein konsantrasyonu 0,08 mg/mL (A280/1,34) bulundu.

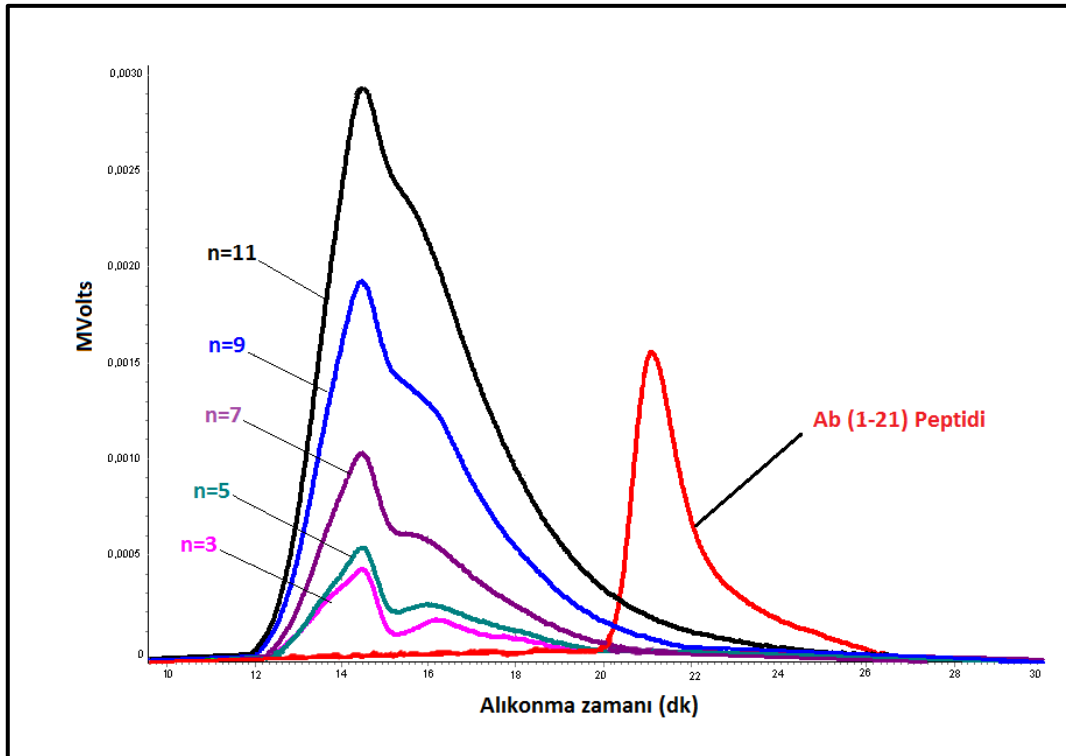


Şekil 4.53 Aβ Peptidi/Dekstran Aldehid konjugasyonunda takip edilen aşamaların akış şeması

Elde edilen bütün komplekslerin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik ve florimetrik yöntemlerle incelenmiştir.

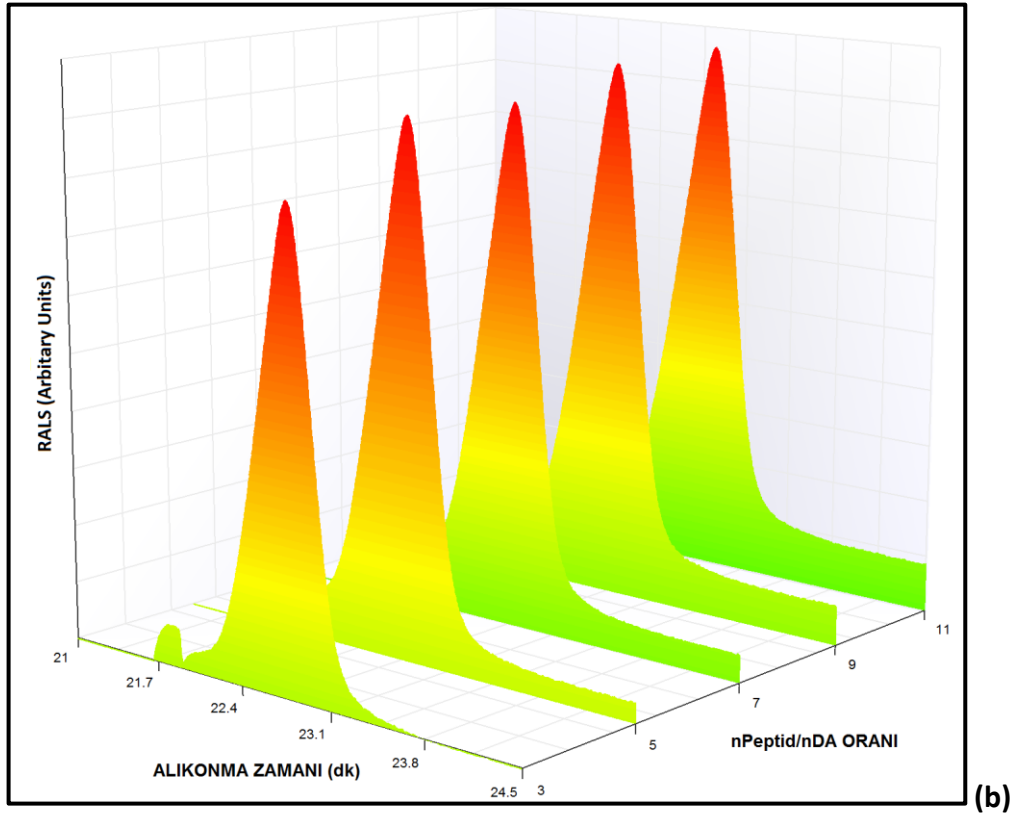
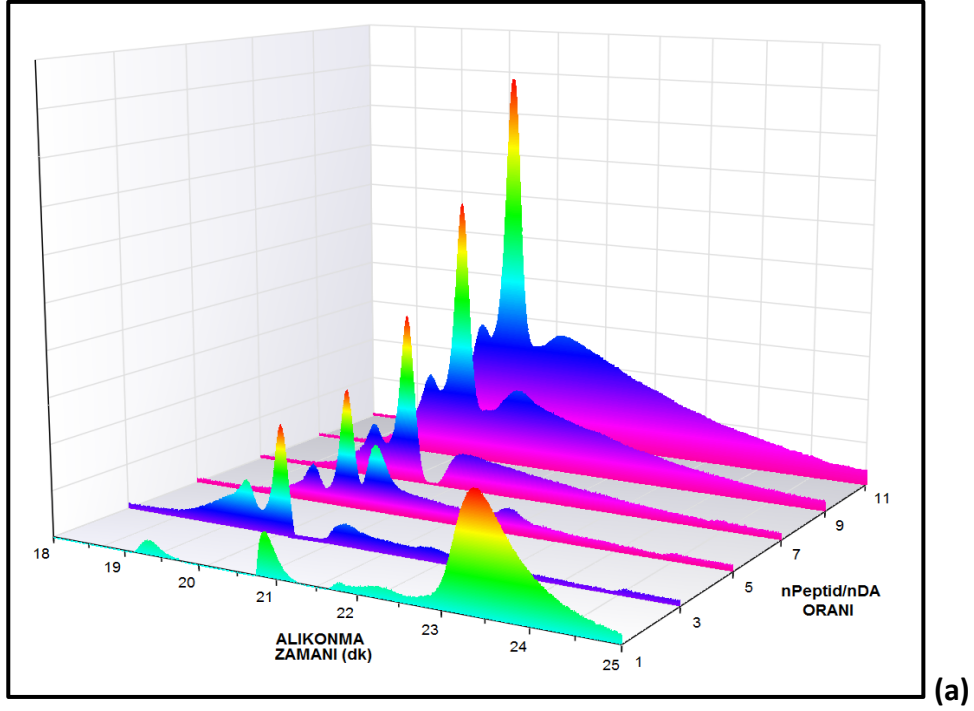


Şekil 4.54 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin DA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Serbest peptid (■) (λ_{max} =347nm): nPeptid/nDA= 3 (■) (λ_{max} =346nm): 5 (■) (λ_{max} =347nm): 7 (■) (λ_{max} =347nm): 9 (■) (λ_{max} =346nm): 11 (■) (λ_{max} =345nm)

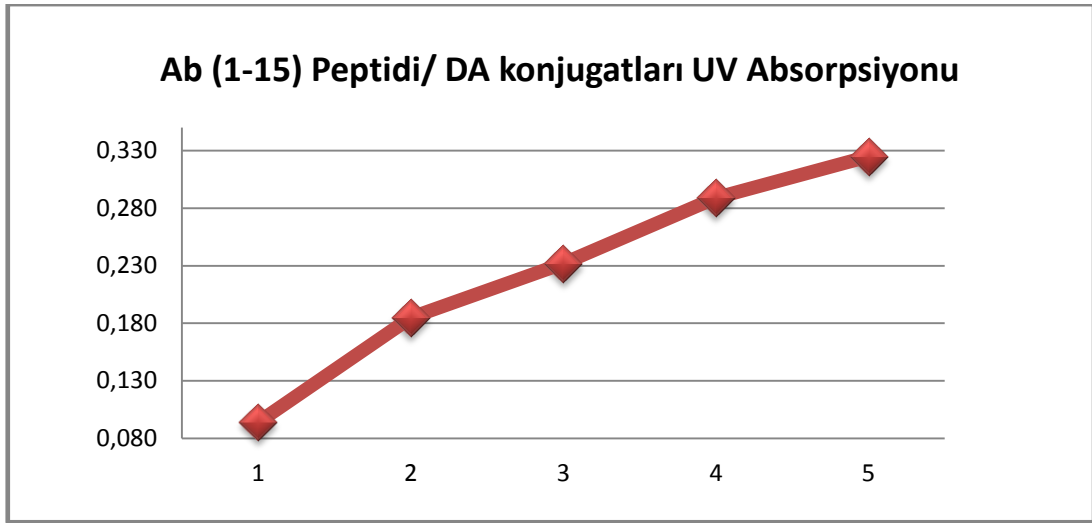


4.55 Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidinin Dekstran Aldehid ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği

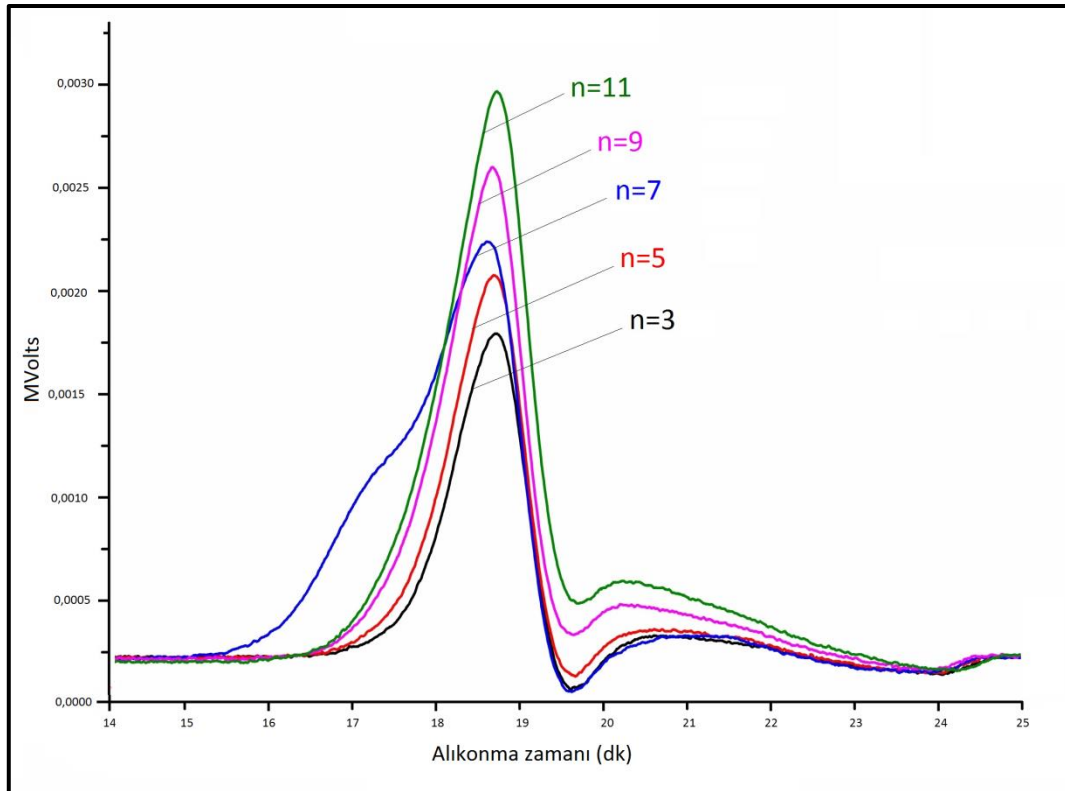
Şekil 4.35'te gösterilen yöntem uygulanarak, A β peptidinin (1-15) dizisinin DA ile olan konjugatları n=3, 5, 7, 9, 11 mol oranlarında aşağıdaki formül kullanılarak sentezlenmiştir.



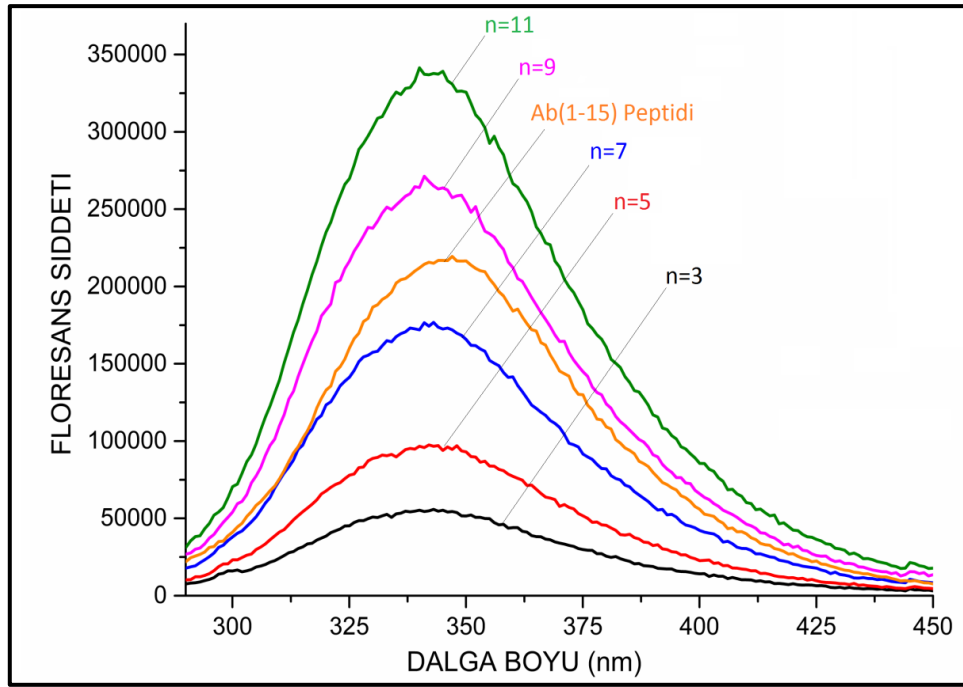
Şekil 4.56 Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları



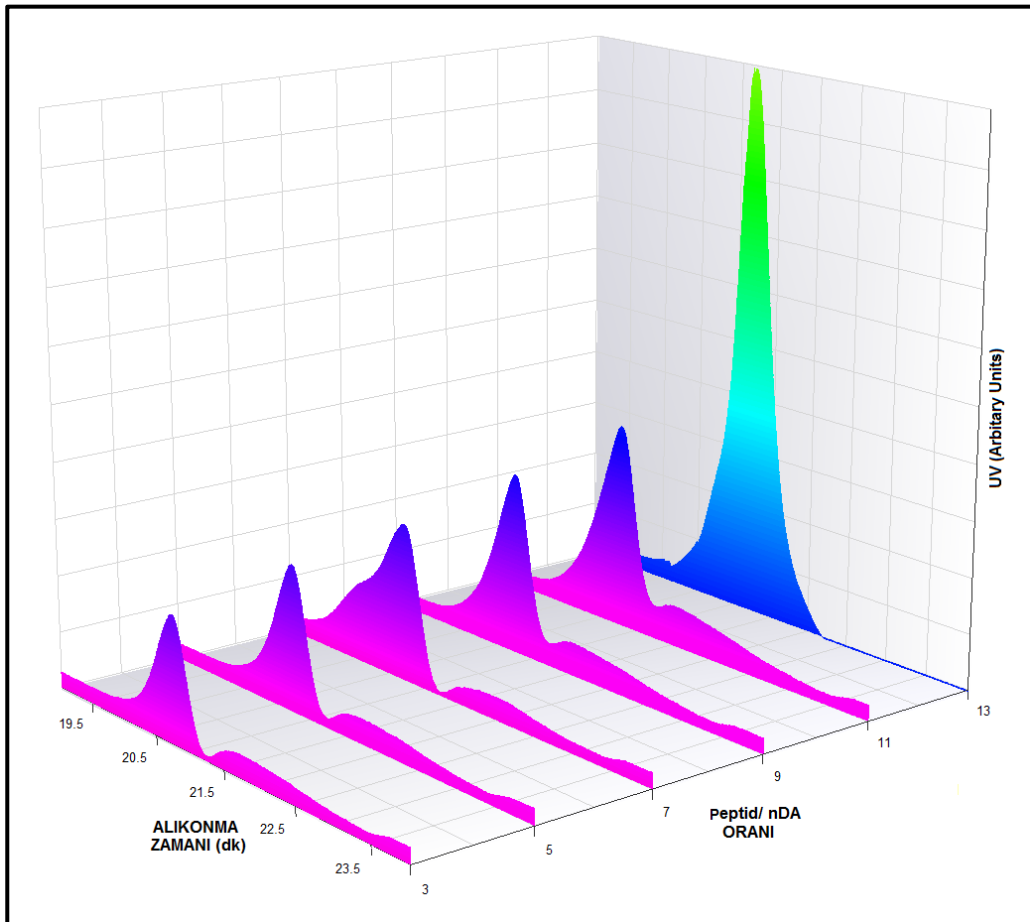
Şekil 4.57 A β (1-15) Peptidi/ DA konjugatları UV Absorpsiyonu



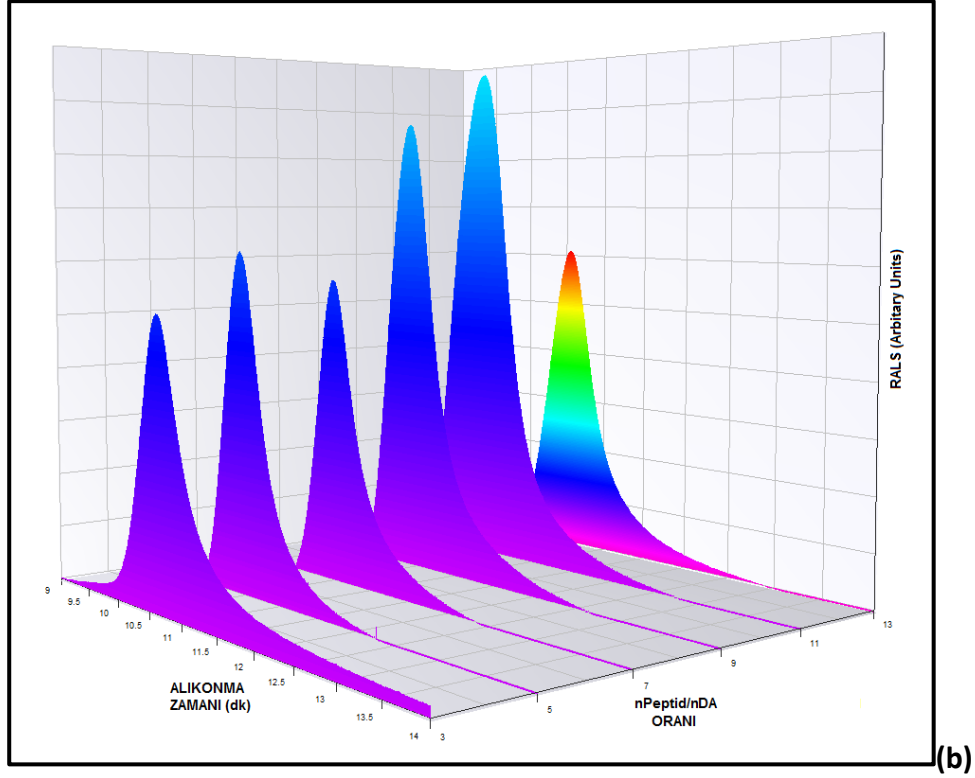
Şekil 4.58 Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-15) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği



Şekil 4.59 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin DA ile biyokonjugatlarının saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: Serbest peptid (■) (λ_{max} =348nm): nPeptid/nDA= 3 (■) (λ_{max} =341nm): 5 (■) (λ_{max} =342nm): 7 (■) (λ_{max} =340nm): 9 (■) (λ_{max} =341nm): 11 (■) (λ_{max} =340nm)



(a)



Şekil 4.60 Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-15) peptidinin Dekstran Aldehid (DA) ile biyokonjugatlarının (a) UV, (b) ışık saçılması dedektörlerine ait SEC kromatogramları

4.10 Kompleks Oluşumu Yöntemi

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Polimerik kompleksler karşıt yüklü moleküllerin sulu çözeltide coulombik kuvvetler, hidrojen bağları, yük transferi ve dipol kuvvetler veya hidrofobik etkileşimlerle etkileşmesi sonucu oluşurlar [171],[172]. Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir [173].

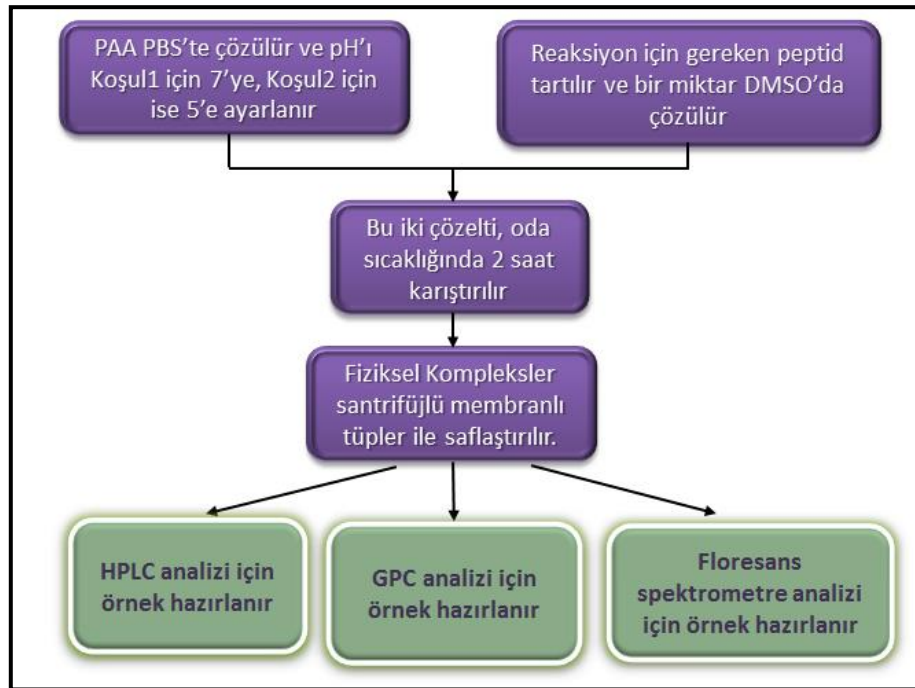
4.10.1 Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid Dizilerinin PAA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

PAA ile Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid dizlerinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları ve farklı oranlar kullanılarak çok sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. Bütün fiziksel kompleksler, sulu ortamda ve konjugasyon

reaksiyonlarında bahsedildiği gibi sabit 0.5 mg/mL PAA konsantrasyonunda yapılmıştır. Sentezler yapılırken hem PAA hem de peptid ara stok çözeltileri hazırlanmış, böylelikle her bir reaksiyonun eşit koşullarda olması sağlanmıştır. Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid dizlerinin PAA ile aşağıda anlatılan her iki koşulda da fiziksel kompleksleri ayrı ayrı sentezlenmiştir.

4.10.2 Farklı koşullarda sentezlenen PAA Fiziksel Kompleksleri

Aşağıda fiziksel komplekslerin sentezlendiği koşulların mekanizması ile ilgili akış şeması yer almaktadır.



Şekil 4.61 Aβ (1-21) ve (1-15) Peptid dizlerinin PAA ile komplekslerinin sentezinde takip edilen aşamaların akış şeması

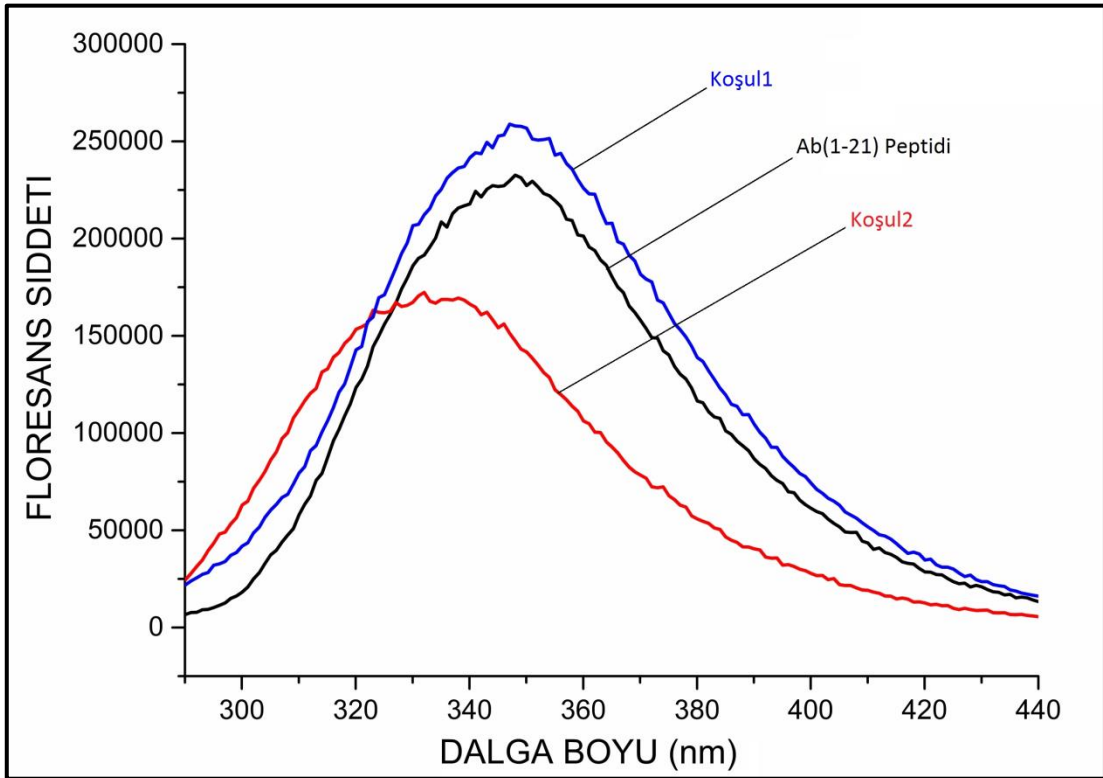
- **Koşul1**

1 ayrı penisilin şişesinin her birine, 2.5 mg PAA içeren 21,5 µL PAA ara stok çözeltisi eklendi, pH=7 olan PBS tamponunda çözüldü ve 1 M NaOH ile pH'sı 7'ye ayarlandı. Üzerine Amiloid Beta (1-15) ile yapılan reaksiyon için 0.252 mg peptid içeren 252 µL peptid, Amiloid Beta (1-21) ile yapılan reaksiyon içinse, 0.339 mg peptid içeren 339 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/polimer kompleks oluşumu için 2 saat

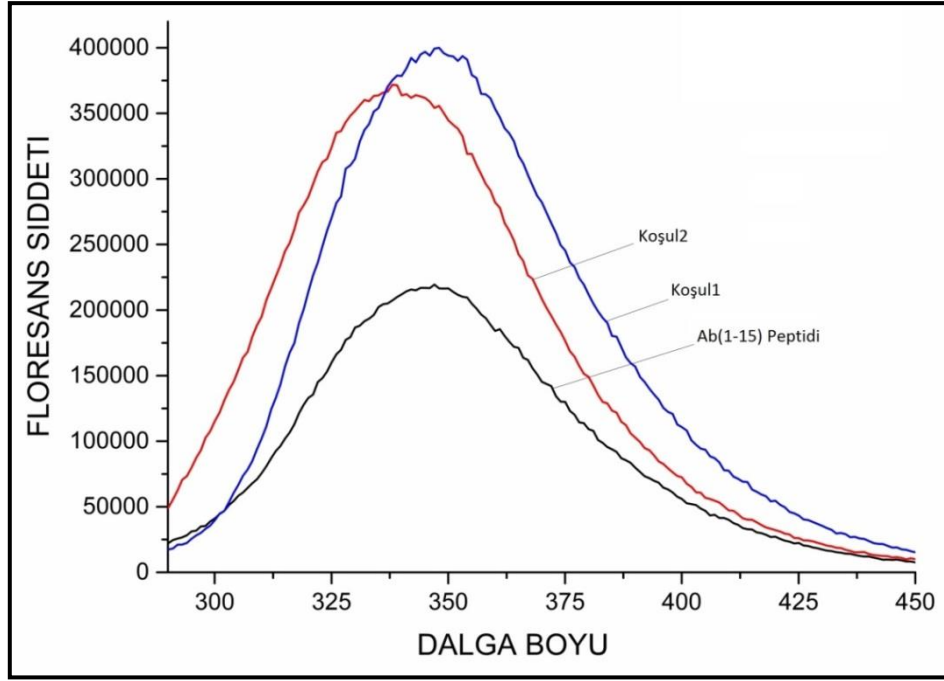
oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı.

- **Koşul2**

2 ayrı penisilin şişesinin her birine, 2.5 mg PAA içeren 21,5 µL PAA ara stok çözeltisi eklendi, pH=5 olan PBS tamponunda çözüldü ve **pH'sı 5'e** ayarlandı. . Üzerine Amiloid Beta (1-15) ile yapılan reaksiyon için 0.252 mg peptid içeren 252 µL peptid, Amiloid Beta (1-21) ile yapılan reaksiyon içinse, 0.339 mg peptid içeren 339 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/polimer kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı.



Şekil 4.62 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: (■) Tek başına peptid, Koşul1 (■) Koşul2 (■)'ye göre sentezlenen konjugatlar



Şekil 4.63 EDC konjugasyon yöntemine göre farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen Aβ (1-15) peptidinin PAA ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: (■) Tek başına peptid, Koşul1 (■) Koşul2 (■)'ye göre sentezlenen konjugatlar

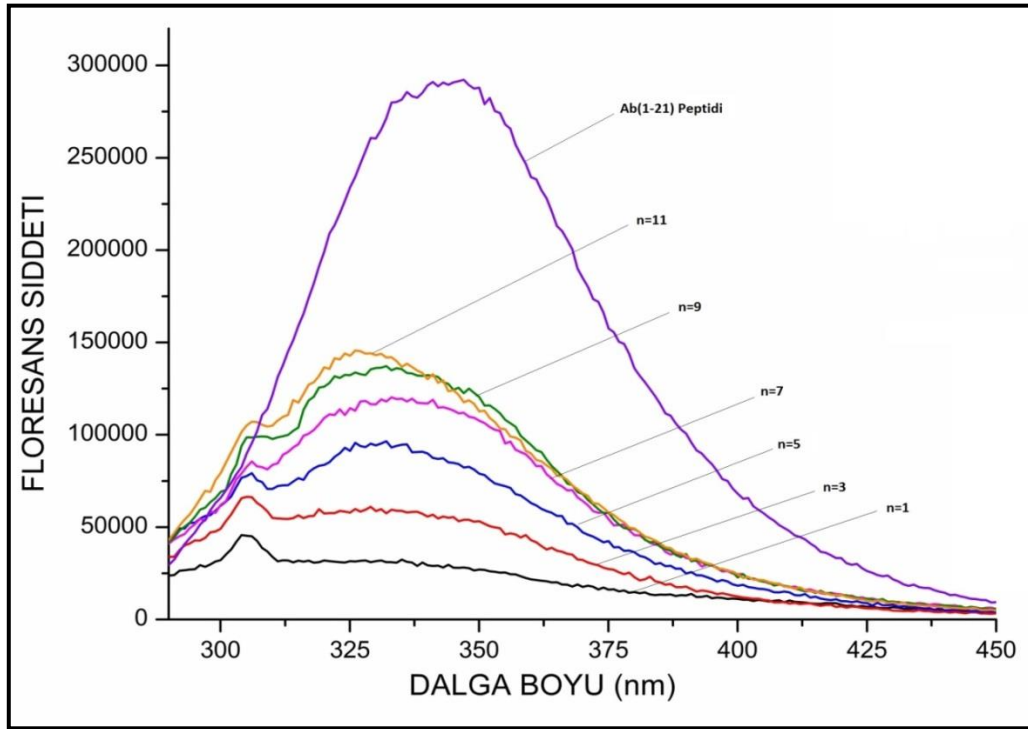
4.10.3 Farklı oranlarda sentezlenen PAA Fiziksel Kompleksleri

Aβ(1-15)-PAA ve Aβ(1-21)-PAA'in farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki fiziksel kompleksleri, Koşul 2'de olduğu gibi yapılmıştır. Aşağıda sentez için gereken peptid miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

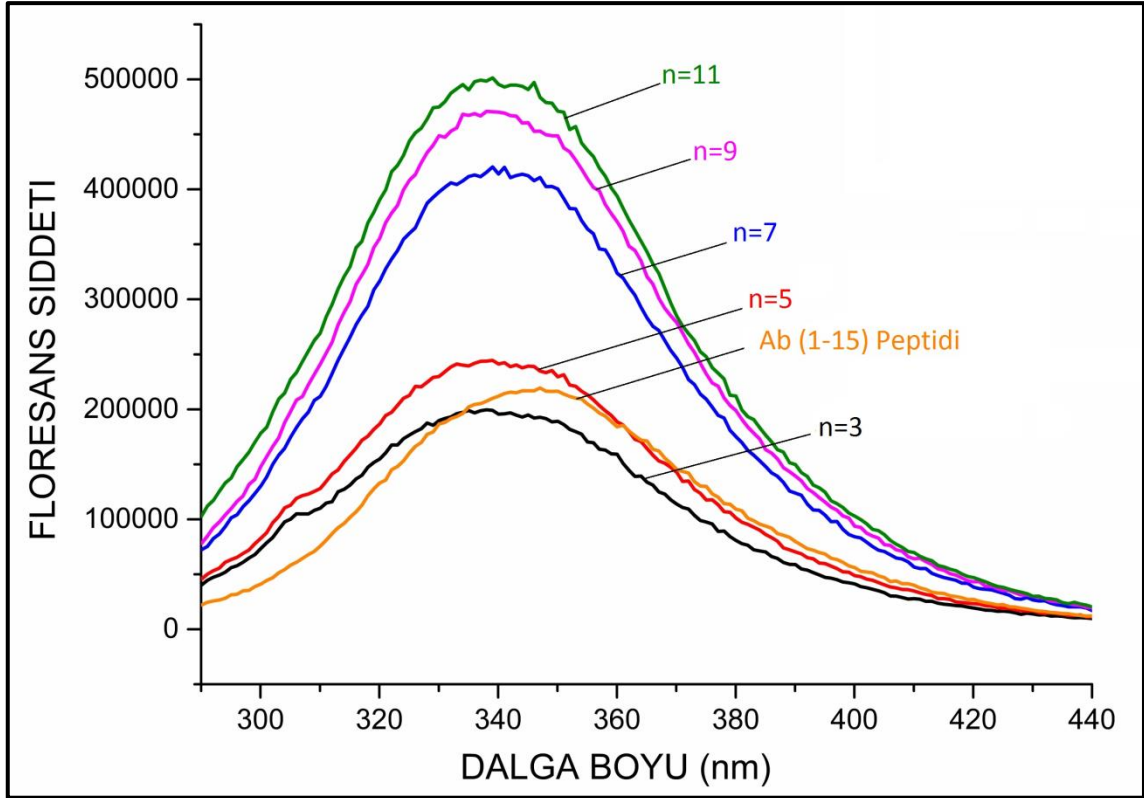
Çizelge 4.9 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Fiziksel Komplekste Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ Oranı	Kullanılan Aβ(1-15) Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan Aβ(1-21) Peptid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.050	0.068	5
3	0.151	0.204	5
5	0.252	0.339	5
7	0.352	0.476	5
9	0.453	0.612	5
11	0.556	0.748	5

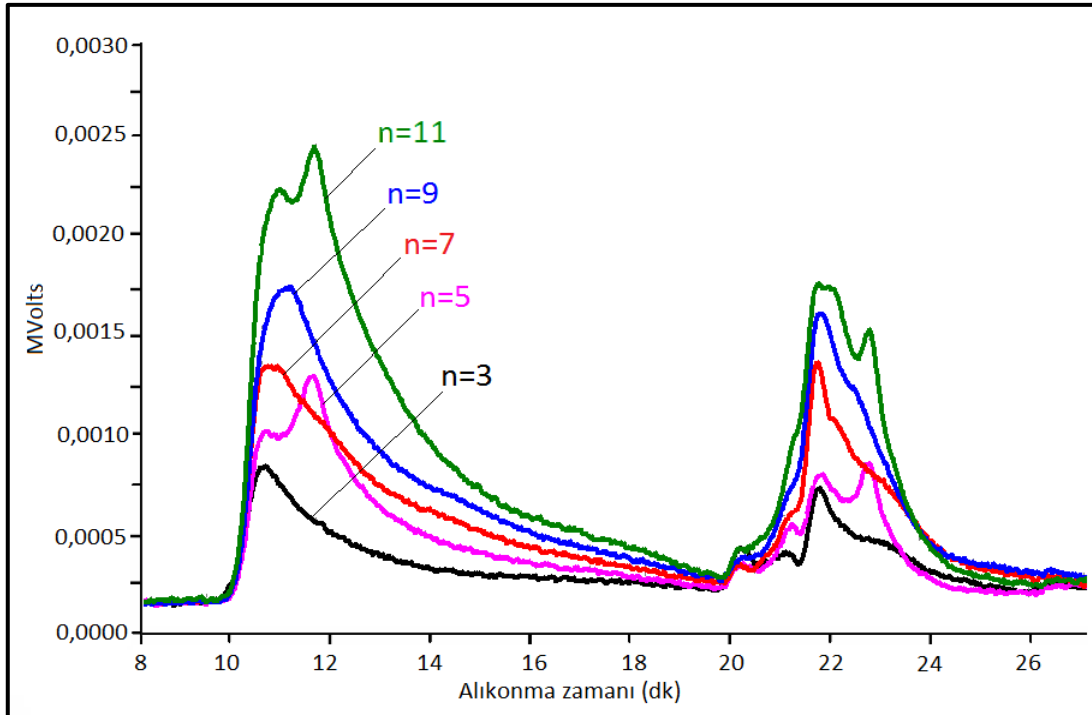
12 ayrı penisilin şişesinin her birine, 2.5 mg PAA içeren 21,5 µL PAA ara stok çözeltisi eklendi, pH=5 olan PBS tamponunda çözüldü ve **pH'sı 5'e** ayarlandı. Bu PAA çözeltilerinin üzerine sentezlenecek orana bağlı olarak gerekli peptid miktarları eklendi ve peptid/polimer kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı. Elde edilen bütün komplekslerin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik ve florimetrik yöntemlerle incelenmiştir.



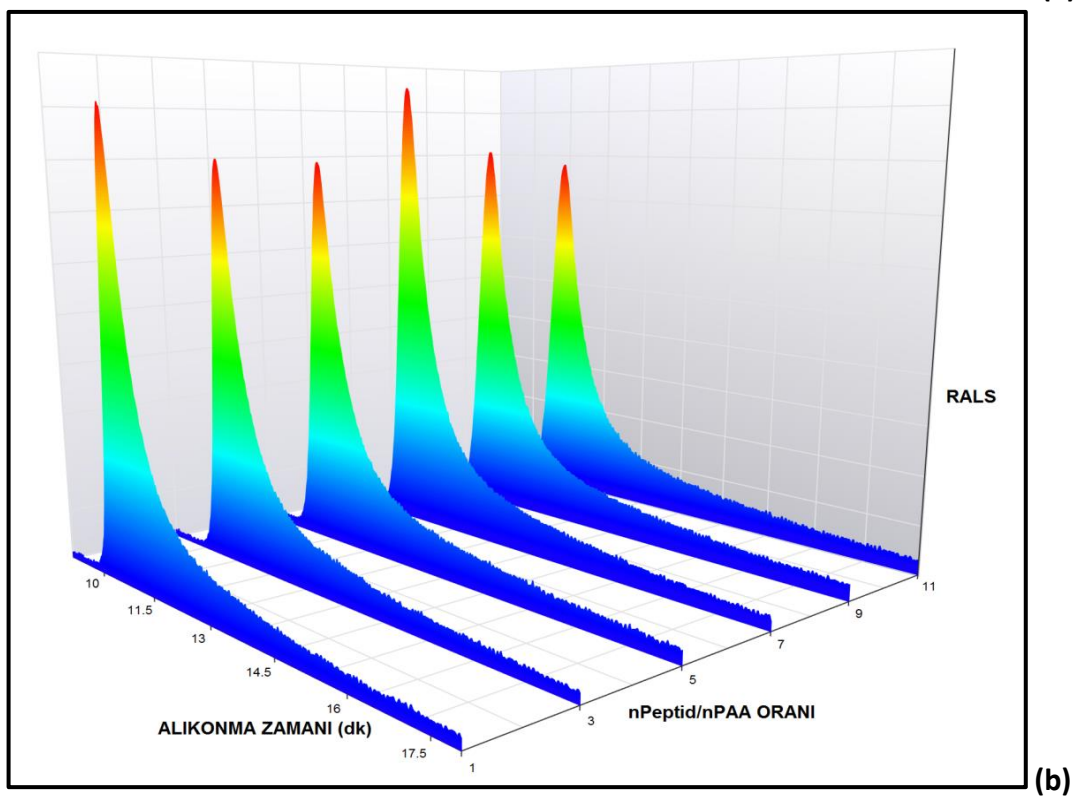
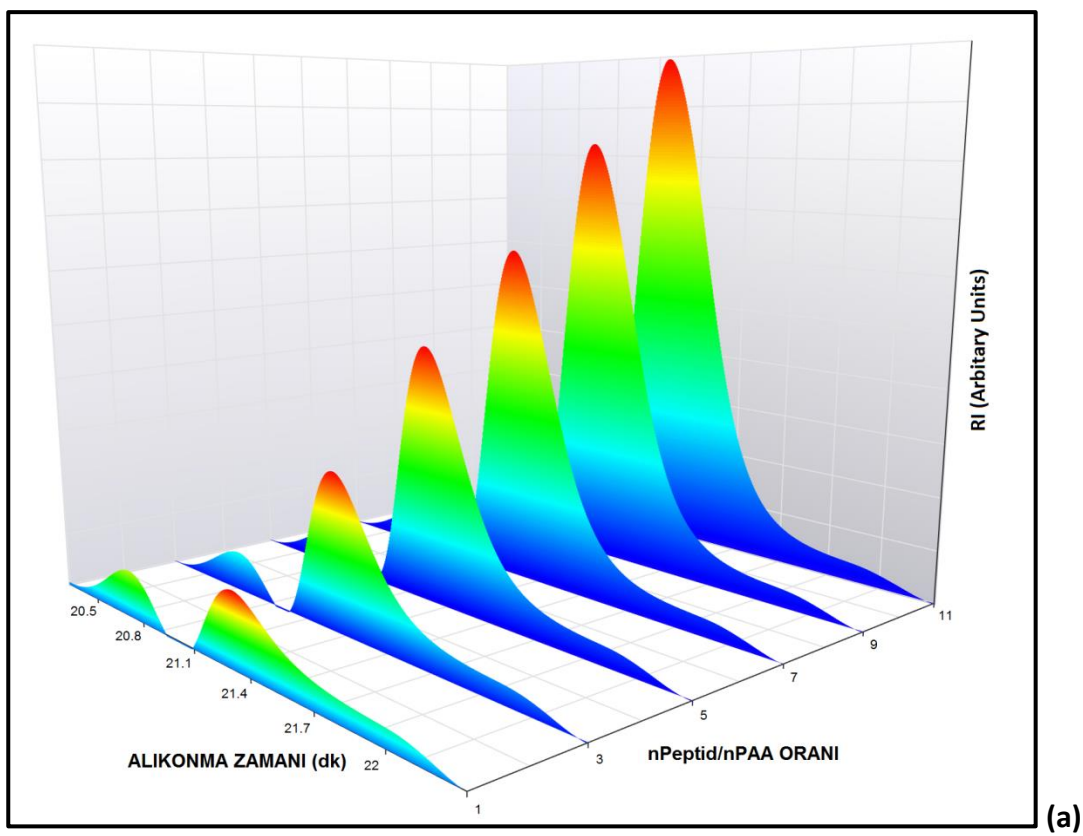
Şekil 4.64 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin PAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: nPeptid/nPAA=1 (■) ($\lambda_{max}=328nm$), 3(■) ($\lambda_{max}=328nm$), 5(■) ($\lambda_{max}=329nm$), 7(■) ($\lambda_{max}=327nm$), 9 (■) ($\lambda_{max}=327nm$), 11(■)($\lambda_{max}=325nm$) ve (■) Serbest peptid ($\lambda_{max}=347nm$)

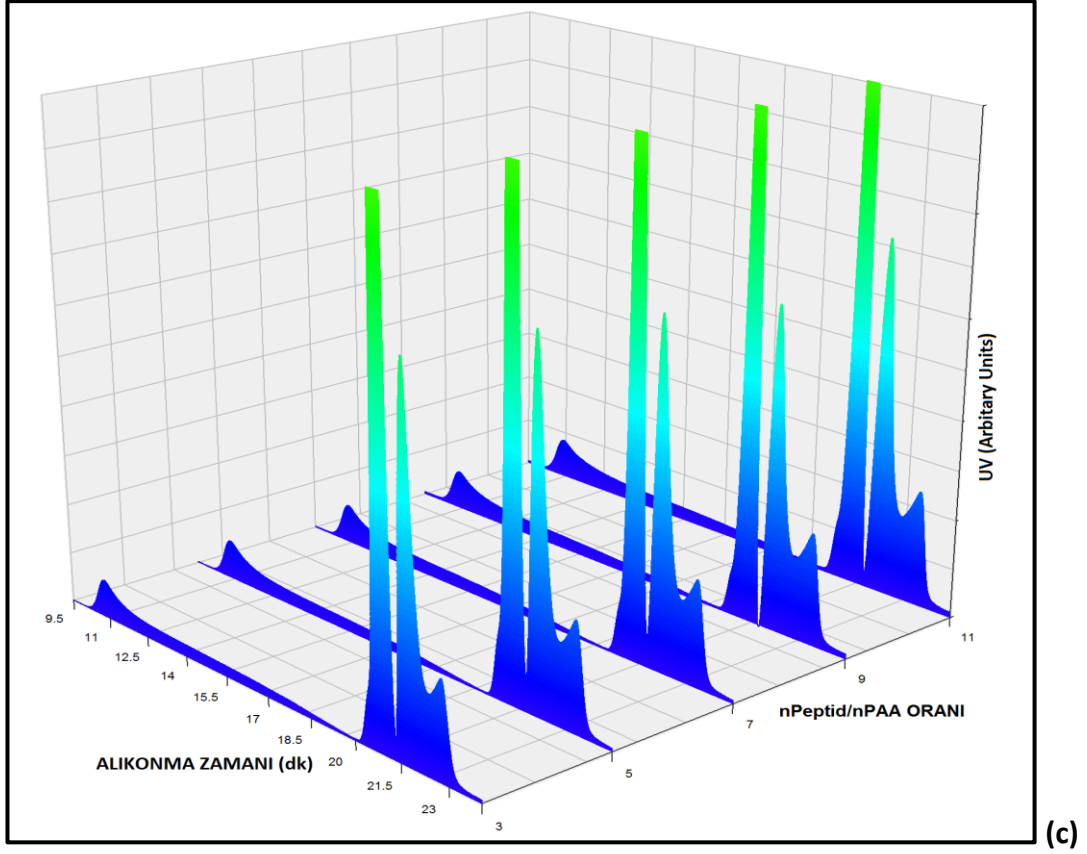


Şekil 4.65 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: nPeptid/nPAA=3(■) (λ_{max} =338nm), 5(■) (λ_{max} =338nm), 7(■) (λ_{max} =339nm), 9(■) (λ_{max} =339nm), 11 (■) (λ_{max} =339nm), Serbest peptid (■) (λ_{max} =348nm)



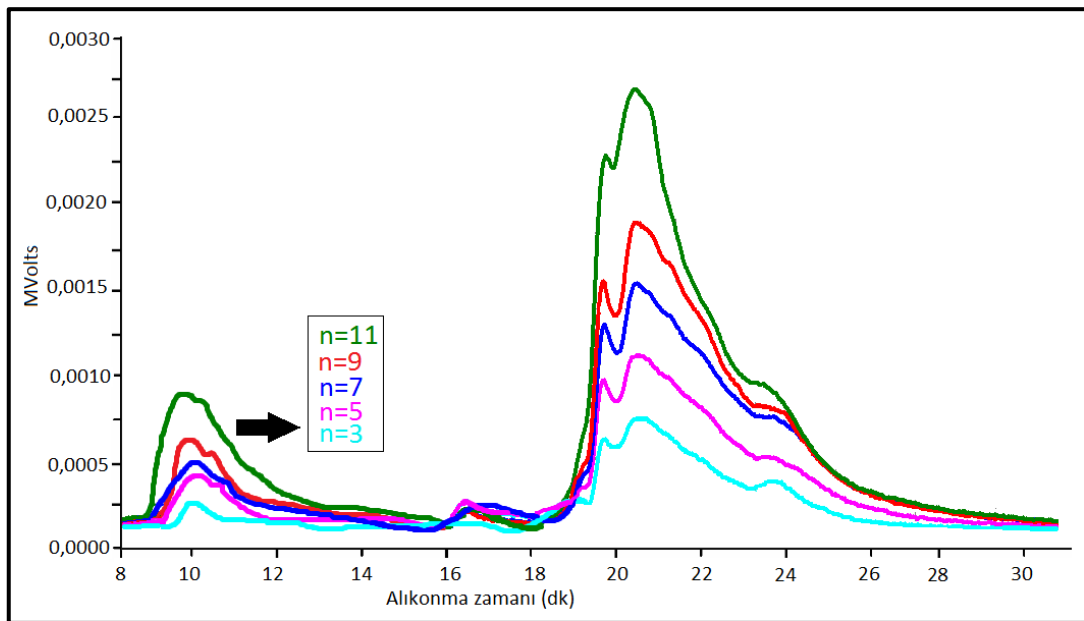
Şekil 4.66 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile Komplekslerinin kıyaslamalı HPLC kromatogramları



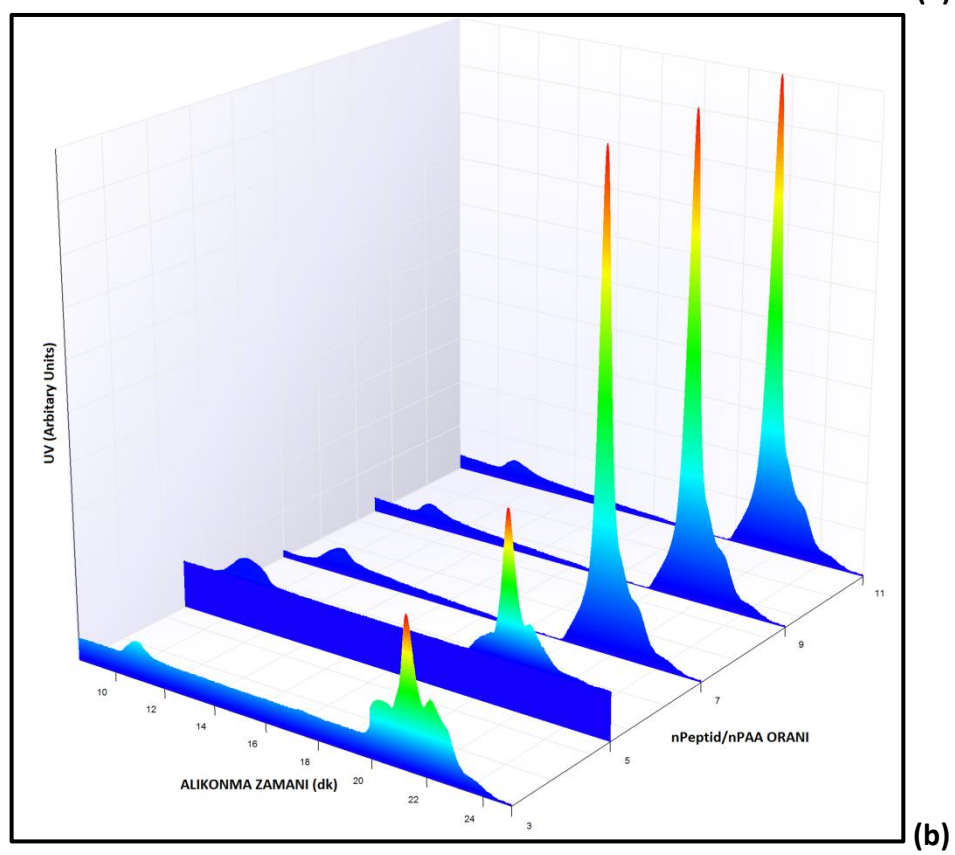
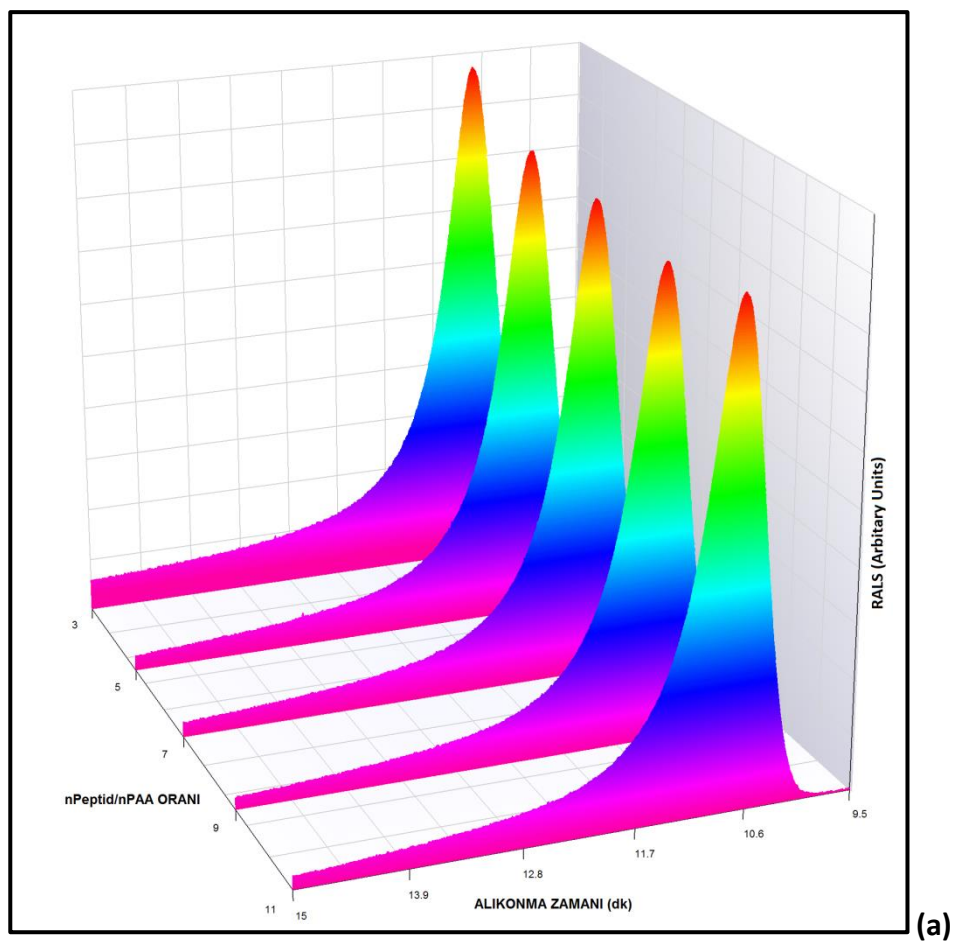


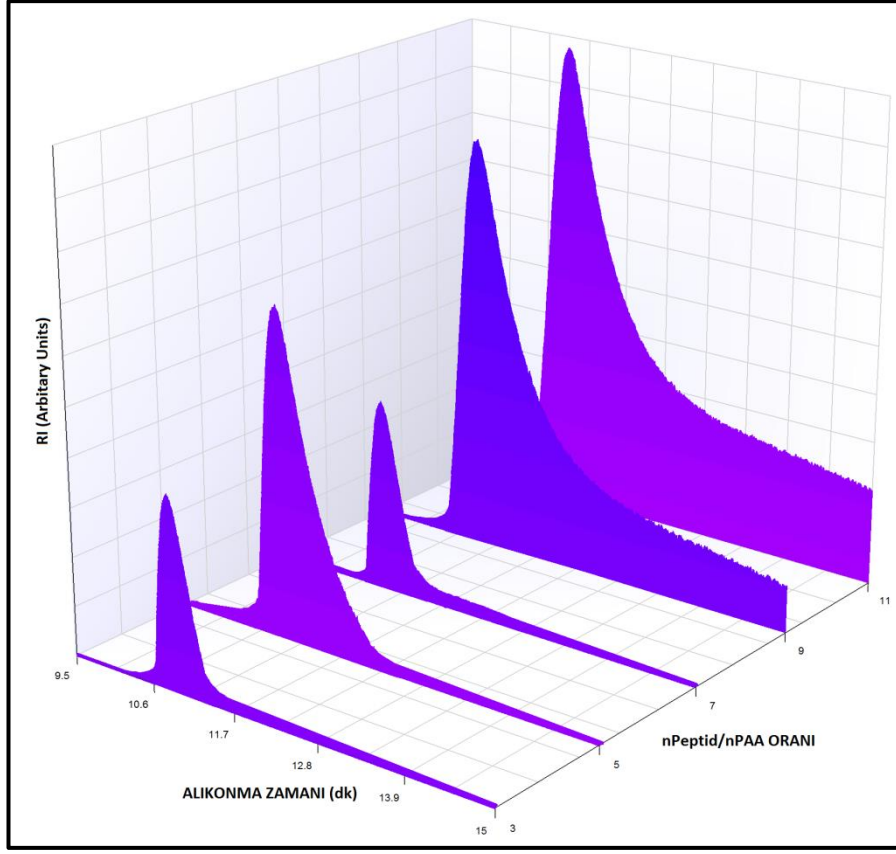
Şekil 4.67 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile komplekslerinin (a) RI dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (c) UV dedektörüne ait SEC kromatogramları

A β (1-15) peptidinin PAA ile Fiziksel Komplekslerine ait analiz sonuçları ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.68 A β (1-15) peptidinin PAA ile Komplekslerine ait analiz sonuçları





(c)

Şekil 4.69 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile fiziksel komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS) dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.10.4 Amiloid Beta (1-15) Peptid Dizisinin BSA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

BSA ile Amiloid Beta (1-15) Peptid dizisinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları ve farklı oranlar kullanılarak çok sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. Bütün fiziksel kompleksler, sulu ortamda ve konjugasyon reaksiyonlarında bahsedildiği gibi sabit 0.5 mg/mL BSA konsantrasyonunda yapılmıştır. Sentezler yapılırken hem PAA hem de peptid ara stok çözeltileri hazırlanmış, böylelikle her bir reaksiyonun eşit koşullarda olması sağlanmıştır.

4.10.4.1 Farklı Koşullarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler

BSA ile Amiloid Beta (1-15) Peptid dizisinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları ve farklı oranlar kullanılarak çok sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. Bütün fiziksel kompleksler, sulu ortamda ve konjugasyon reaksiyonlarında bahsedildiği gibi sabit 0.5 mg/mL BSA konsantrasyonunda yapılmıştır.

Sentezler yapılırken hem PAA hem de peptid ara stok çözeltileri hazırlanmış, böylelikle her bir reaksiyonun eşit koşullarda olması sağlanmıştır.

- **Koşul1**

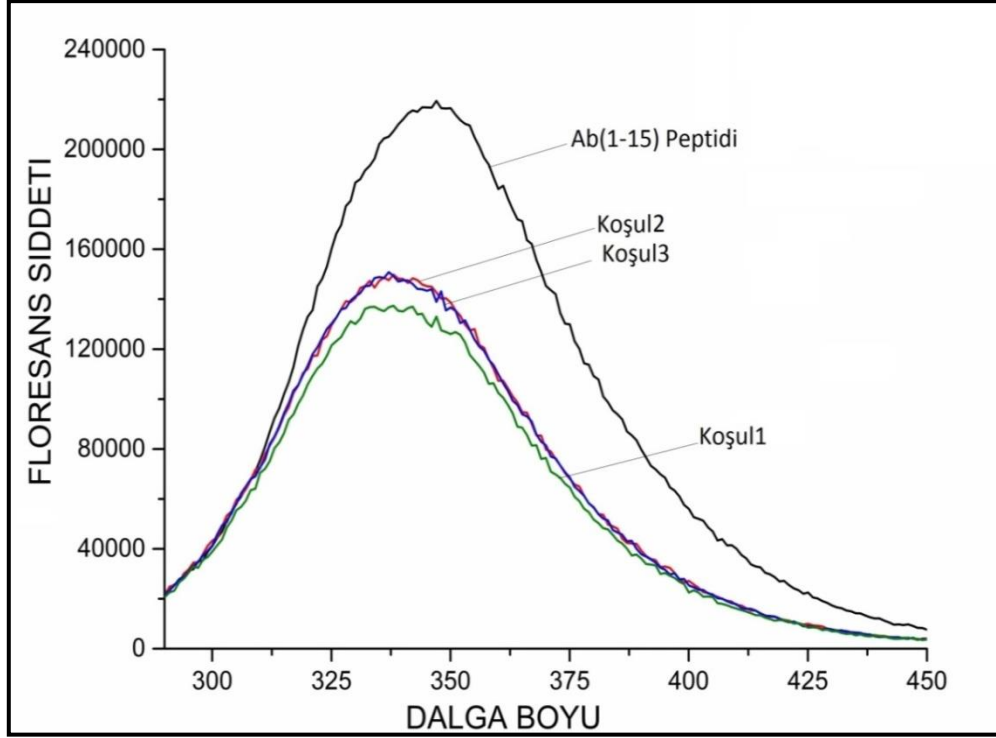
1 penisilin şişesine, 2.5 mg BSA içeren 2,5 mL BSA ara stok çözeltisi eklendi, pH=5 olan PBS tamponunda çözüldü ve **pH'sı 5'e** ayarlandı. Üzerine 0.381 mg peptid içeren 381 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/BSA kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı.

- **Koşul2**

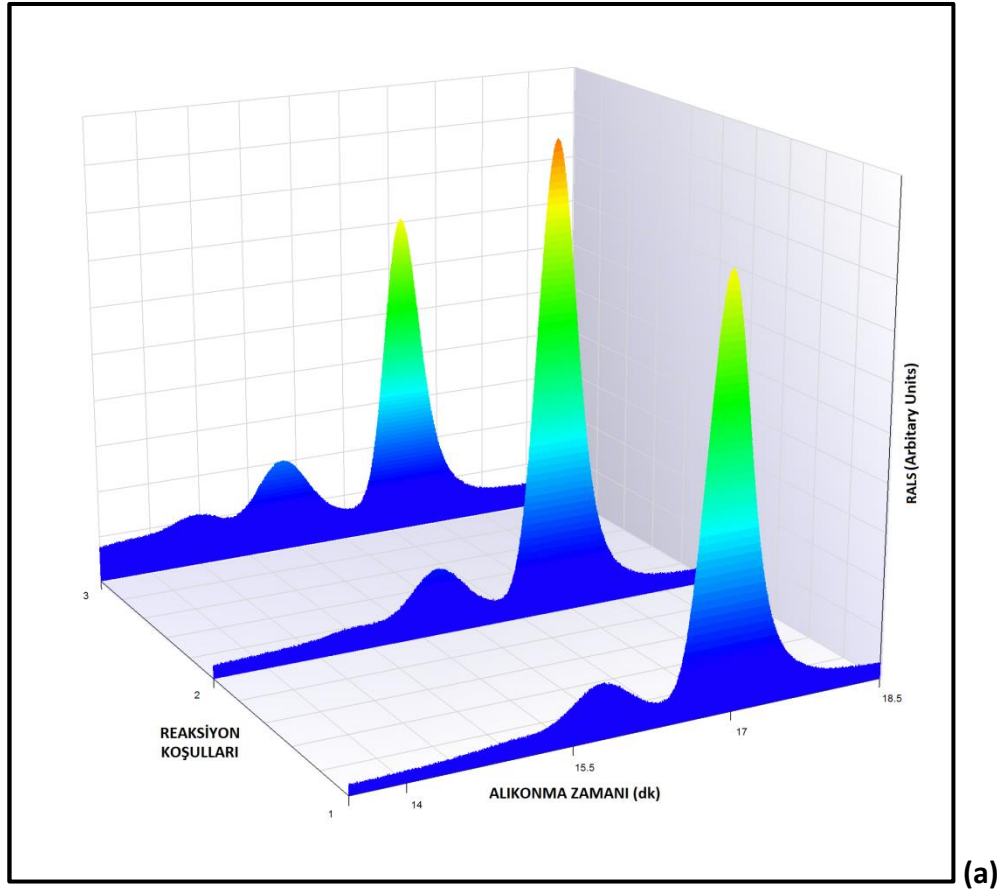
1 penisilin şişesine, 2.5 mg BSA içeren 2,5 mL BSA ara stok çözeltisi eklendi, pH=5 olan PBS tamponunda çözüldü ve **pH'sı 7'ye** ayarlandı. . Üzerine 0.381 mg peptid içeren 381 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/BSA kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı.

- **Koşul3**

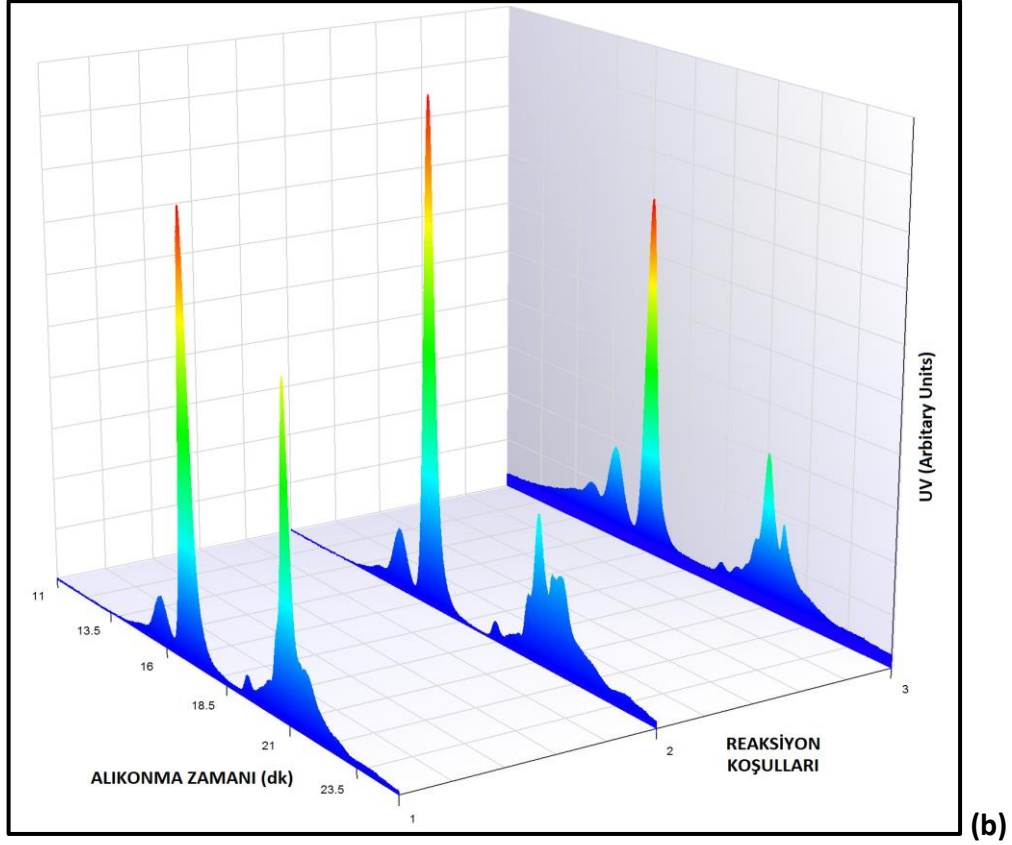
1 penisilin şişesine, 2.5 mg BSA içeren 2,5 mL BSA ara stok çözeltisi eklendi, pH=5 olan PBS tamponunda çözüldü ve **pH'sı 6'ya** ayarlandı. . Üzerine 0.381 mg peptid içeren 381 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/BSA kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda komplekslerden analiz için örnekler hazırlandı. Elde edilen bütün komplekslerin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik ve florimetrik yöntemlerle incelenmiştir.



Şekil 4.70 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-15) peptidi-BSA komplekslerinin floresans grafiği. (■) Tek başına peptid (λ_{max} :348 nm) ve (■) Koşul1 (λ_{max} :334 nm), (■)Koşul2 (λ_{max} :338 nm), (■) Koşul3 (λ_{max} :337 nm)'e göre sentezlenen kompleksler



(a)



Şekil 4.71 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile komplekslerinin (a) ışık saçılması (RALS)dedektörüne, (b) UV detektörüne ait SEC kromatogramları

4.10.4.2 Farklı Oranlarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler

BSA-A β (1-15) peptidinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, en iyi kompleks oluşumu gözlenen Koşul1'e göre yapılmıştır. Bu komplekslerin sentezi sırasında bir BSA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde kompleks sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir kompleks için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün kompleks oluşum reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 0.972 mg'dır. 1 mg peptid tartılıp, 1 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

BSA stok çözeltisinin hazırlanışı:

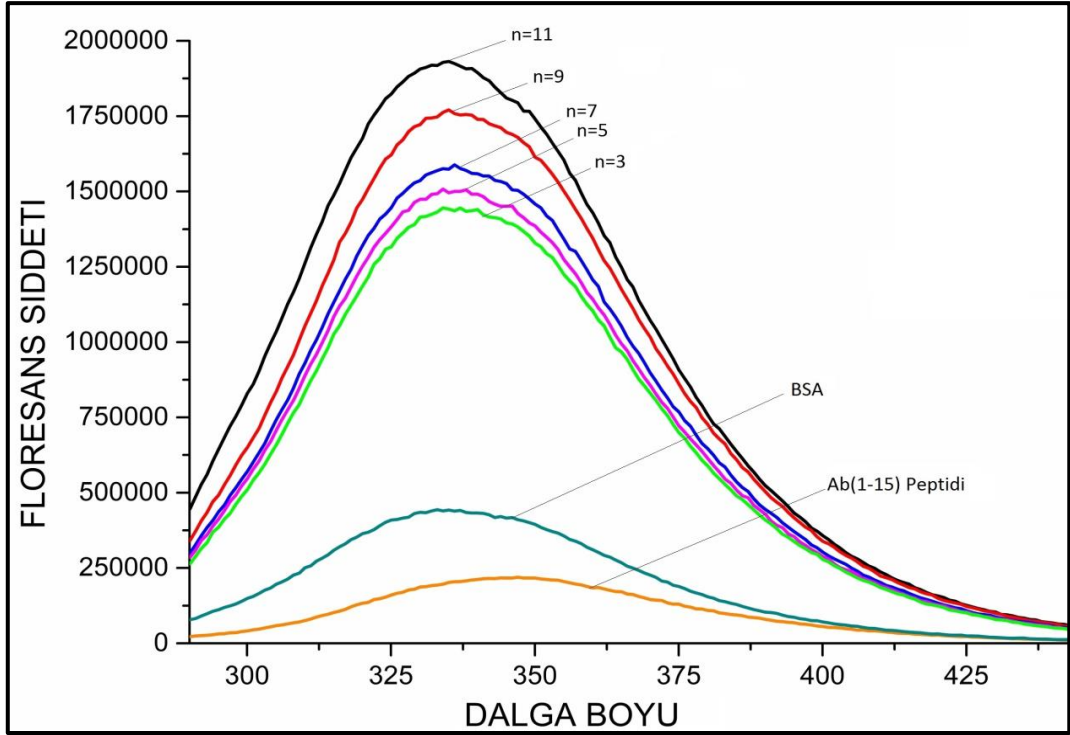
5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, $V_T = 5\text{ mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından her bir konjugat için Denklem1'e göre hesaplanan reaktif miktarları aşağıdaki tabloda

verilmiştir. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 12.5 mg'dır. 12.5 mg katı BSA tartılıp, 12.5 mL saf suda çözülerek, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

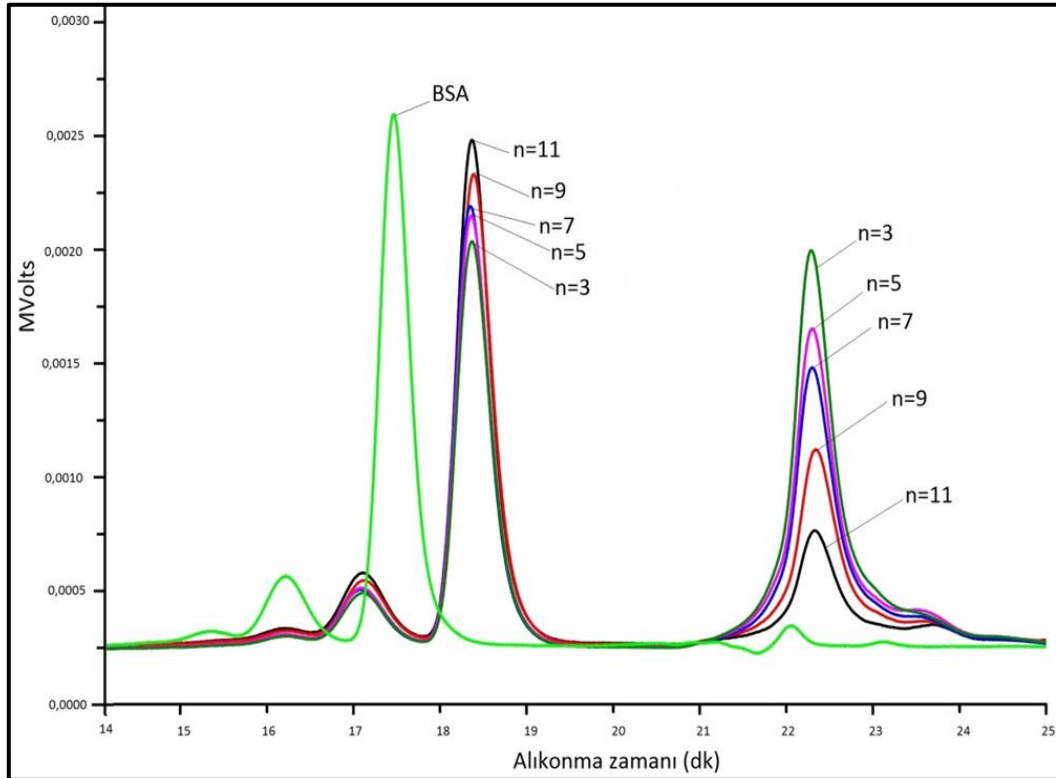
Çizelge 4.10 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ Oranlarında Sentezlenen Fiziksel Komplekslerde Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranı	C_{BSA} (mg/5mL)	BSA ara stok çözeltilisinden çekilecek miktar (mL)	C_{pep} (mg/5mL)	Peptid ara stok çözeltilisinden çekilen miktar (μL)
3	2.5	2.5	0.228	228
5	2.5	2.5	0.380	380
7	2.5	2.5	0.530	530
9	2.5	2.5	0.684	684
11	2.5	2.5	0.836	836

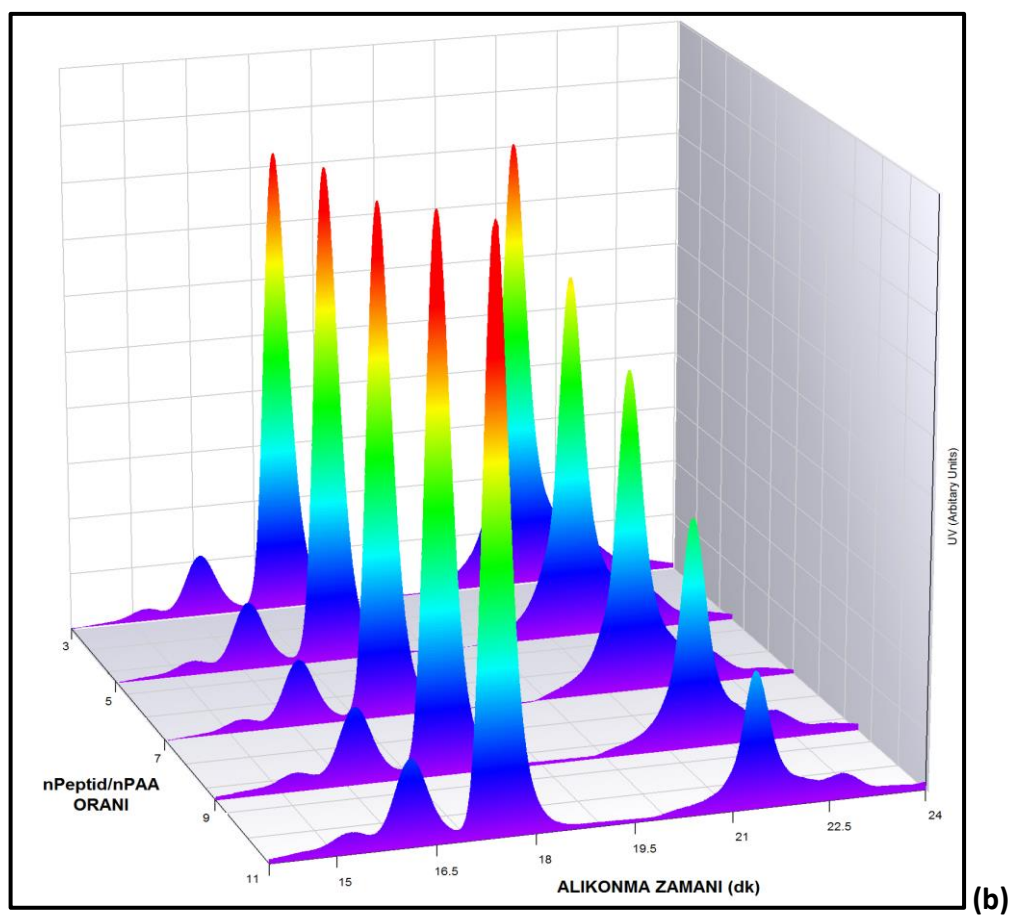
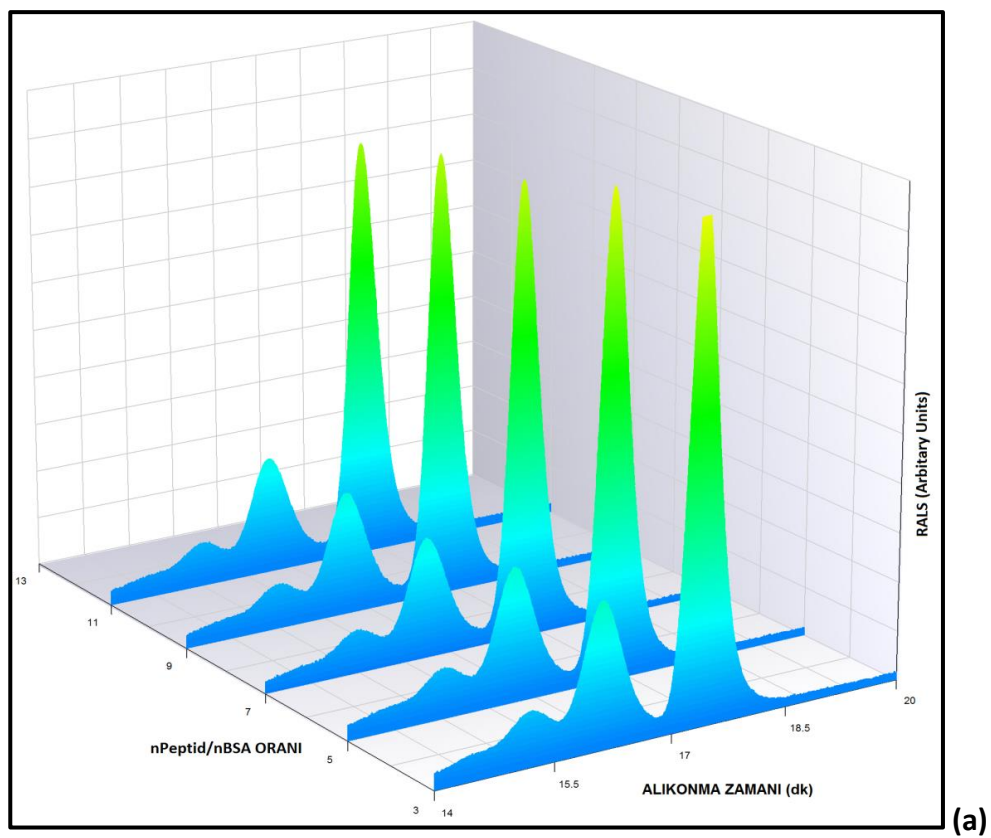
Koşul1'e göre sentezlenen bütün fiziksel komplekslerin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

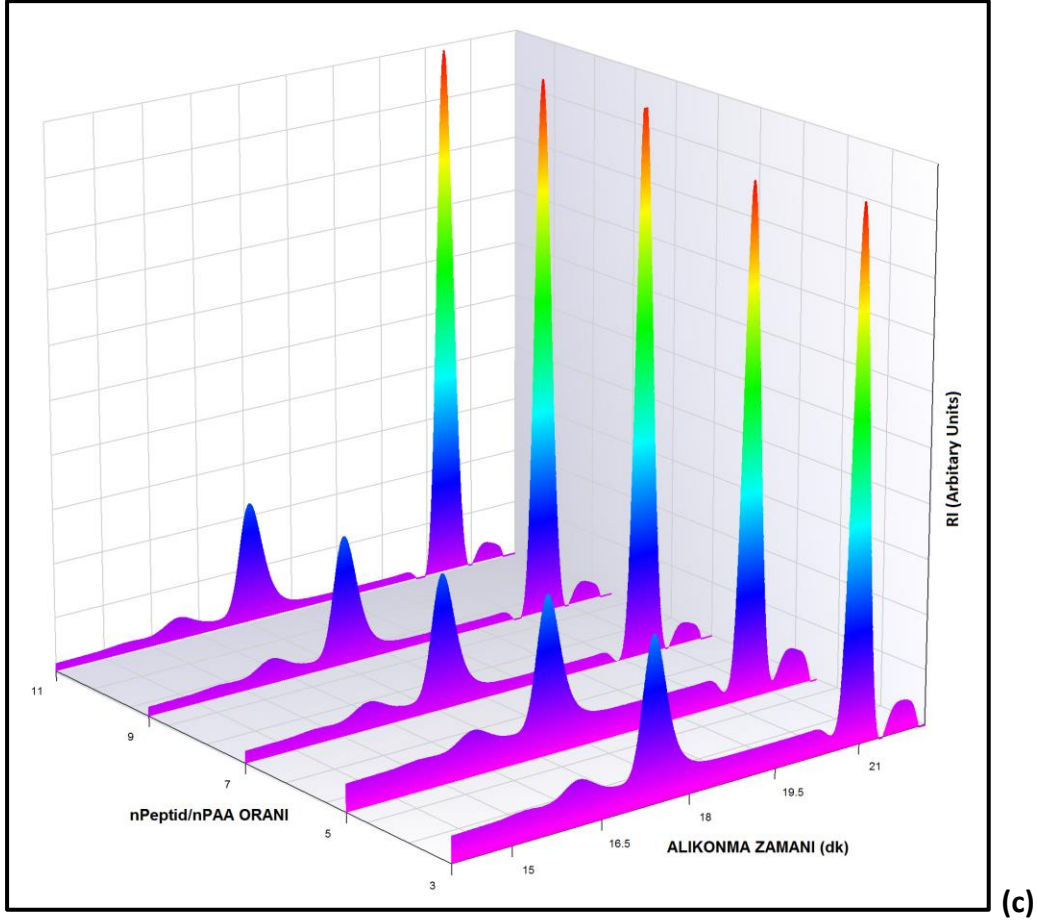


Şekil 4.72 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: nPeptid/nBSA=3(■) (λ_{max} =337nm), 5(■) (λ_{max} =337nm), 7(■) (λ_{max} =335nm), 9(■) (λ_{max} =333nm), 11(■) (λ_{max} =334nm), Serbest peptid (■) (λ_{max} =348nm) ve BSA(■) (λ_{max} =334nm)



Şekil 4.73 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile Komplekslerinin kıyaslamalı HPLC kromatogramları





Şekil 4.74 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS)dedektörüne, (b) UV dedektörüne, (c) RI dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.10.5 Amiloid Beta (1-21) Peptid Dizisinin BSA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

BSA ile Amiloid Beta (1-21) Peptid dizisinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları ve farklı oranlar kullanılarak çok sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. Bütün fiziksel kompleksler, sulu ortamda ve konjugasyon reaksiyonlarında bahsedildiği gibi sabit 0.5 mg/mL BSA konsantrasyonunda yapılmıştır. Sentezler yapılırken hem BSA hem de peptid ara stok çözeltileri hazırlanmış, böylelikle her bir reaksiyonun eşit koşullarda olması sağlanmıştır.

4.10.5.1 Farklı Koşullarda Sentezlenen Fiziksel Kompleksler

- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

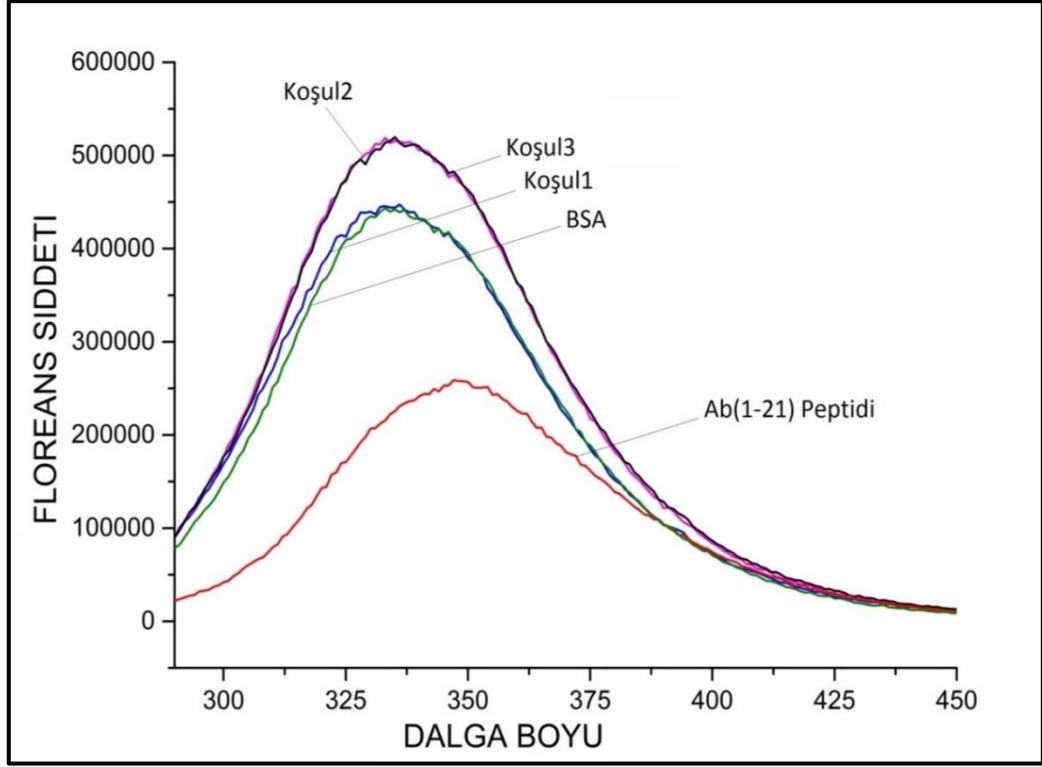
5 mg BSA, pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 1 M NaOH ile 5'e** ayarlandı. Daha sonra **pH 5'teki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında aktivasyona bırakıldı. 2 saat sonunda elde edilen fiziksel kompleksin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg BSA, pH=7 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 7'ye** ayarlandı. Daha sonra **pH 7'deki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında aktivasyona bırakıldı ve 2 saat sonunda elde edilen fiziksel kompleksin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

- **Koşul 3'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

5 mg BSA, pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin **pH'sı 5.7 (peptidin izoelektrik noktası)'ye** ayarlandı. Daha sonra **pH 5.7'deki** bu BSA çözeltisinin üzerine 0.515 mg A β (1-21) peptidi eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca, oda sıcaklığında aktivasyona bırakıldı. 2 saat sonunda elde edilen fiziksel kompleksin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 4.75 Farklı reaksiyon koşullarında sentezlenen A β (1-21) peptidi-BSA komplekslerinin floresans grafiği. (■) Tek başına peptid (λ_{max} =348nm) ve (■) Tek başına BSA (λ_{max} =334nm) , (■)Koşul1 (λ_{max} =333nm), (■)Koşul2 (λ_{max} =335nm), Koşul3(■)(λ_{max} =335nm)'e göre sentezlenen fiziksel kompleksler

4.10.5.2 Farklı oranlarda sentezlenen fiziksel kompleksler

BSA-A β (1-21) peptidinin farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$ = 3, 5, 7, 9, 11 başlangıç molar oranlardaki konjugasyonu, en iyi kompleks oluşumu gözlenen Koşul1'e göre yapılmıştır. Bu komplekslerin sentezi sırasında bir BSA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

5 farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, V_T =5mL olacak şekilde kompleks sentezi yapılacağından öncelikle her bir kompleks için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün kompleks oluşum reaksiyonları için gereken toplam peptid miktarı 0.972 mg'dır. 1 mg peptid tartılıp, 1 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

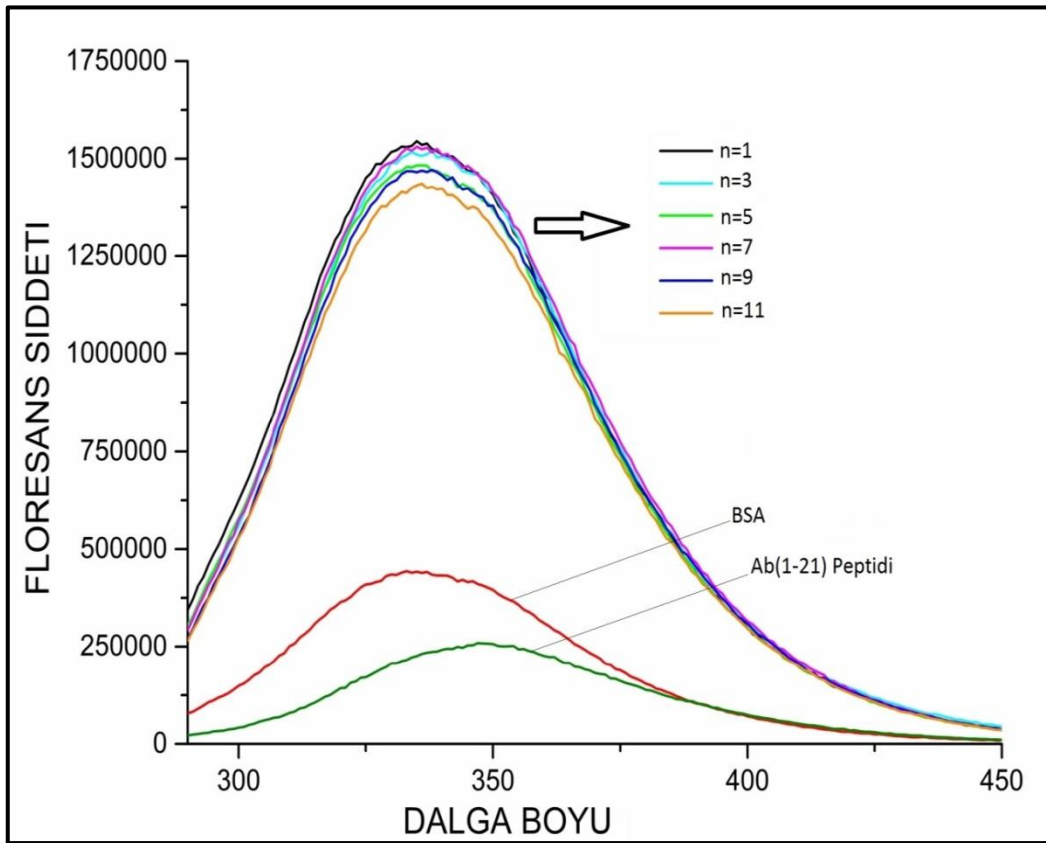
BSA stok çözeltisinin hazırlanışı:

5 farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranında, V_T = 5mL olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün

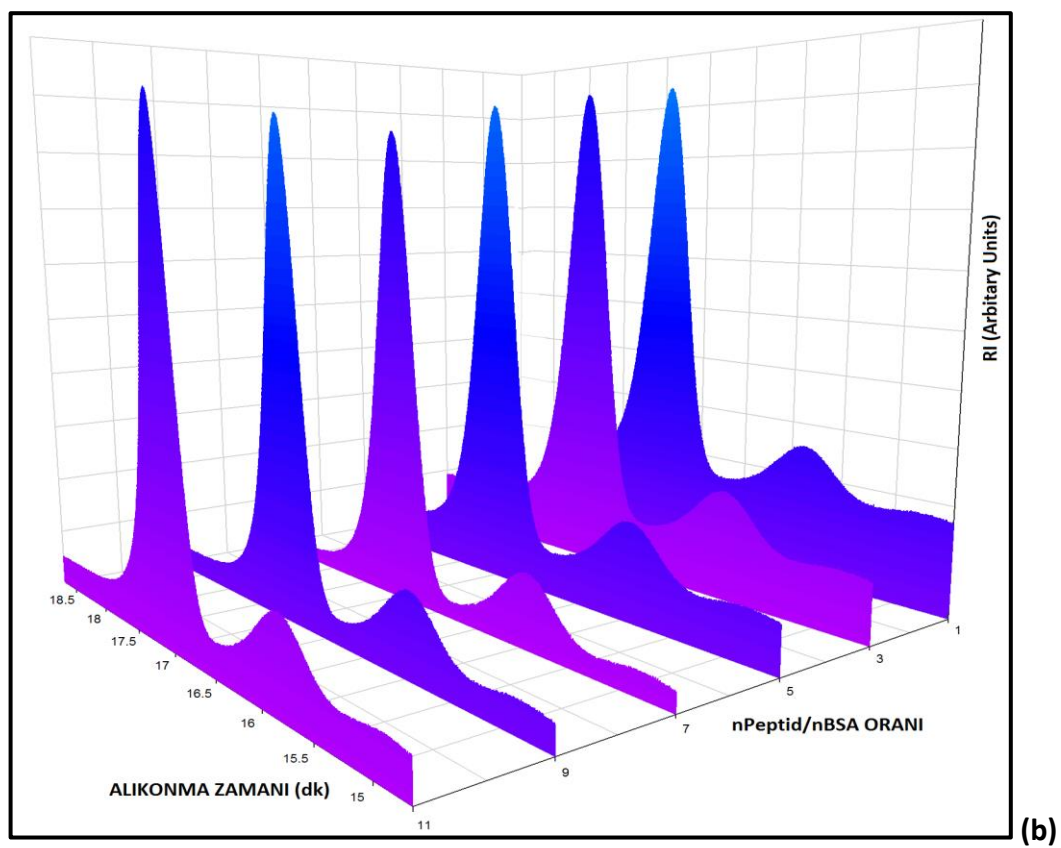
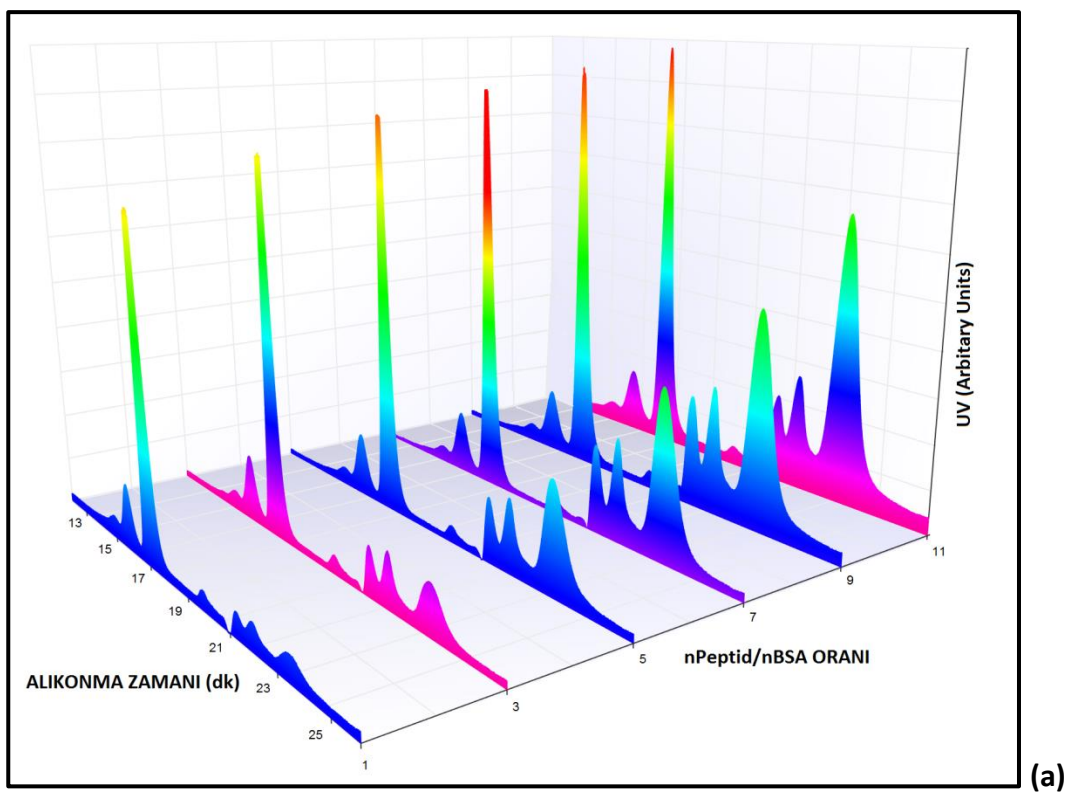
konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam BSA miktarı 15 mg'dır. 20 mg peptid tartılıp, 20 mL saf suda çözülerek, 1 mg/1 mL olan BSA ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

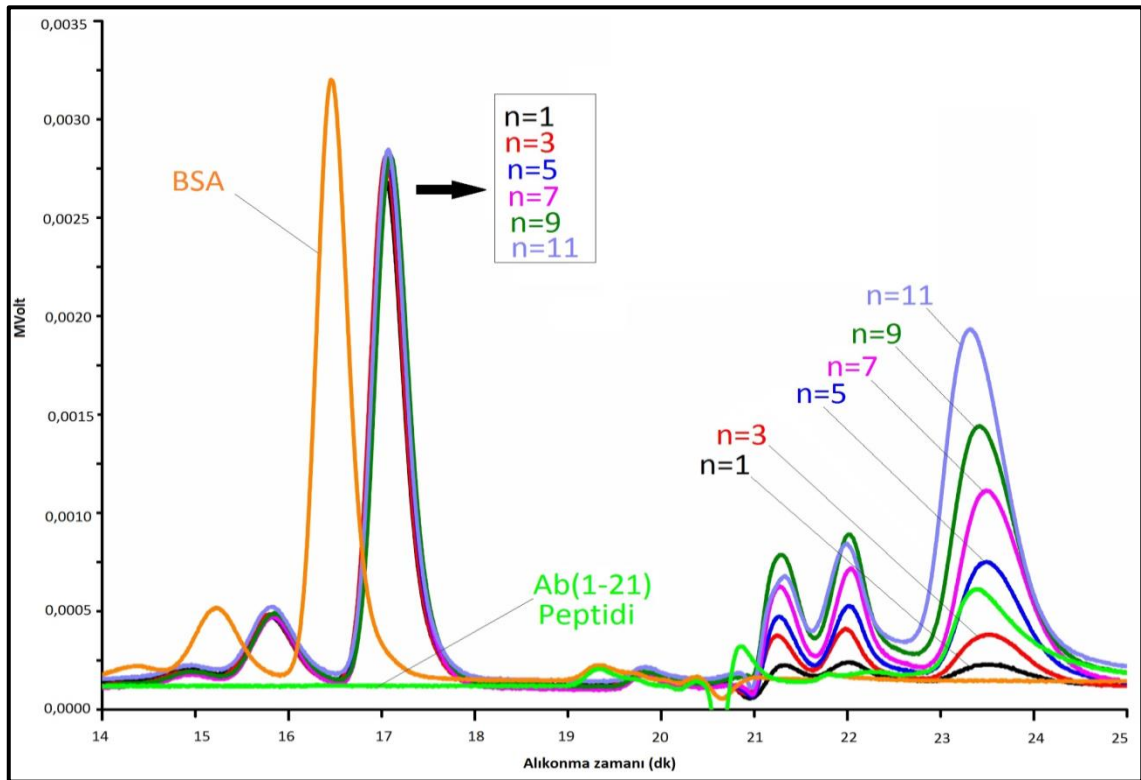
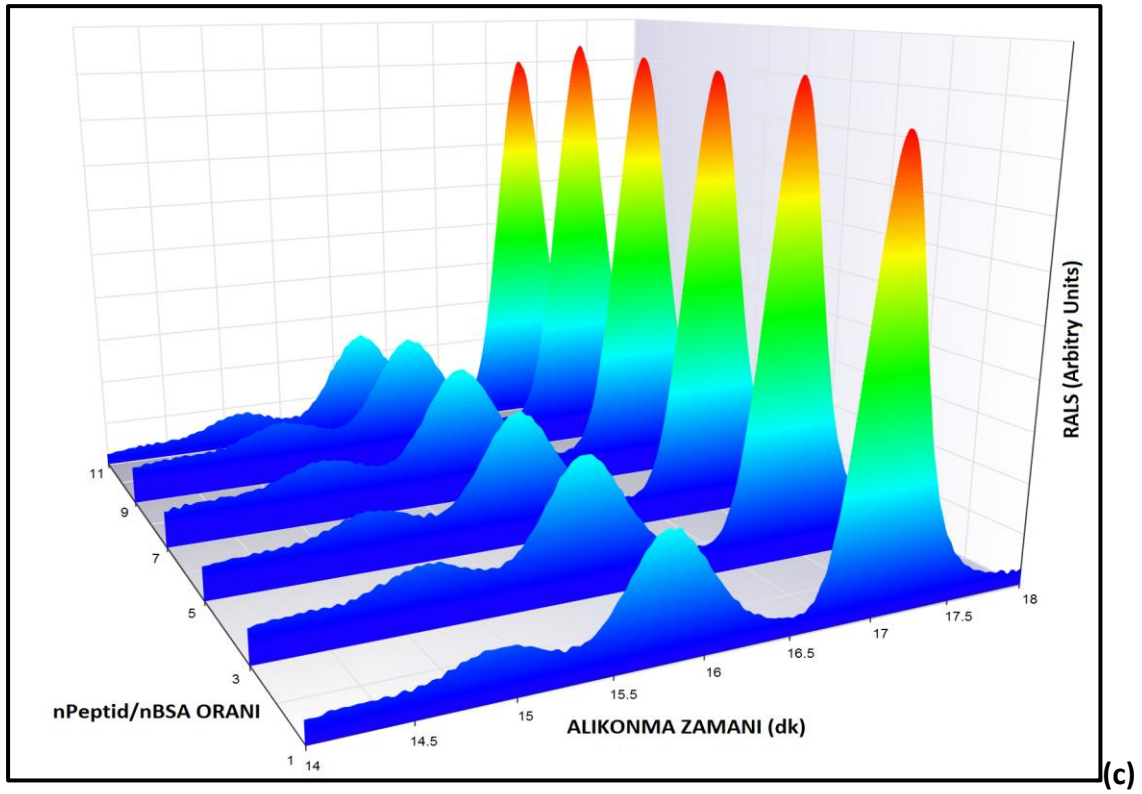
Çizelge 4.11 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranı	C_{BSA} (mg/5mL)	BSA ara stok çözeltisinden çekilecek miktar (mL)	C_{pep} (mg/5mL)	Peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	2.5	2.5	0.027	27
3	2.5	2.5	0.081	81
5	2.5	2.5	0.135	135
7	2.5	2.5	0.189	189
9	2.5	2.5	0.243	243
11	2.5	2.5	0.297	297



Şekil 4.76 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin BSA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{BSA}}=1$ (■) ($\lambda_{\text{max}}=334\text{nm}$), 3(■) ($\lambda_{\text{max}}=333\text{nm}$), 5(■) ($\lambda_{\text{max}}=334\text{nm}$), 7(■) ($\lambda_{\text{max}}=333\text{nm}$), 9(■) ($\lambda_{\text{max}}=333\text{nm}$), 11(■) ($\lambda_{\text{max}}=333\text{nm}$), Serbest peptid (■) ($\lambda_{\text{max}}=347\text{nm}$) ve BSA(■) ($\lambda_{\text{max}}=334\text{nm}$)





4.10.6 Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid Dizilerinin VPAA ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

VPAA ile Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid dizlerinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları ve farklı oranlar kullanılarak çok sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. Bütün fiziksel kompleksler, sulu ortamda ve konjugasyon reaksiyonlarında bahsedildiği gibi sabit 0.5 mg/mL VPAA konsantrasyonunda yapılmıştır. Sentezler yapılırken hem VPAA hem de peptid ara stok çözeltileri hazırlanmış, böylelikle her bir reaksiyonun eşit koşullarda olması sağlanmıştır.

Amiloid Beta (1-15) ve (1-21) Peptid dizlerinin VPAA ile aşağıda anlatılan her iki koşulda da fiziksel kompleksleri ayrı ayrı sentezlenmiştir.

4.10.6.1 Farklı koşullarda sentezlenen Amiloid Beta (1-15) / VPAA ve Amiloid Beta (1-21) / VPAA Fiziksel Kompleksleri

Aşağıda fiziksel komplekslerin sentezlendiği farklı koşulların mekanizması ile ilgili prosedürler yer almaktadır.

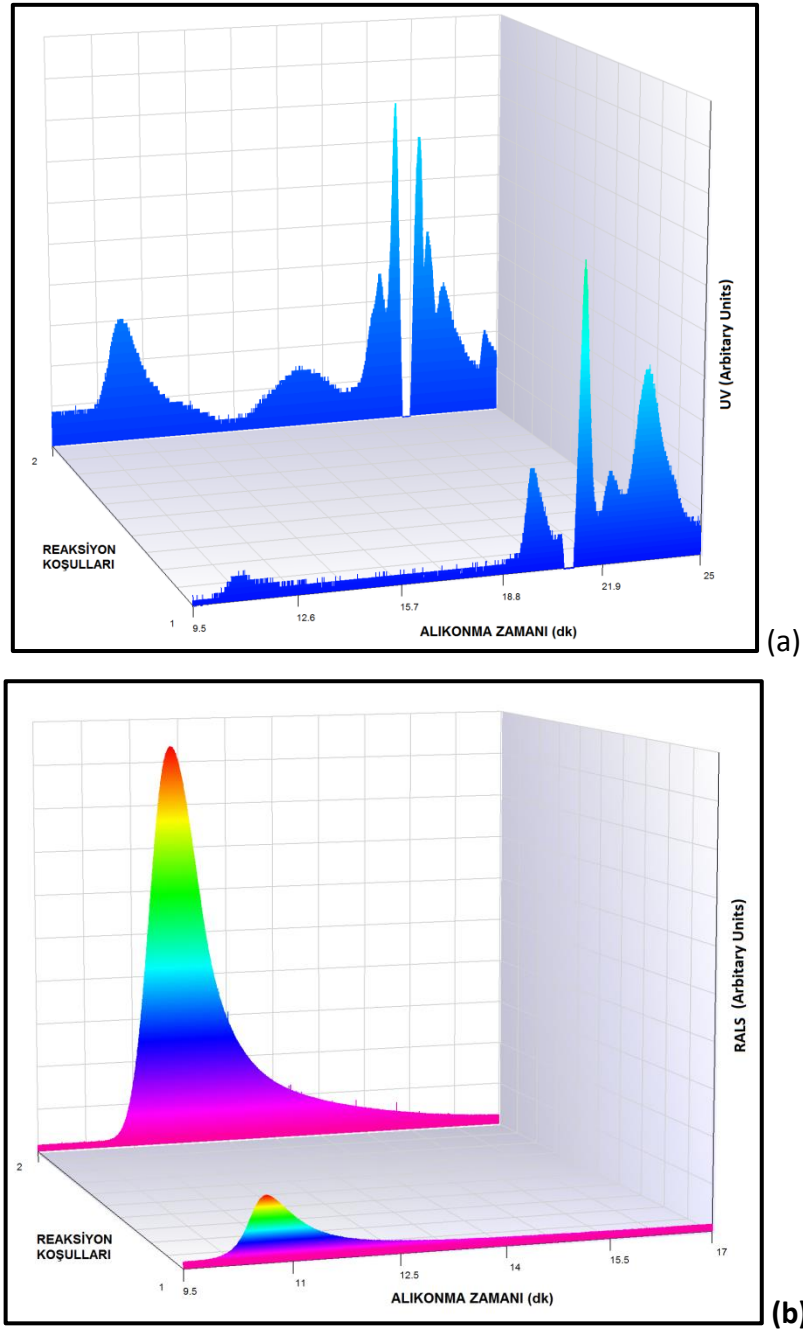
- **Koşul 1'e Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. Üzerine Amiloid Beta (1-15) ile yapılan reaksiyon için 0.252 mg peptid içeren 252 µL peptid, Amiloid Beta (1-21) ile yapılan reaksiyon içinse, 0.339 mg peptid içeren 339 µL peptid ara stok çözeltisinden eklendi ve peptid/polimer kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen fiziksel kompleksin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, Kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

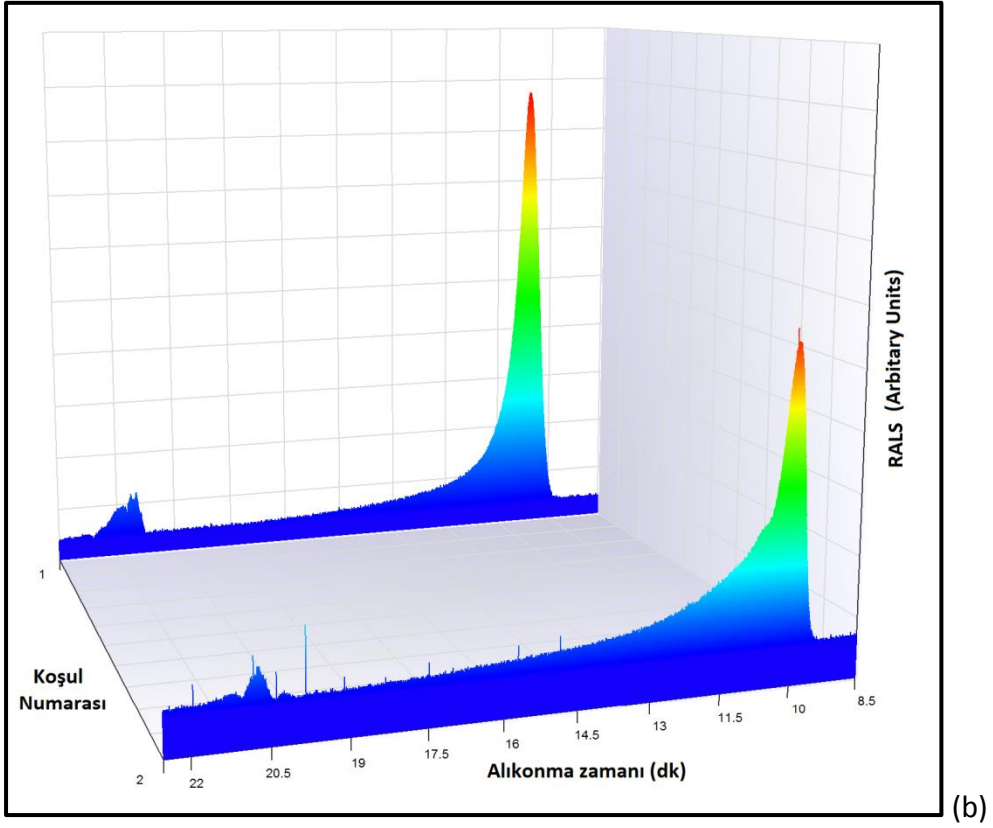
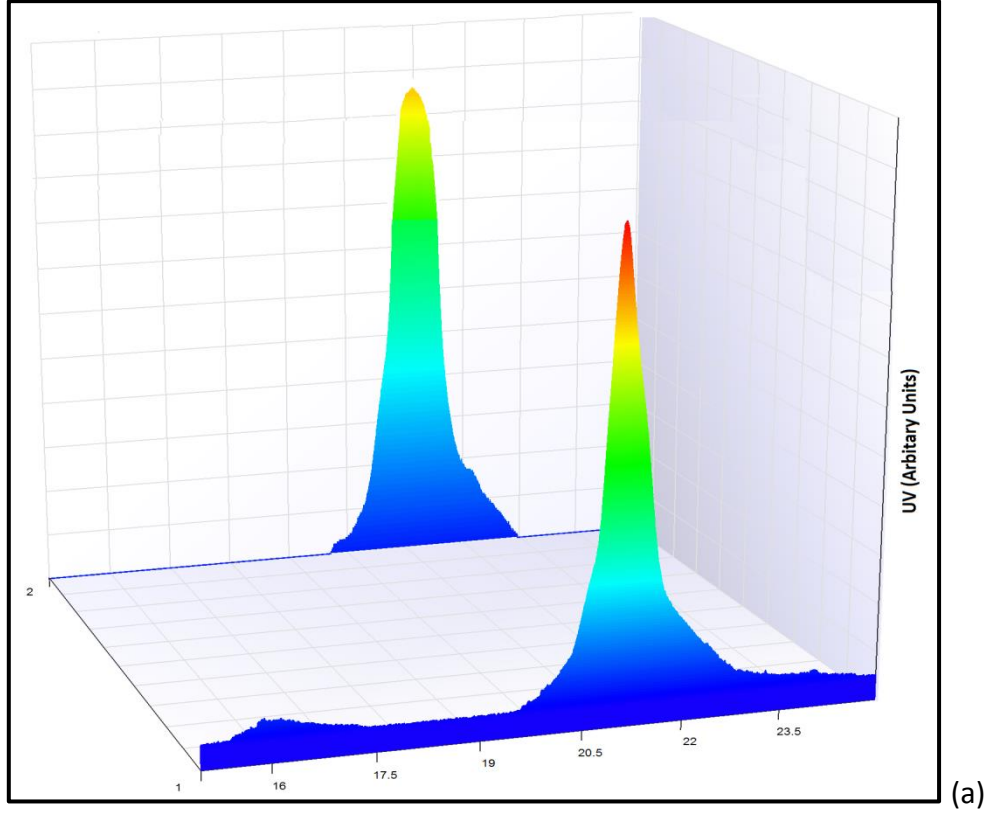
- **Koşul 2'ye Göre Yapılan Konjugatın Sentezi**

2.5 mL VPAA(1:2) ara stok çözelti, 5 mL pH=5 olan PBS'te çözüldü ve çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 5'e ayarlandı. Daha sonra pH 5'teki bu çözeltiye 7.5 mg EDC ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. 1 saat aktive olan VPAA çözeltisinin üzerine Amiloid Beta (1-15) ile yapılan reaksiyon için 0.252 mg peptid içeren 252 µL peptid, Amiloid Beta (1-21) ile yapılan reaksiyon içinse, 0.339 mg peptid içeren 339 µL peptid ara

stok çözeltisinden eklendi ve peptid/polimer kompleks oluşumu için 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen fizikel kompleksin yapı ve karakterizasyonu, kromatografik (GPC: Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık saçılması, Kromatografik sistem), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 4.79 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranlarında sentezlenen Aβ(1-21) peptidinin VPAA ile komplekslerinin (a) UV dedektörüne, (b) Işık saçılması (RALS)dedektörüne ait SEC kromatogramları



Şekil 4.80 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranlarında sentezlenen $A\beta(1-15)$ peptidinin VPAA ile komplekslerinin (a) UV detektörüne, (b) Işık saçılması (RALS)dedektörüne ait SEC kromatogramları

4.10.6.2 Farklı oranlarda sentezlenen Amiloid Beta (1-15) / VPAA ve Amiloid Beta (1-21) / VPAA Fiziksel Kompleksleri

VPAA-A β (1-21) ve VPAA-A β (1-15) peptidlerinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlarda sentezlenen fiziksel kompleksleri, en iyi kompleks oluşumu gözlenen Koşul1'e göre yapılmıştır. Bu komplekslerin sentezi sırasında bir VPAA ara stok çözeltisi ve bu reaksiyonlara özel olarak hazırlanan bir peptid stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Peptid stok çözeltisinin hazırlanışı:

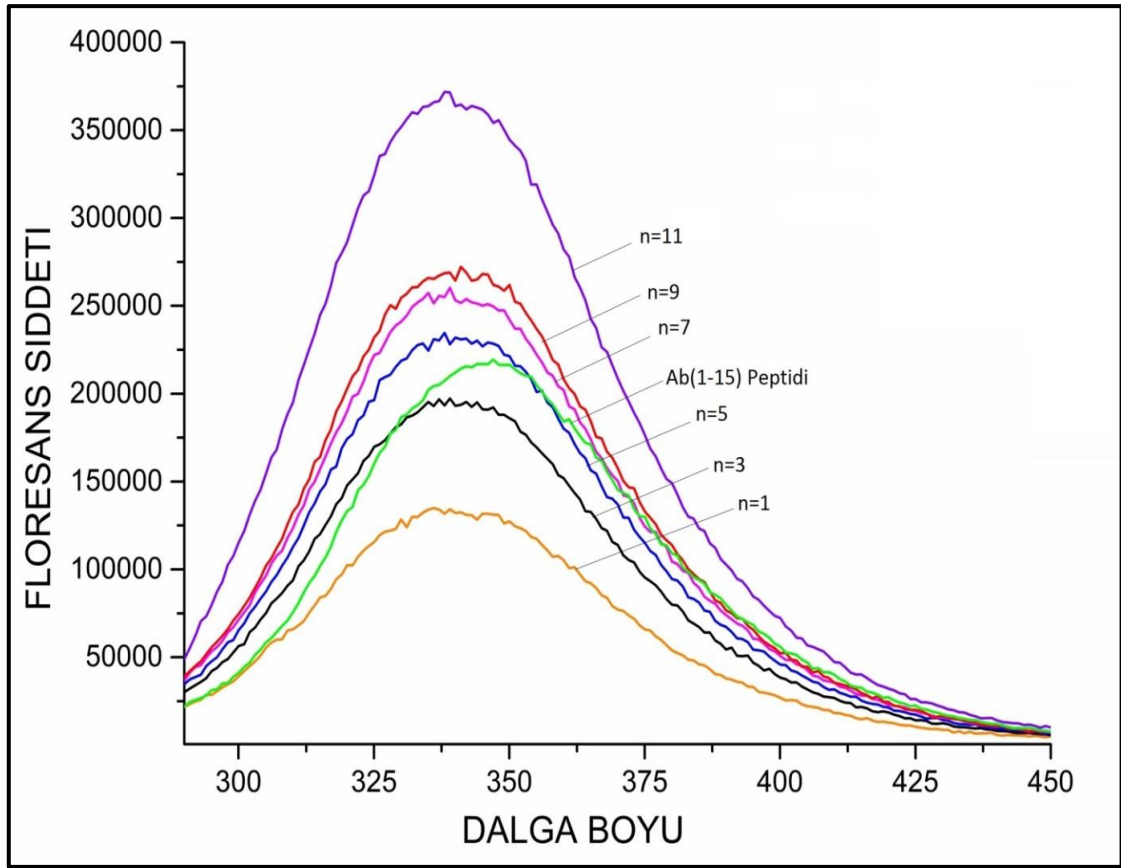
5 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T=5\text{mL}$ olacak şekilde kompleks sentezi yapılacağından öncelikle her bir kompleks için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün kompleks oluşum reaksiyonları için gereken Amiloid Beta (1-15) peptid miktarı 0.972 mg, Amiloid Beta (1-21) peptid dizisi için ise, 0.999 mg 'dır. 1 mg peptid tartılıp, 1 mL PBS (pH=5) çözülerek, 1 mg/1 mL olan peptid ara stok çözeltisi ara hazırlanmıştır.

VPAA stok çözeltisinin hazırlanışı:

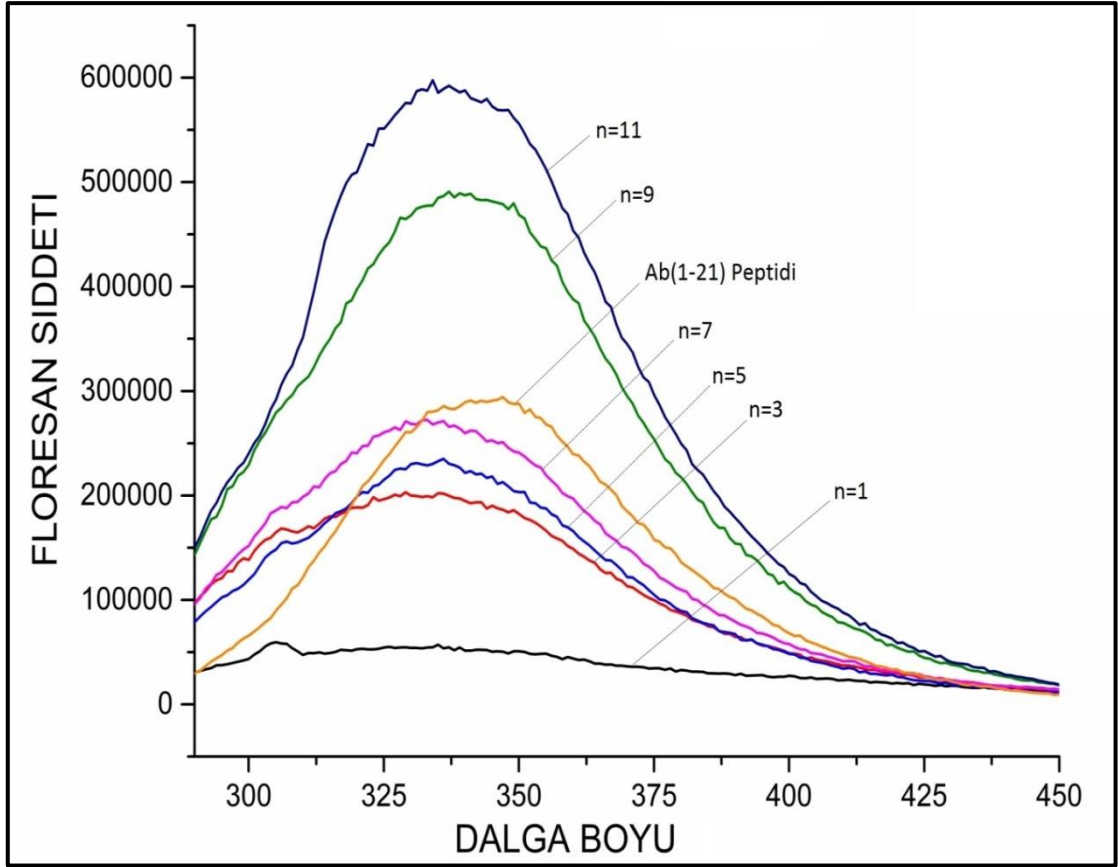
12 farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranında, $V_T= 5\text{mL}$ olacak şekilde konjugat sentezi yapılacağından öncelikle Denklem 1'e uygun olarak her bir konjugat için aşağıdaki tabloda verilen miktarlar hesaplanmıştır. Bütün konjugasyon reaksiyonları için gereken toplam VPAA miktarı 30 mg'dır. 30 mg peptid tartılıp, 30 mL saf suda çözülerek, 1 mg/1 mL olan VPAA ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 4.12 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ Oranlarında Sentezlenen Konjugatlarda Kullanılan Peptid Miktarları

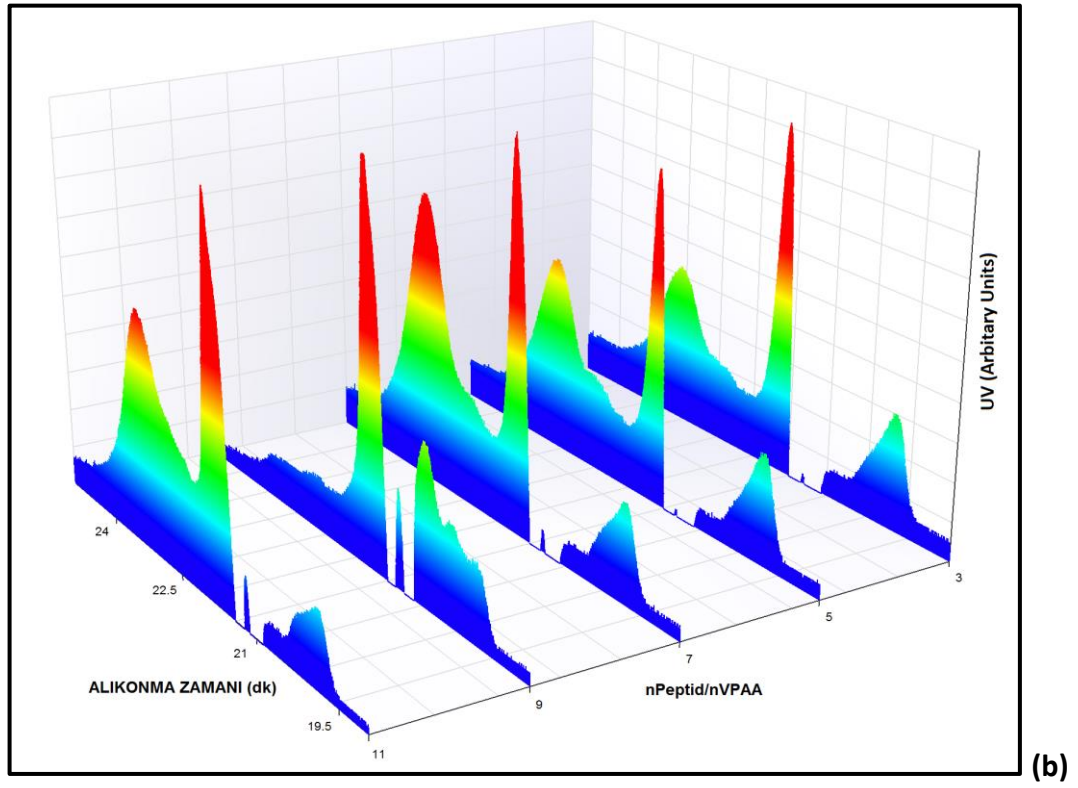
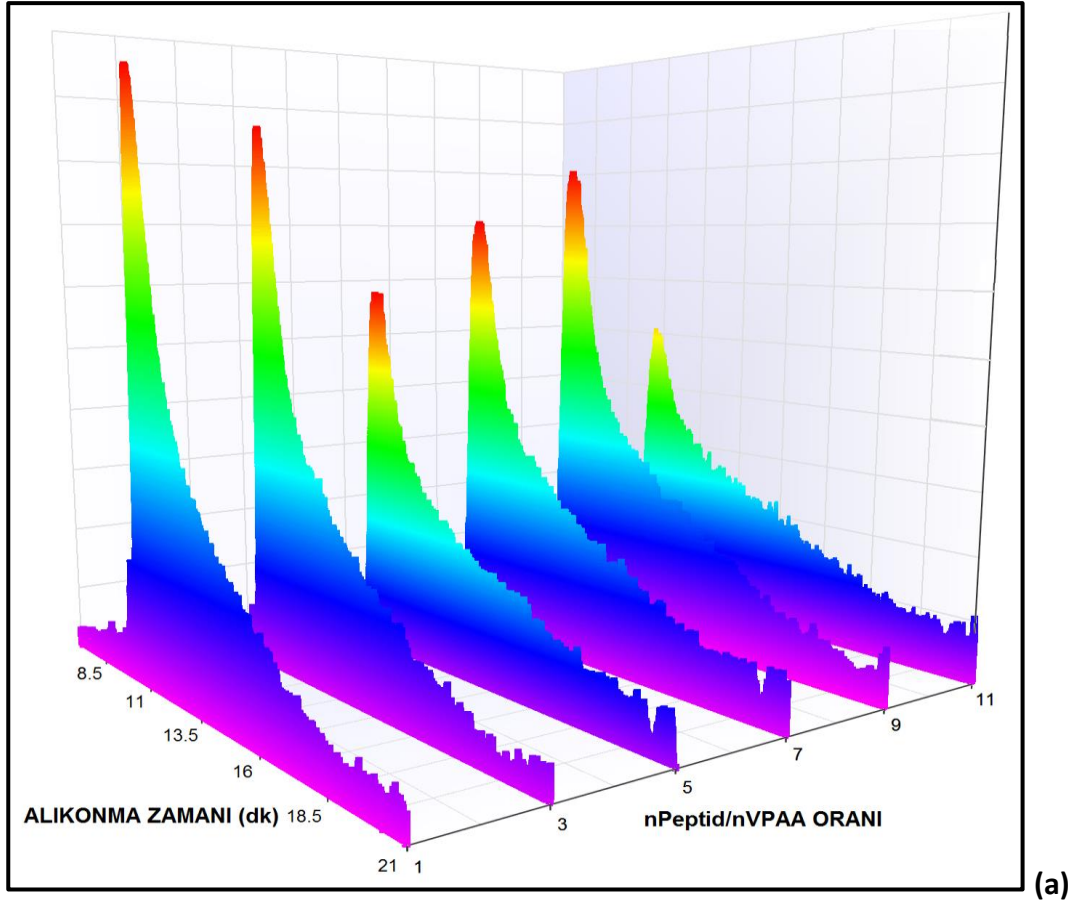
$n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranı	C_{VPAA} (mg/5mL)	VPAA ara stok çözeltisinden çekilecek miktar (mL)	C_{pep} (mg/5mL)	Peptid ara stok çözeltisinden çekilen miktar (μL)
1	2.5	2.5	0.027	27
3	2.5	2.5	0.081	81
5	2.5	2.5	0.135	135
7	2.5	2.5	0.189	189
9	2.5	2.5	0.243	243
11	2.5	2.5	0.297	297



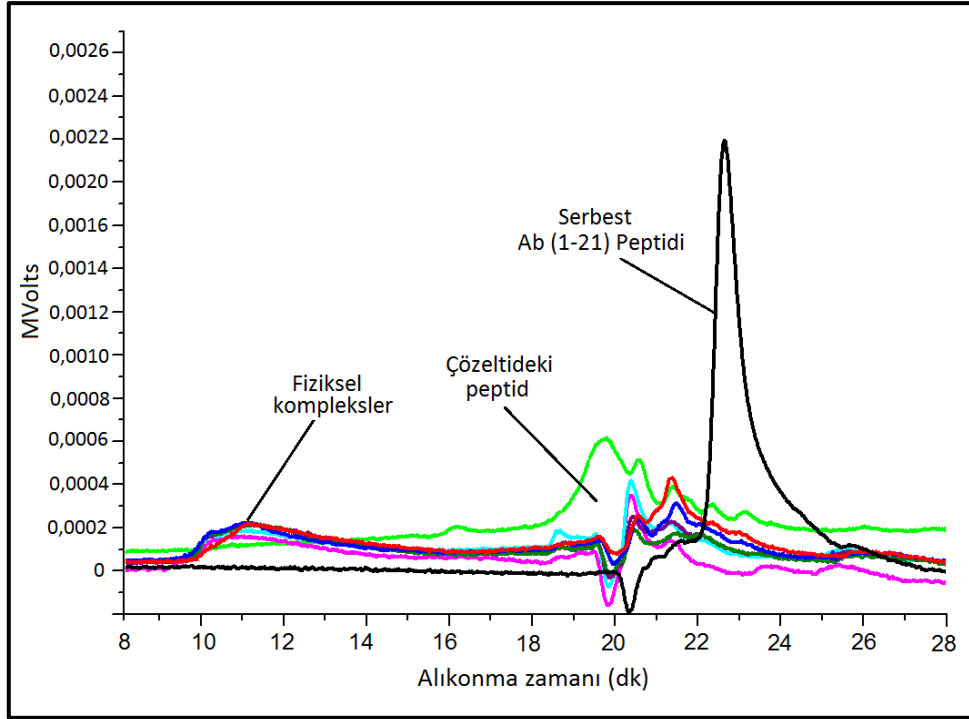
Şekil 4.81 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-15) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}}=3$ (■) ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), 5 (■) ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), 7 (■) ($\lambda_{\text{max}}=339\text{nm}$), 9 (■) ($\lambda_{\text{max}}=338\text{nm}$), 11 (■) ($\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$) ve Serbest peptid (■) ($\lambda_{\text{max}}=348\text{nm}$)



Şekil 4.82 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin VPAA ile Komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı Floresans Spektrumları: nPeptid/nVPAA=1(■) (λ_{max} =336nm), 3(■) (λ_{max} =334nm), 5(■) (λ_{max} =334nm), 7 (■) (λ_{max} =335nm), 9(■) (λ_{max} =335nm), 11(■) (λ_{max} =333nm) ve Serbest peptid (■) (λ_{max} =347nm)



Şekil 4.83 Farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPA}}$ oranlarında sentezlenen $A\beta(1-21)$ peptidinin VPAA ile komplekslerinin (a) Işık saçılması (RALS)dedektörüne (b) UV detektörüne ait SEC kromatogramları

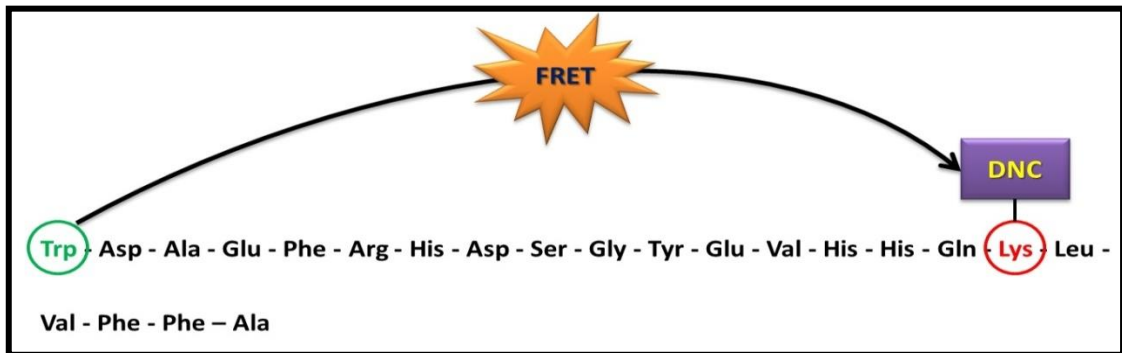


Şekil 4.84 Farklı mol oranlarında sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidinin VPAA kopolimeri ile komplekslerinin saf peptid ile kıyaslamalı HPLC grafiği

4.11 Floresans Enerji Transferi Deneyleri ve Hesaplamaları

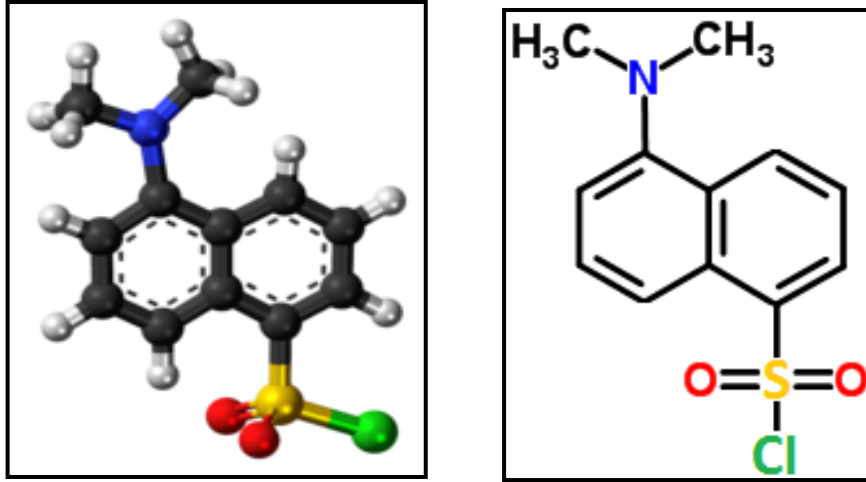
4.11.1 Floresans Enerji Transferi (FRET) Deneyi

Bu tez çalışmasında, Amiloid β (1-21) peptid dizisi biyokonjugasyon mekanizmasının sayısal değerler ile aydınlatılması için model olarak seçilmiştir. Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) deneylerinde, bu peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugatı kullanılmıştır. Bu peptid dizisinin en önemli özelliği N-terminal ucunda **Triptofan** amino asidinin ve 17. amino asit rezidüsü olarak **Lizin** amino asidinin bulunmasıdır.



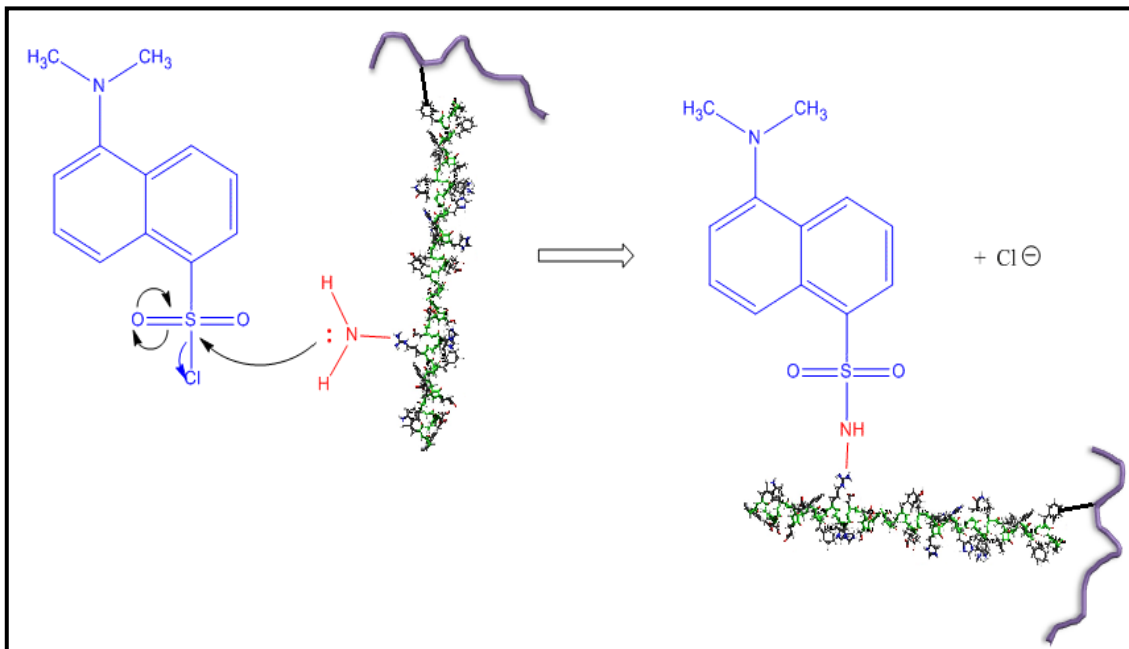
Şekil 4.85 Amiloid β (1-21) peptid dizisinin enerji transeferi bölgesine ait şematik gösterim

Floresans Rezonans Enerji Transferi Yöntemi için, 5-(dimetilamino)naftelen-1-sülfonil klorür yani **Dansil Klorür (DNC)** kullanılmıştır.



Şekil 4.86 Dansil Klorür (DNC)'ün molekül formülünün şematik gösterimi

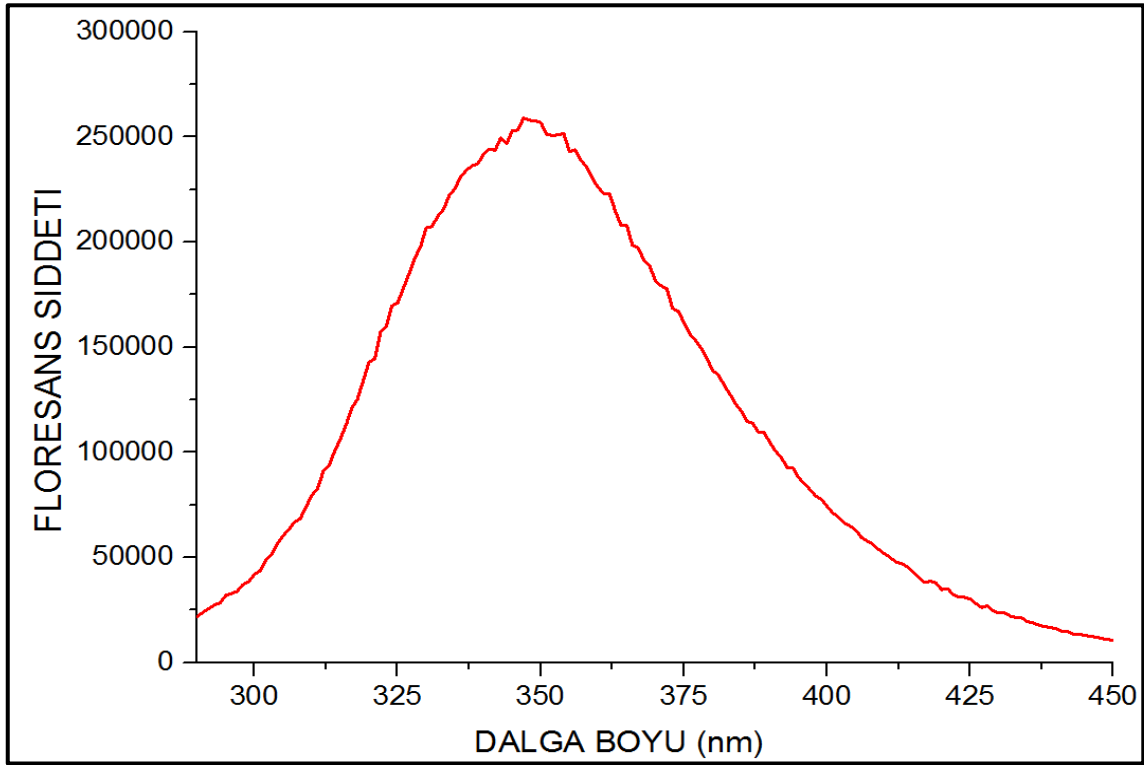
DNC'nin Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatına bağlanma mekanizması aşağıda gösterilemiştir.



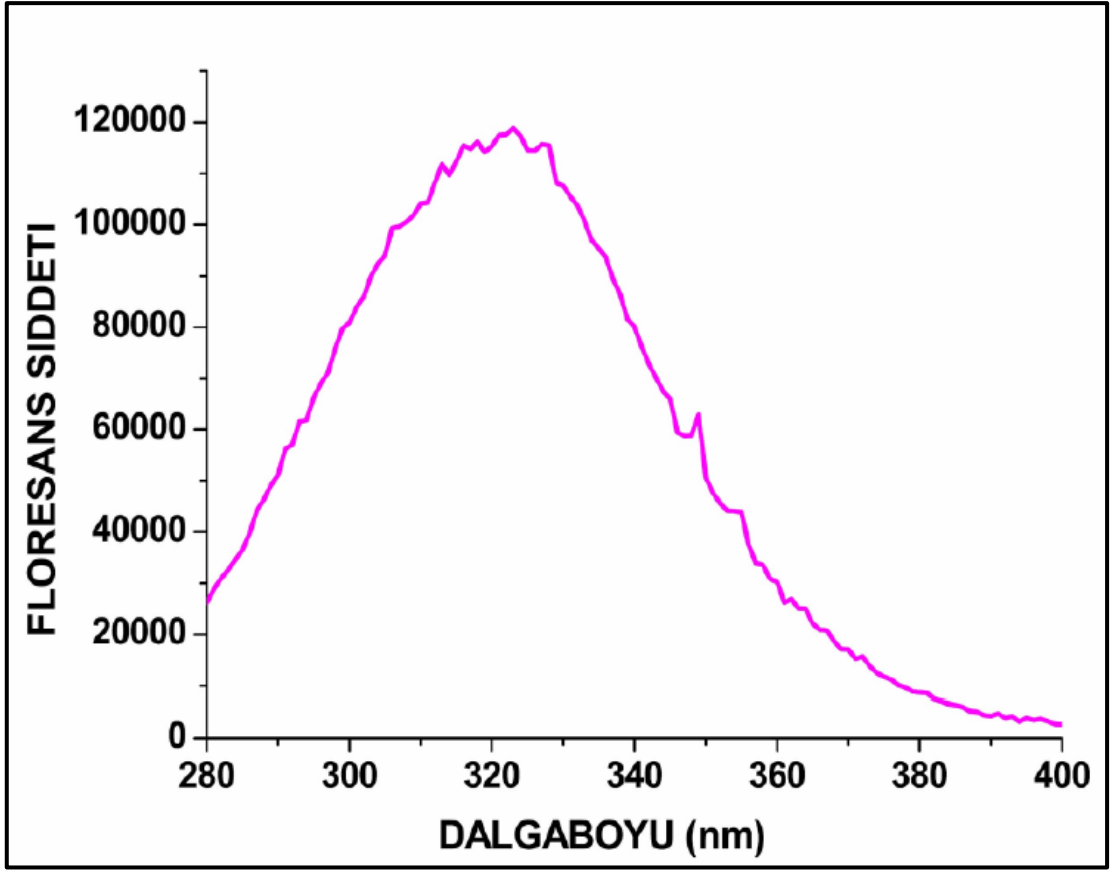
Şekil 4.87 DNC'nin Amiloid β (1-21)-PAA biyokonjugatındaki 17. aminoasit olan Lizin'den bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi

Biyokonjugat oluşumu çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile ispatlanan, Amiloid β (1-21) peptid dizisinin poliakrilik asit ile sentezlenen biyokonjugatı liyafilizatör

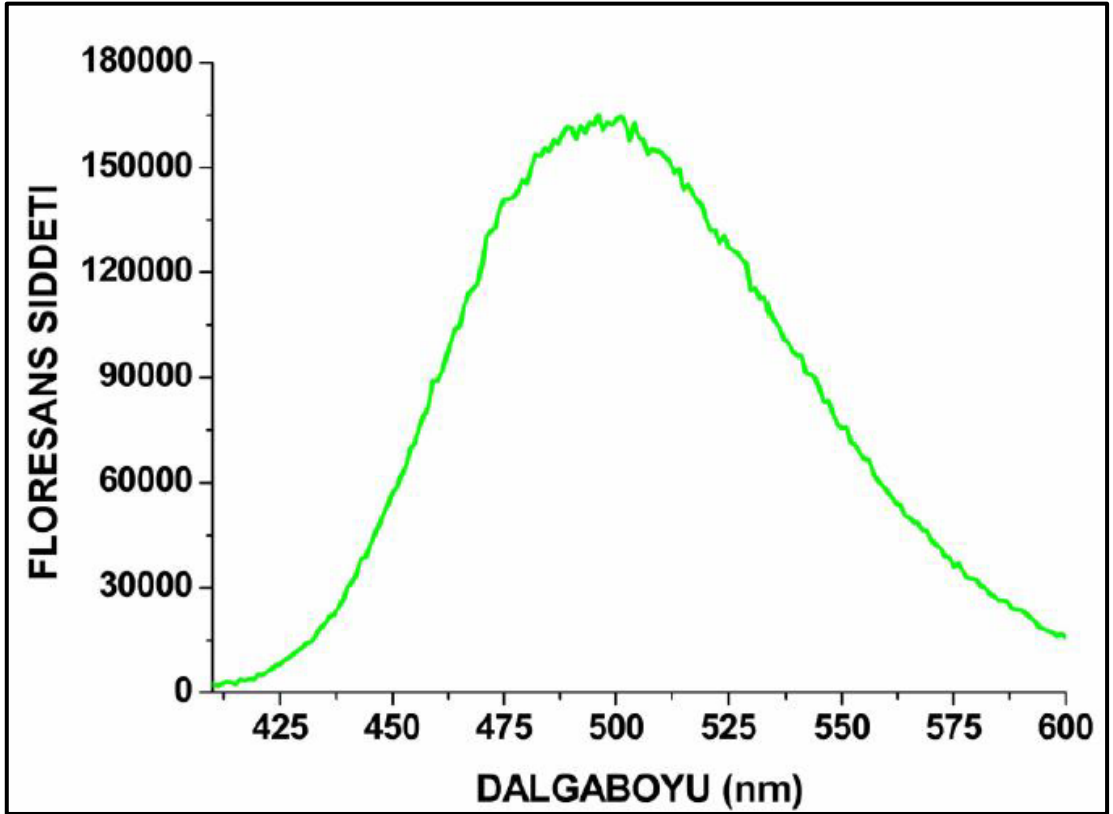
ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra bu konjugat pH=9,2 Borat tamponunda çözülmüştür. Deneyde kullanılacak boya olan DNC konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde asetonitrilde (ACN) çözülmüştür. Floresans spektrometre ile yapılan ölçümler sayesinde, DNC boya molekülünün FRET deneyleri için kullanılacak optimum konsantrasyonunun 2µl olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çeşitli deneyler sonucunda boya molekülünün Lizin amino asidine bağlanması için gerekli inkübasyon süresinin de 1 dakika olduğu bulunmuştur. Optimizasyon ile ilgili deneyler sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda yapılan deneylerden aşağıdaki spektrumlar elde edilmiştir.



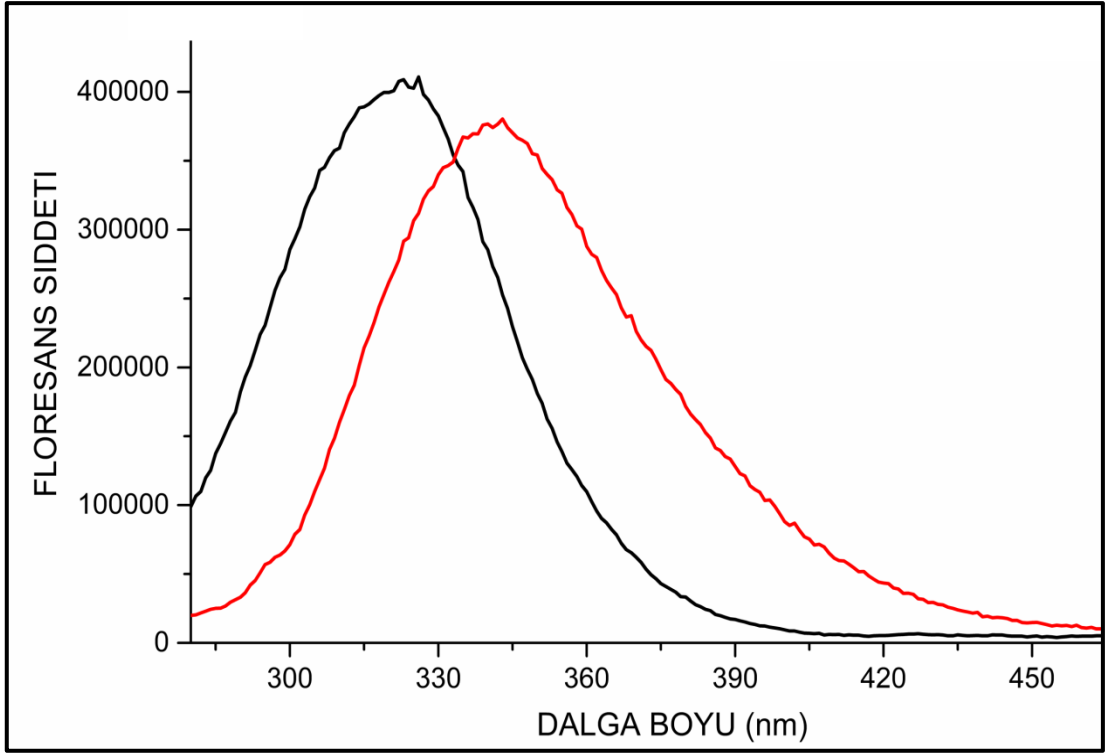
Şekil 4.88 Amiloid β (1-21) peptid dizisine ait absorpsiyon spektrumu



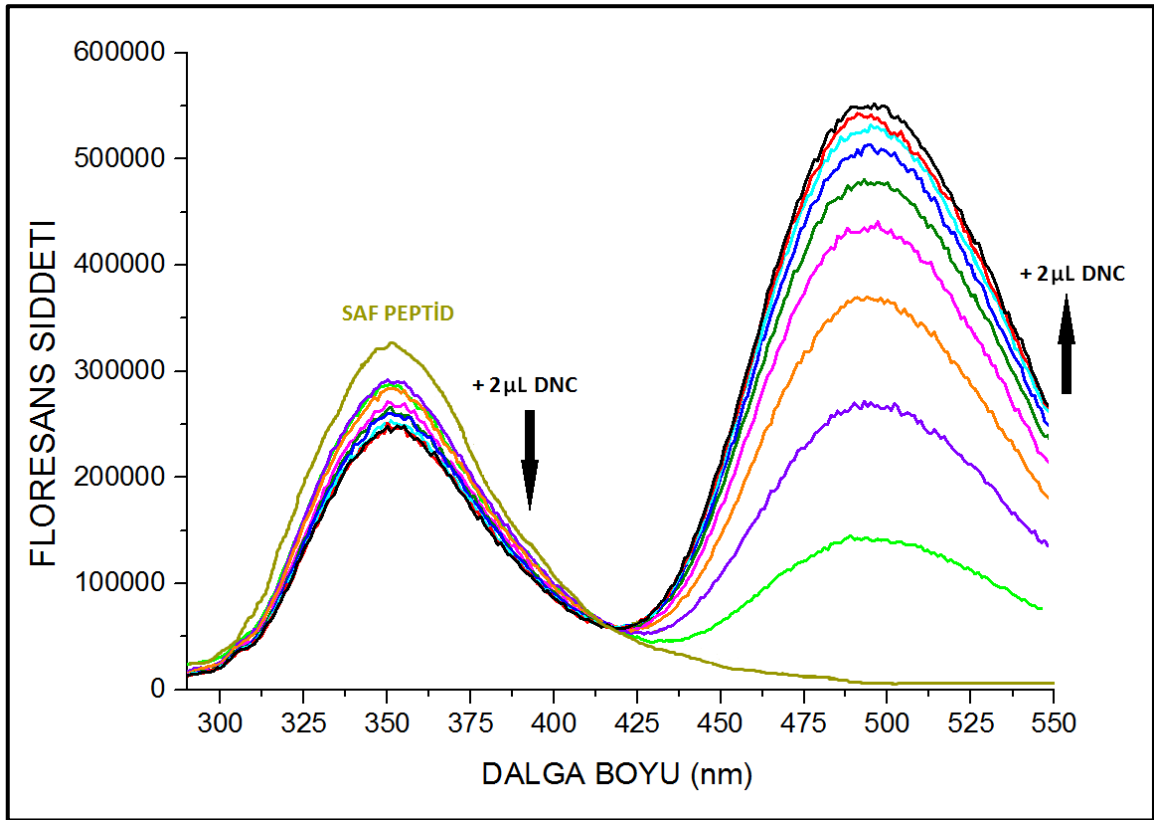
Şekil 4.89 DNC'e ait absorpsiyon spektrumu



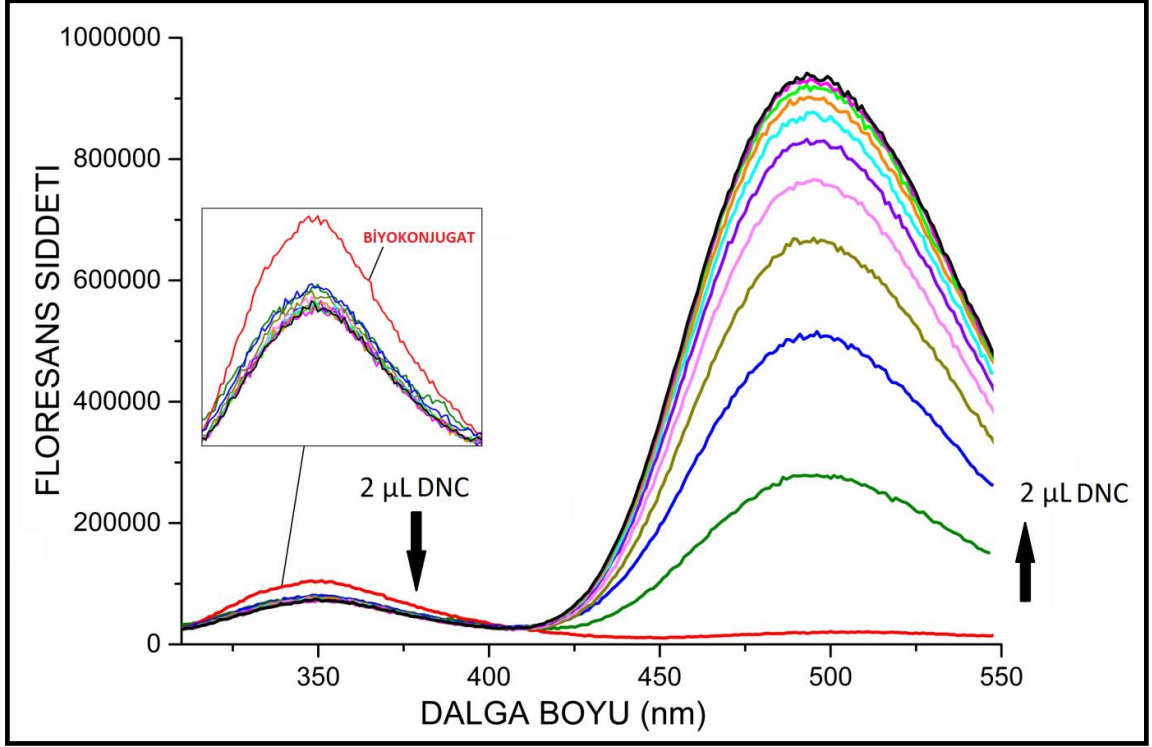
Şekil 4.90 DNC'e ait emisyon spektrumu



Şekil 4.91 (■) Donörün emisyon spektrumu ile (■) akseptörün absorpsiyon spektrumlarının overlap grafiği



Şekil 4.92 Amiloid β (1-21) peptid dizisinin DNC ile titrasyon spektrumu



Şekil 4.93 Amiloid β (1-21) peptid dizisinin PAA ile biyokonjugatının DNC ile titrasyon spektrumu

4.11.2 Saf Peptid ve Biyokonjugatların Kuantum Verimlerinin Hesaplanması

$$Q = Q_R \left(\frac{I_x}{I_R} \right) \left(\frac{A_R}{A_x} \right) \quad 6.1$$

bu denklemde I_x , peptidin veya konjugatın floresans pikinin integralini; I_R , triptofan amino asitine ait floresans pikinin integralini; A_x , peptidin veya biyokonjugatın absorbans pikinin integralini; A_R , triptofan amino asitine 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].

4.11.3 Peptidin Kuantum Veriminin Hesaplanması

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

denkleminde veriler yerine konulduğunda,

$$Q_{\text{peptid}} = 0,14 \times (2,661 \cdot 10^7 / 9,396 \cdot 10^7)(1,459 \cdot 10^7 / 1,042 \cdot 10^7)$$

$$Q_{\text{peptid}} = 0,14 \times 0,283 \times 1,4002$$

$$Q_{\text{peptid}} = 0,054$$

22 tane amino asit rezidüsüne sahip, -N terminal ucunda Triptofan amino asidi olan Amiloid β (1-21) peptid dizisinin kuantum verimi 0,054 olarak bulunmuştur.

4.11.4 Biyokonjugatın Kuantum Veriminin Hesaplanması

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

$$Q_{\text{biyokonjugat}} = 0,14 \times (7,7069 \cdot 10^6 / 9,396 \cdot 10^7) = 0,042$$

-N terminal ucunda Triptofan amino asiti olan Amiloid β (1-21) peptid dizisinin poliakrilik asit ile EDC varlığında kovalent konjugasyonu sonucu elde ettiğimiz peptid-polimer biyokonjugatının kuantum verimi ise 0,042 olarak bulunmuştur.

4.11.5 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 verimle gerçekleşir. 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:

$$R_0 = 0,2108 (K^2 \phi_D n^{-4} J_{DA})$$

R_0 : Förster kritik yarıçapı.

κ^2 : Oryantasyon faktörü.

Φ_D : Akseptörün yokluğunda, donörün kuantum verimi.

n : Ortamın kırılma indeksi.

J_{DA} : Akseptörün absorpsiyon spektrumu ile donörün emisyon spektrumunun arasındaki üst üste çıkan kısmının integralidir. J_{DA} 'nın overlap integrali, akseptörün absorpsiyon spektrumu ile donörün floresans emisyon spektrumu biliniyorsa hesaplanabilir.

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

J_{DA} : Donörün emisyon spektrumu.

E_A : Akseptörün absorpsiyon spektrumu.

C : Denklem 4.10 ile tanımlanan normalizasyon faktörüdür.

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

$\epsilon(\lambda_{\max})$: 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

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

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 bilinirse, donör ile akseptör arasındaki mesafe, r_{DA} hesaplanabilir.

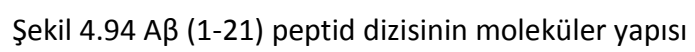
$$r_{DA} = \left(\frac{1}{E} - 1\right)^{1/6} R_0 \quad 4.13$$

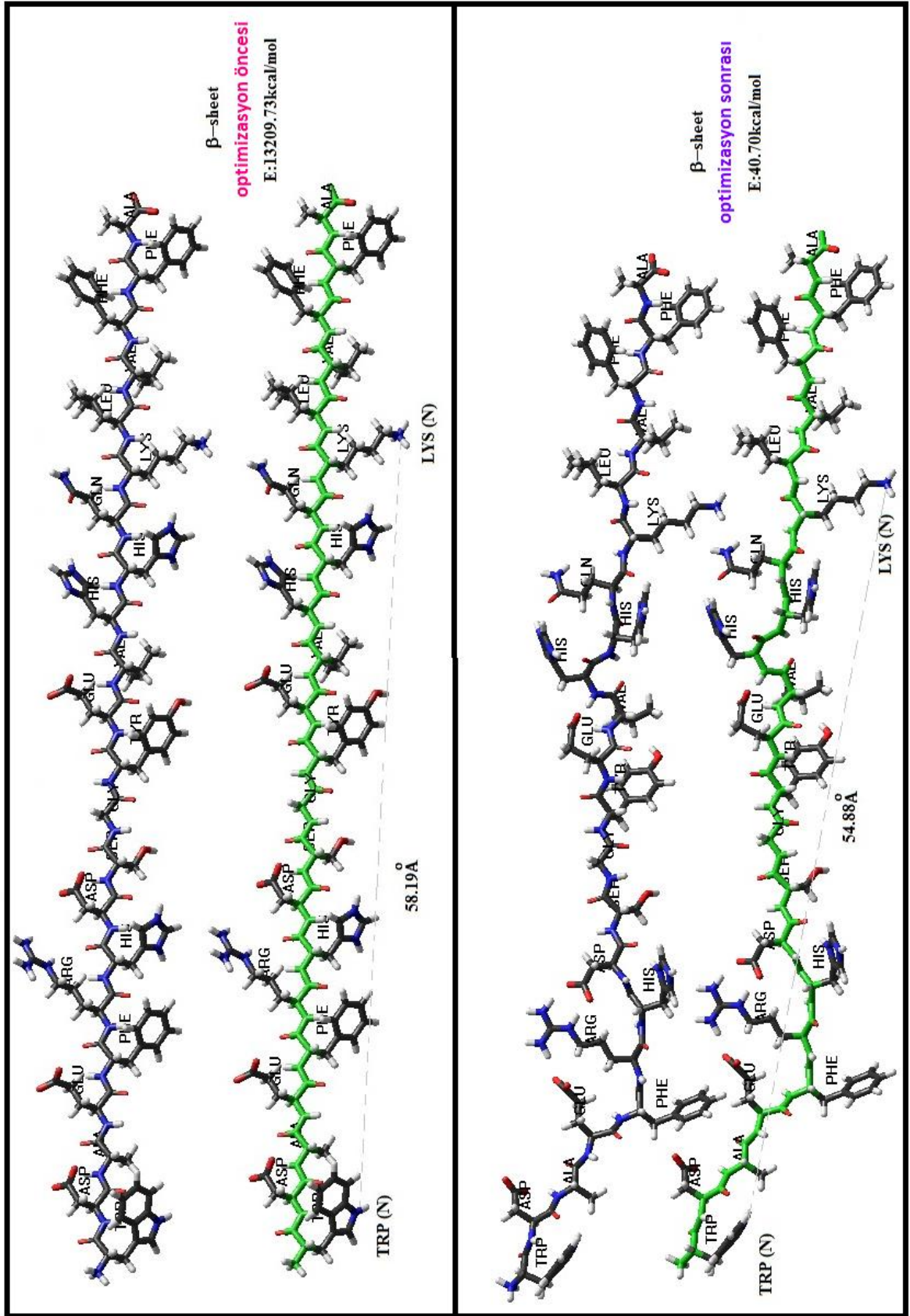
$$R_0 = 0,2108 \cdot \sqrt[6]{\kappa^2 \phi_D n^{-4} \frac{\epsilon(\lambda_{max})}{E_A(\lambda_{max})} \frac{\int_0^\infty I_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda}} \quad 4.14$$

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 76,377 Å olduğu ve donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafenin ise r_{DA} 'nın 58,752 Å olduğu bulunmuştur. Peptid-Poliakrilik asit biyokonjugatı için R_0 değerinin 82,308 Å olduğu ve donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafenin ise $r_{DA}=63,296$ 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 4,544 Å daha uzadığı ispatlanmıştır.

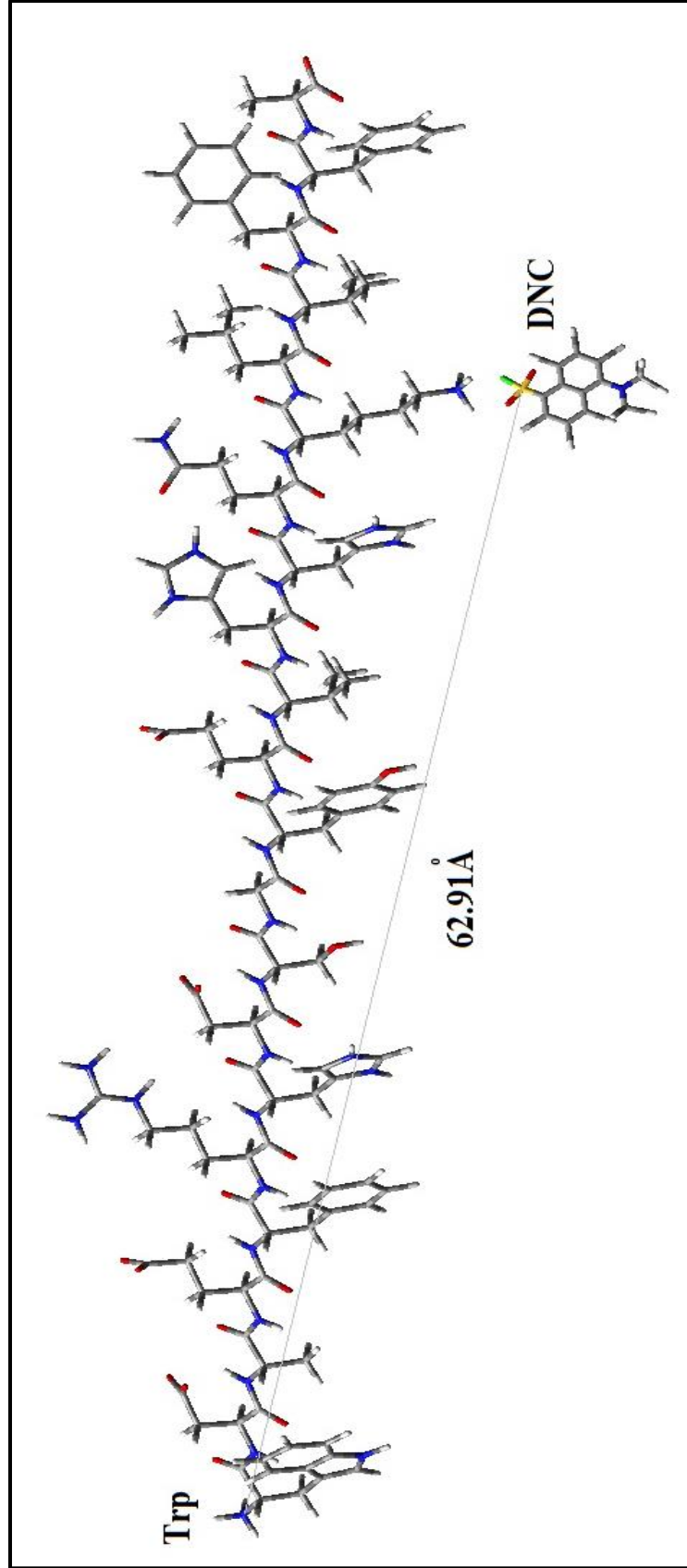
4.12 Modelleme Sonuçları

Bu deneyde, HyperChem 7 programı kullanılarak, moleküllerin 3 boyutlu (3D) şekli oluşturulmuş, optimizasyon öncesi ve sonrasında moleküllerin geometrisi ve DNC ve akrilik asit monomeri gibi moleküller arasındaki bağ uzunlukları belirlenmiştir.

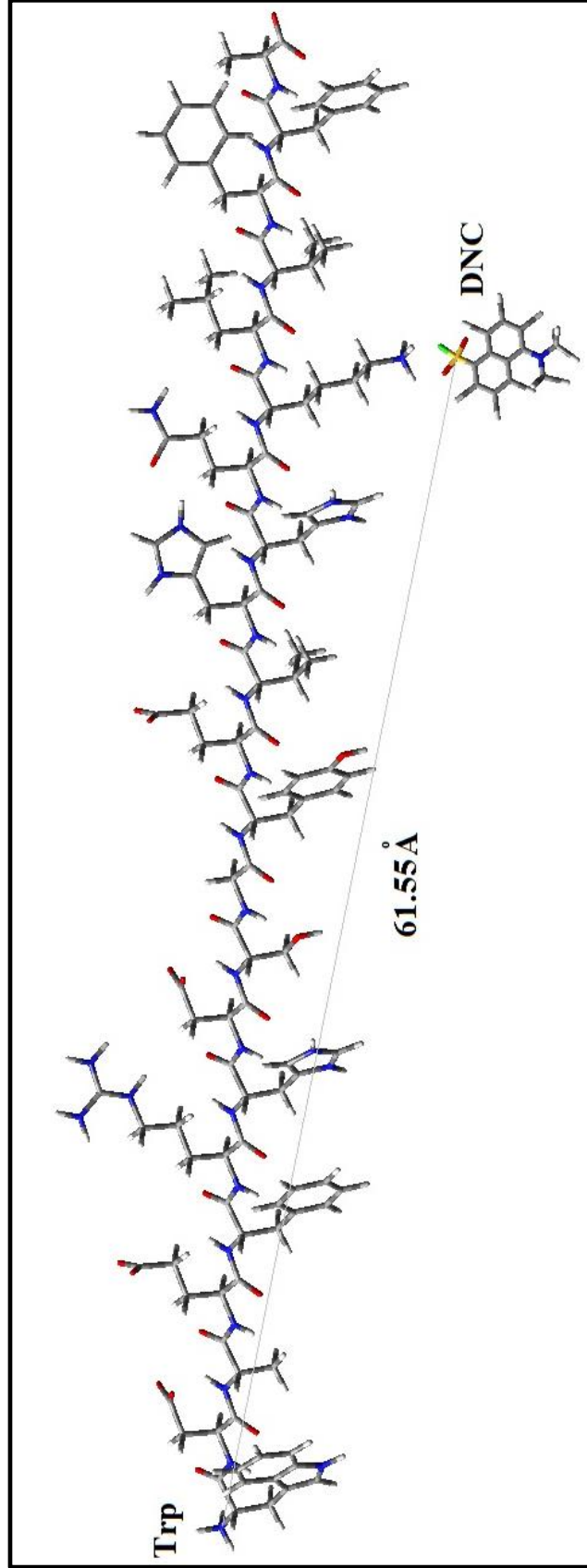




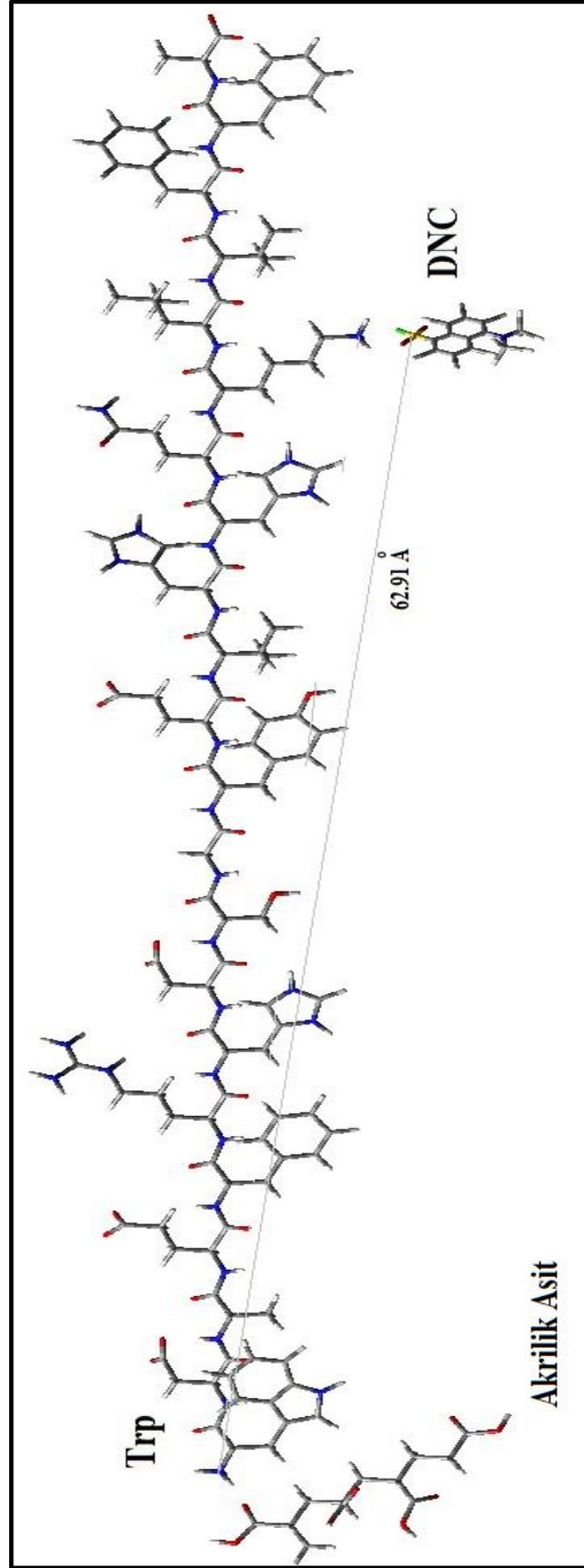
Şekil 4.95 Aβ (1-21) peptid dizisinin β-sheet yapısında optimizasyon öncesindeki geometrisinin modellemesi.



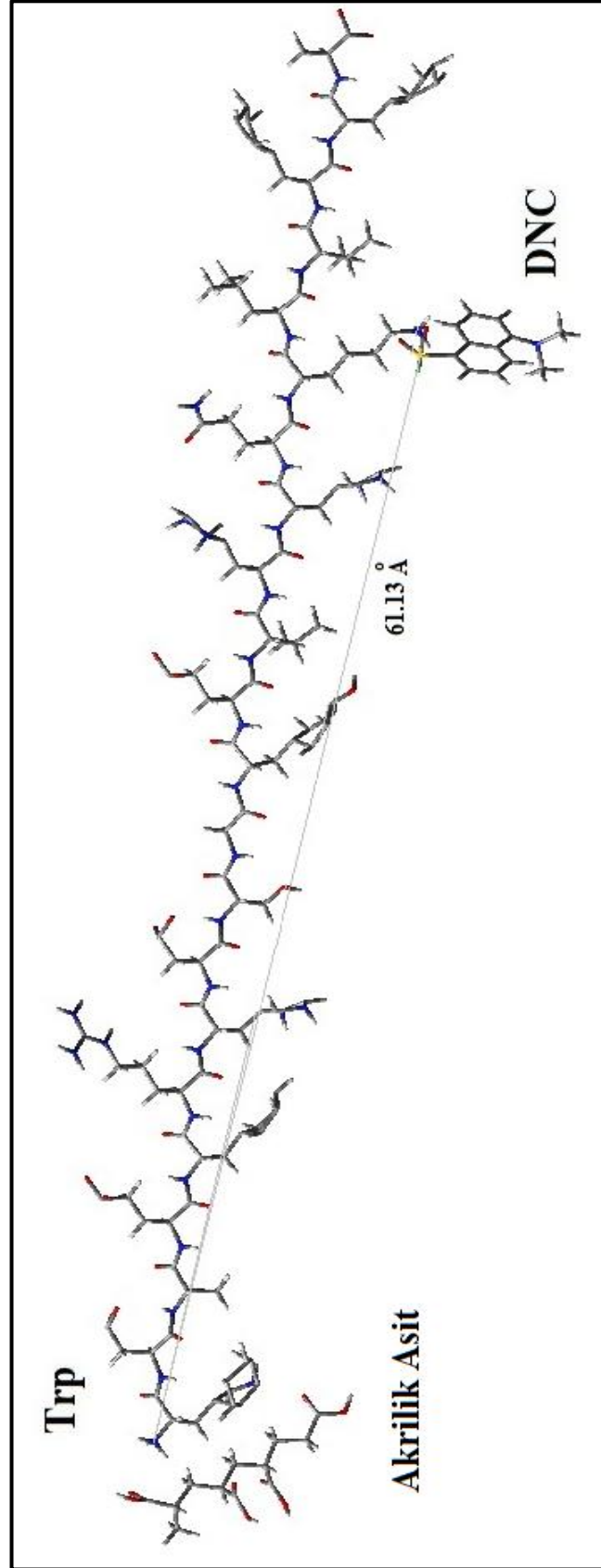
Şekil 4.96 Aβ (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklenmesi ve optimizasyon
öncesindeki geometrisinin modellemesi



Şekil 4.97 Aβ (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklenmesi ve optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellenmesi



Şekil 4.98 Aβ (1-21) peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten ve optimizasyonundan önceki geometrisinin modellenmesi

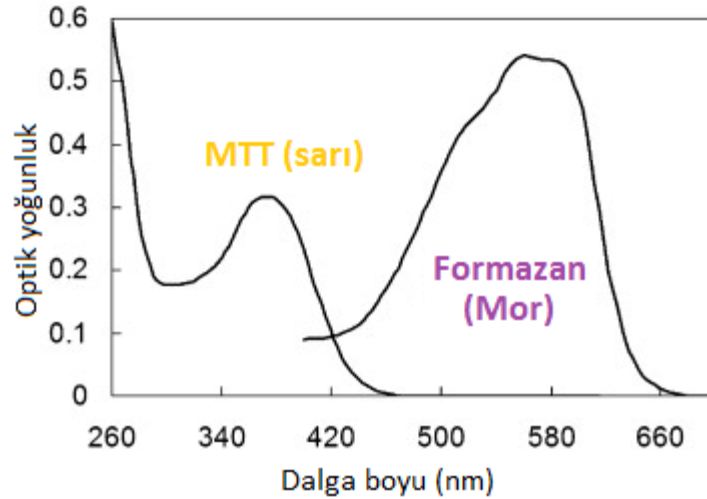


Şekil 4.99 Aβ (1-21) peptid dizisinin akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü eklendikten ve optimizasyonundan sonraki geometrisinin modellemesi

4.13 Hücre Deneyleri

4.13.1 MTT Deneyi

3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) testi, kültürlerine uygulanan farklı deneysel prosedürlerin veya kimyasalların sitotoksik etkilerinin in vitro etkilerini gözlemleyebilmek veya karşılaştırma yapabilmek amacıyla yaygın olarak kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir [189]. Temel olarak bu yöntem ile, hücre canlılığının ve proliferasyonunun uygulanan kimyasal ajan konsantrasyonuna bağlı değişimi ölçülür. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerin mitokondriyel enzimleri ile indirgenir ve reaksiyon sonucunda suda çözünmeyen mor renkli kristaller oluşur [190].



Şekil 4.100 MTT'nin Formazan'a dönüşümü [191]

Bu kristallerin organik çözücüler (SDS, DMSO, izopropanol gibi) eklenerek çözünmesiyle oluşan renk değişikliği, 570 nm dalga boyundaki optikal yoğunluğun ölçülmesiyle tayin edilir. MTT testinde sitotoksosite arttıkça formazan oluşumu azalmakta, renk açılmakta yani ölçülen optik yoğunluk da azalmaktadır. Hücre proliferasyonunun konsantrasyona bağlı eğrisinden hücrelerin %50'sinin canlı olduğu konsantrasyon (IC_{50}) hesaplanır.

4.13.2 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 içerisindeki 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) içerisinde yeni flaska ekilip, 37°C %5 CO₂ etüvüne kaldırıldı.

4.13.3 Amiloid β Peptidi (1-21) Dizisinin PAA ile Biyokonjugatlarının Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

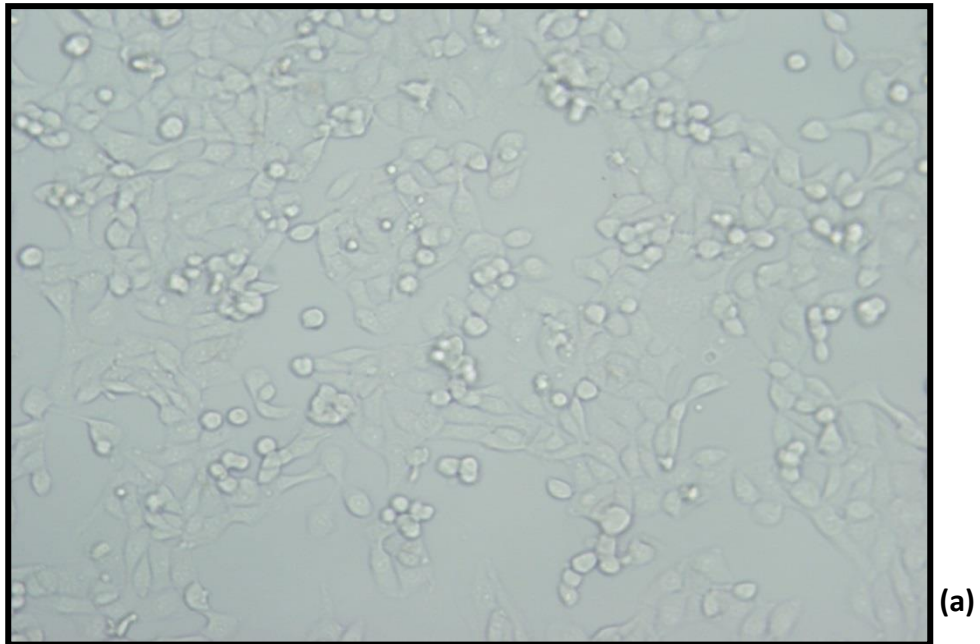
Sentezlenen Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından farklı konsantrasyonlarda peptid içeren, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ ve $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ oranları seçilmiş ve bu biyokonjugatların MCF 7 meme kanseri hücrelerindeki toksisitesi MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 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 Amiloid β peptidi (1-21) dizisinin PAA ile yapılan 2 farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranındaki biyokonjugatları 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 μ l eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 μ l eklendi 30 dakika oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözünüp çözünmediği kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave

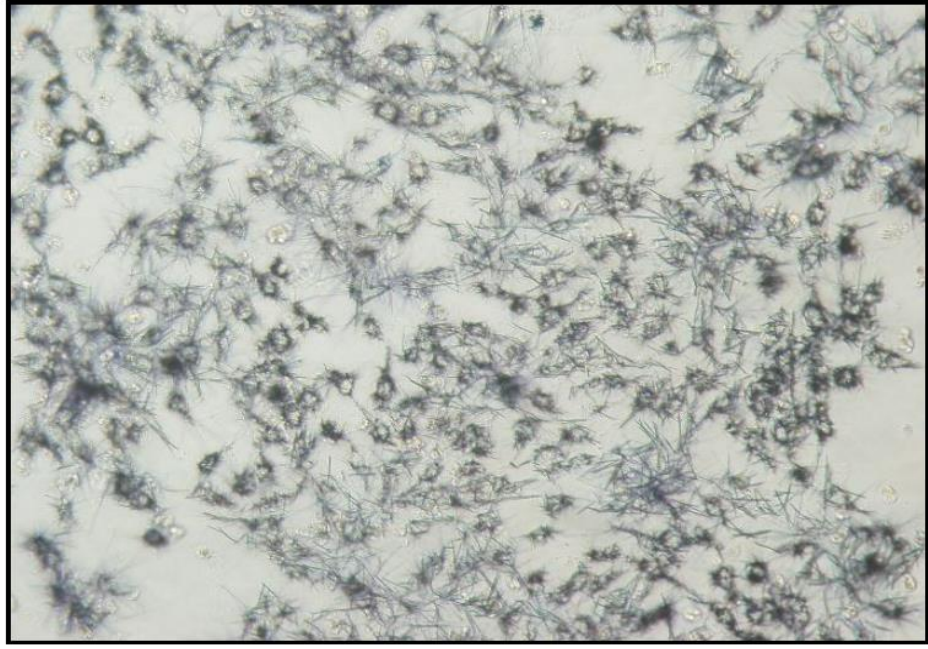
edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm’de dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon aralığı birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır. Bileşiklerle muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak aşağıda belirtilen formül yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ canlı hücre} = \frac{(\text{bileşik muamele edilen hücre absorbanası}) - (\text{boş kuyucuğun absorbanası})}{(\text{kontrol hücre absorbanası}) - (\text{boş kuyucuğun absorbanası})} \times 100$$

4.13.4 Morfolojik İnceleme

Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ ve $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ oranlarındaki konjugatlarının MCF7 hucrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskopik olarak incelendi. Kontrol grubu olan kuyulardaki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlemlendi.

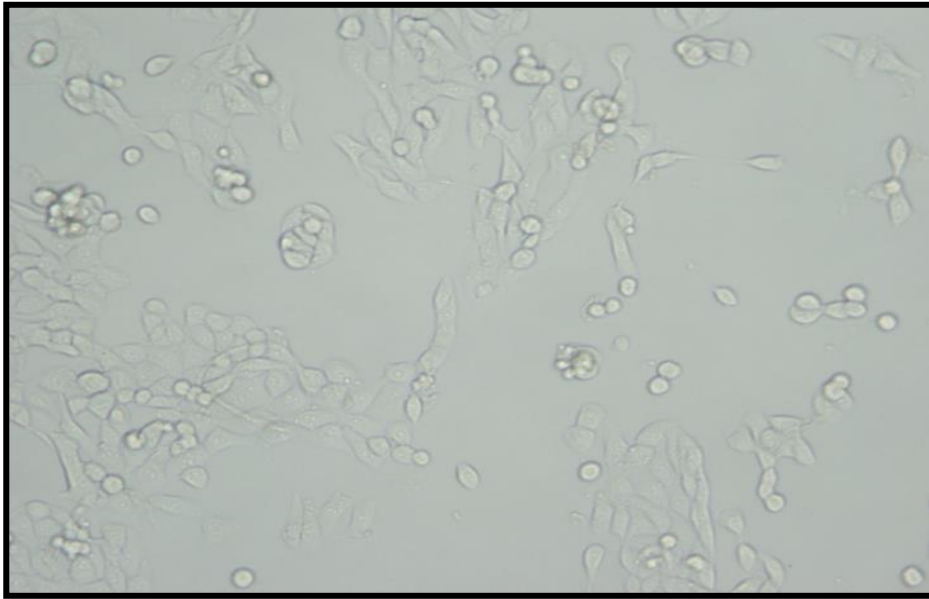




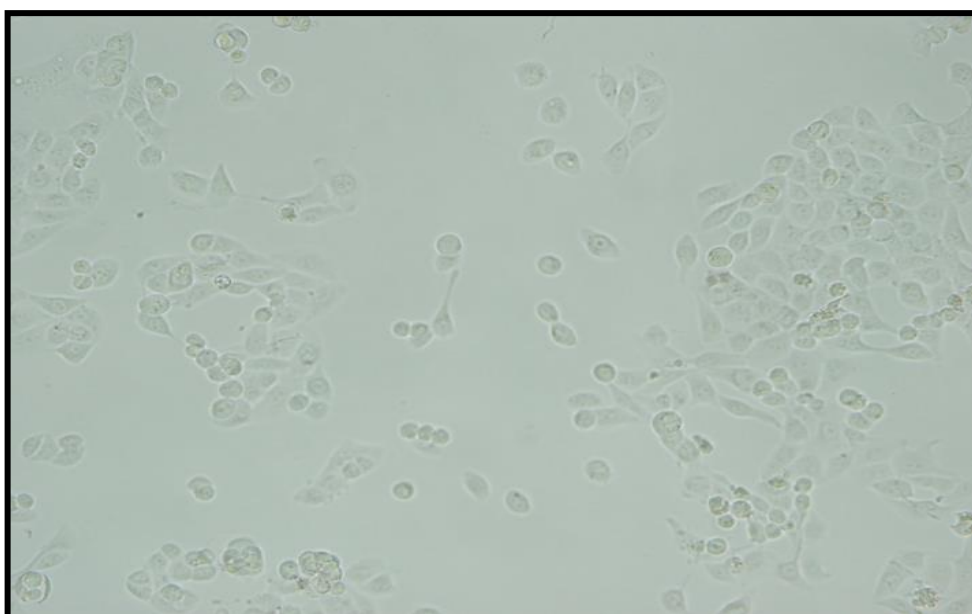
(b)

Şekil 4.101 Kontrol grubundaki MCF 7 hücrelerinde **(a)** 24 saatlik inkubasyonu sonucu oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi **(b)** Kontrol grubundaki MCF7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu

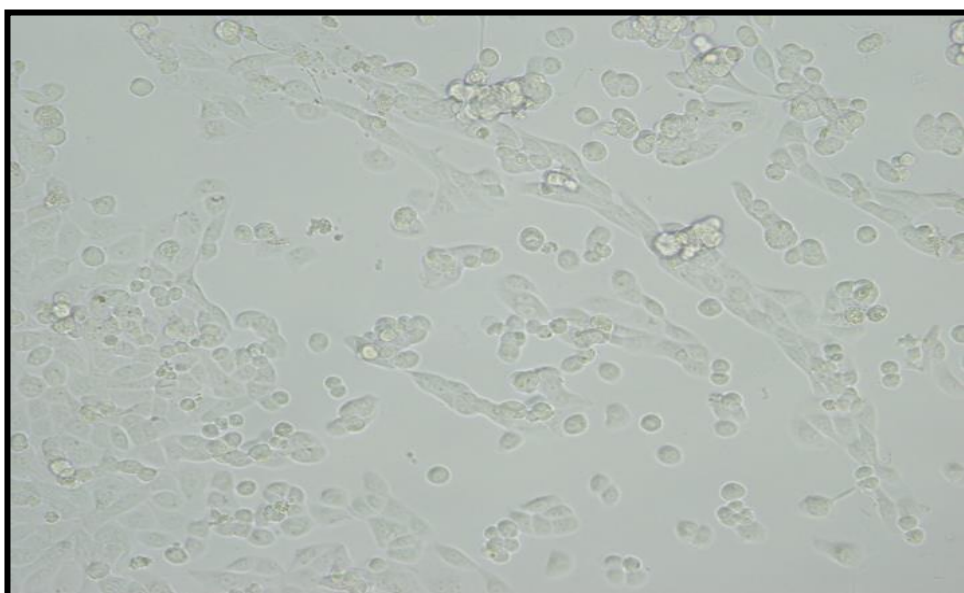
Aşağıdaki mikroskopik görüntüler ile, PAA-Peptid $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ biyokonjugatın değişik konsantrasyonlarının (0.05 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.5 mg/mL, 5 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.



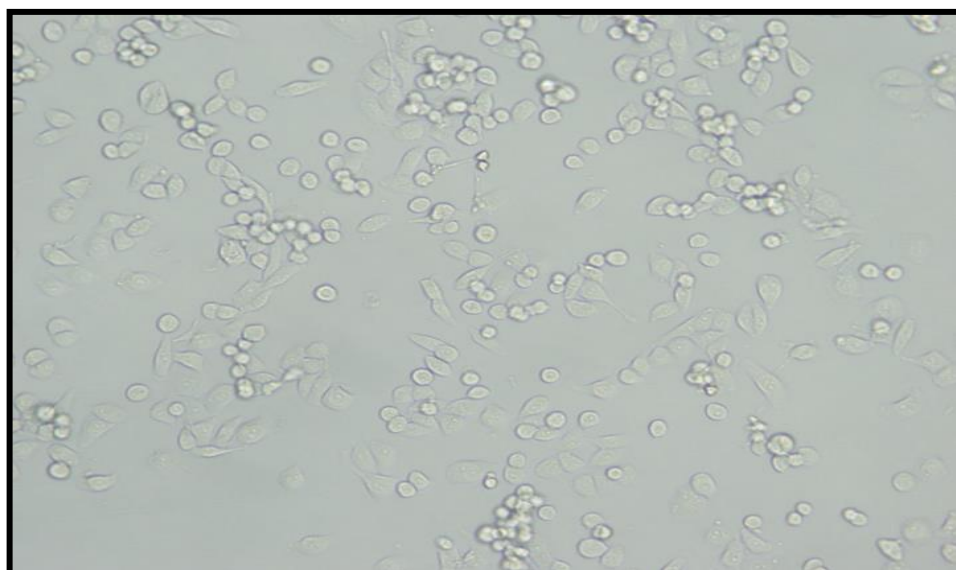
(a)



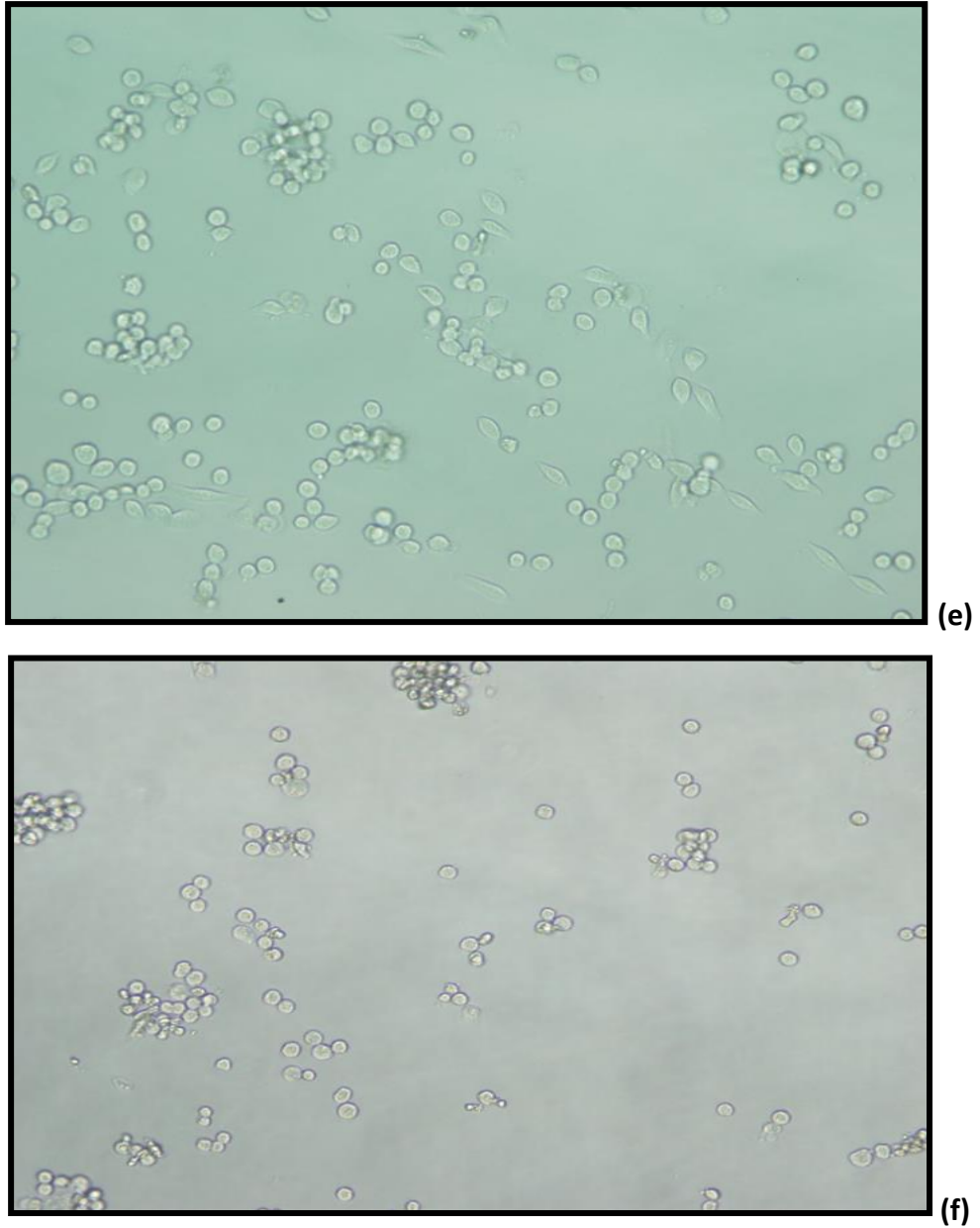
(b)



(c)

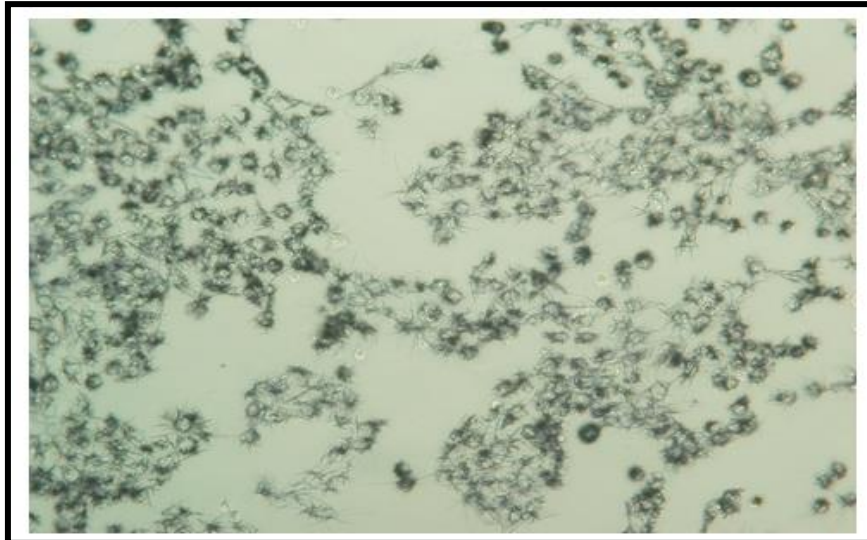


(d)

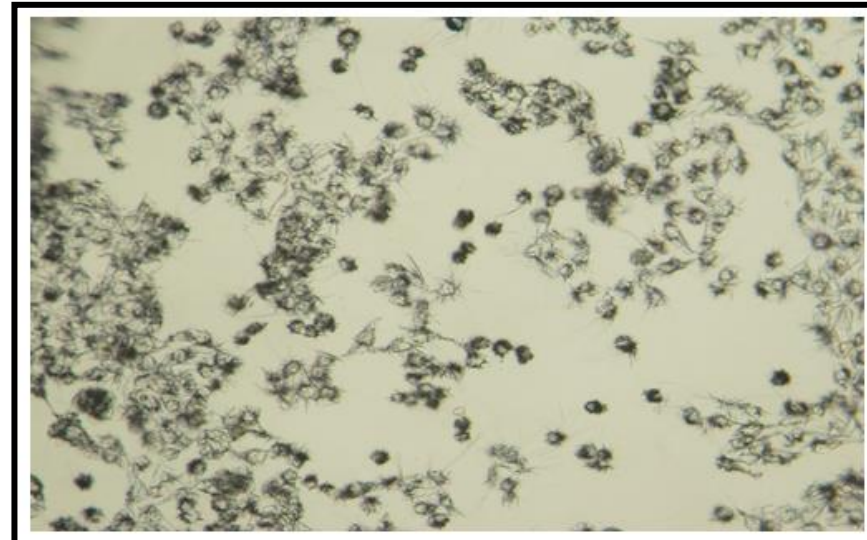


Şekil 4.102 Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3'$ ün farklı konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x); (a) 0,05 mg/mL, (b) 0.5 mg/mL, (c) 1 mg/mL, (d) 2.5 mg/mL, (e) 3.5 mg/mL, (f) 5 mg/mL

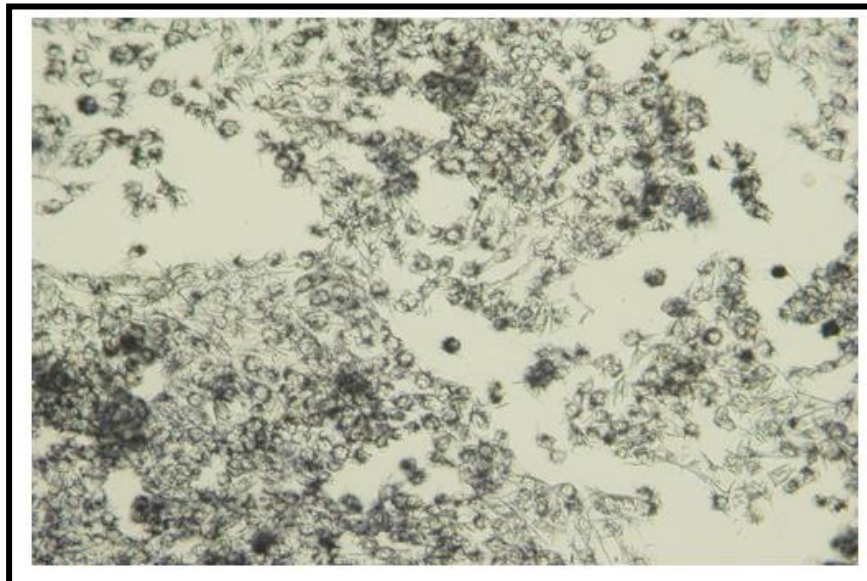
MTT solüsyonu Şekil 4.52'de morfolojileri incelenen bu kuyucuklara eklendikten 24 sonra hücrelerin, MTT ile etkileşmesi sonucu meydana getirdiği değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi.



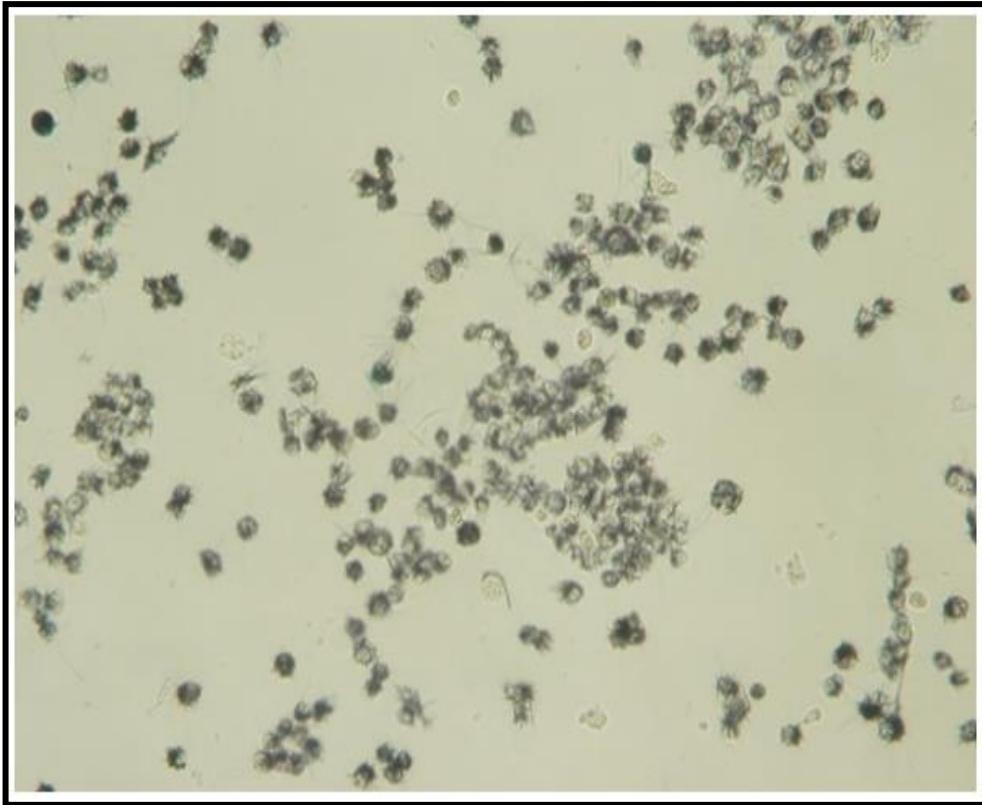
(a)



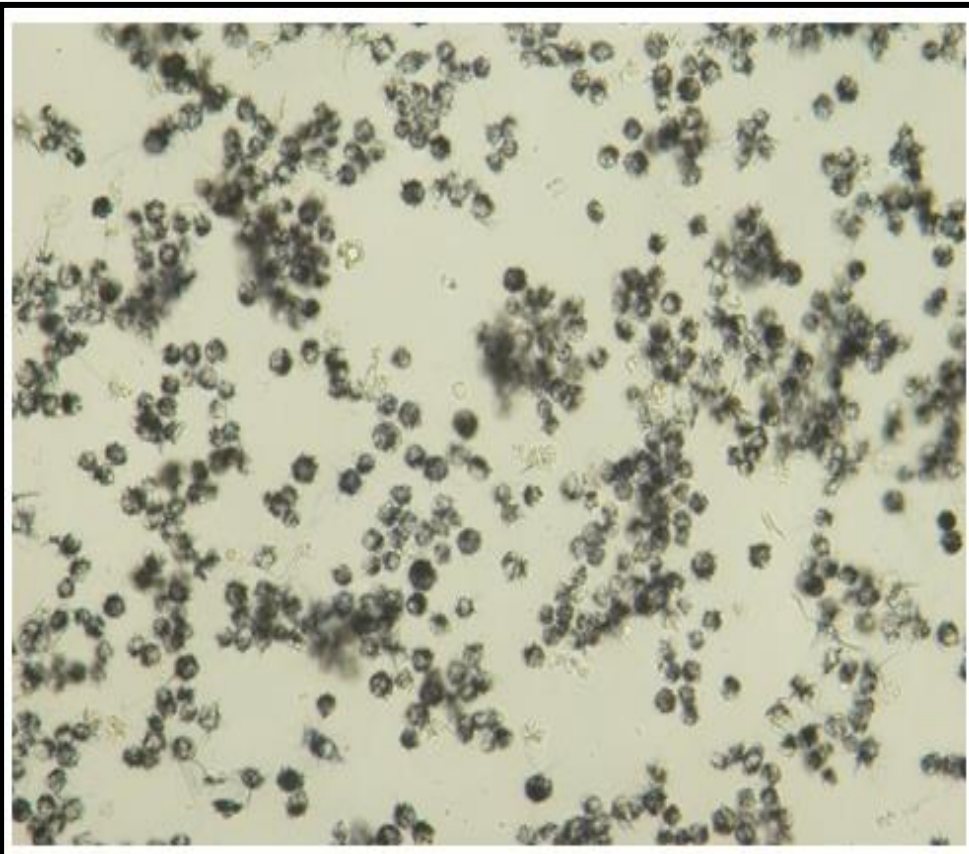
(b)



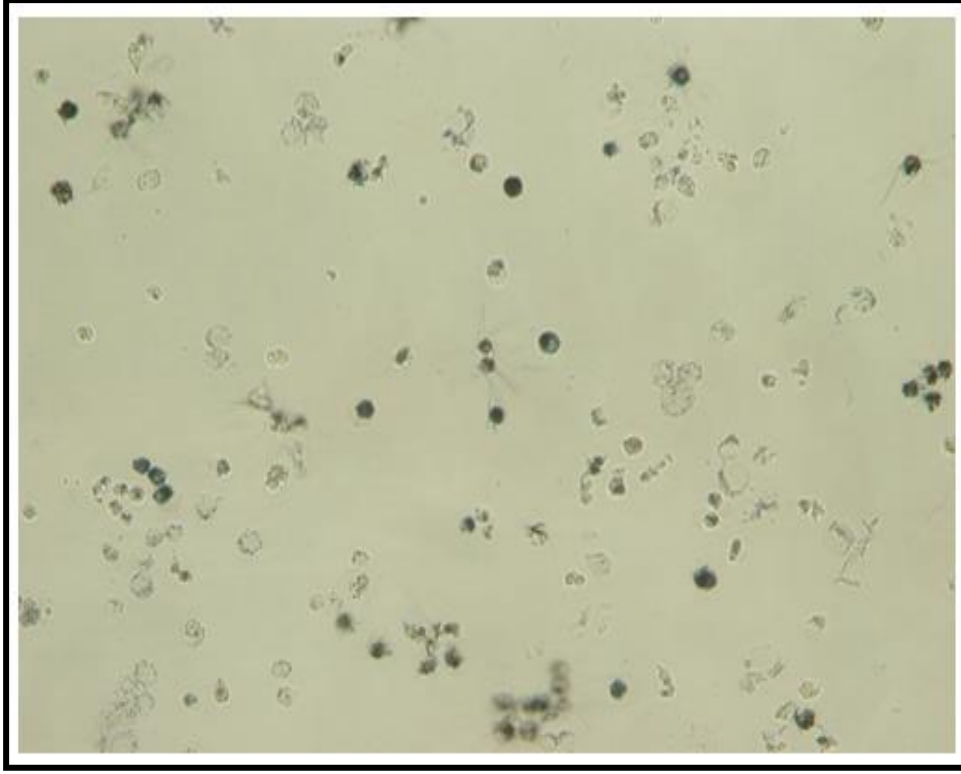
(c)



(d)



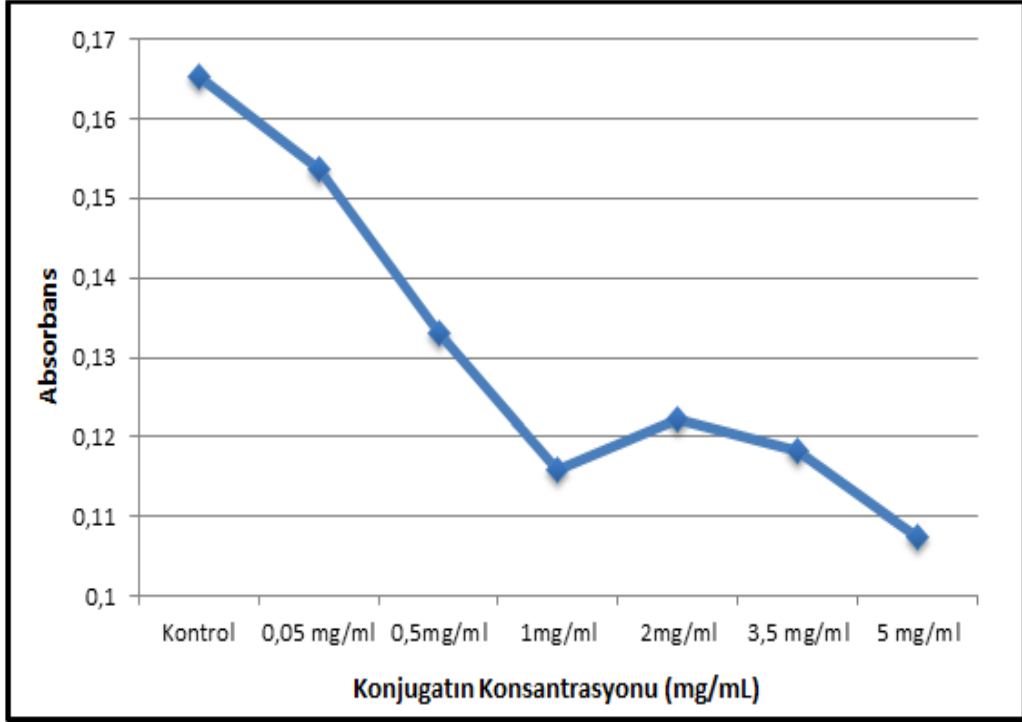
(e)



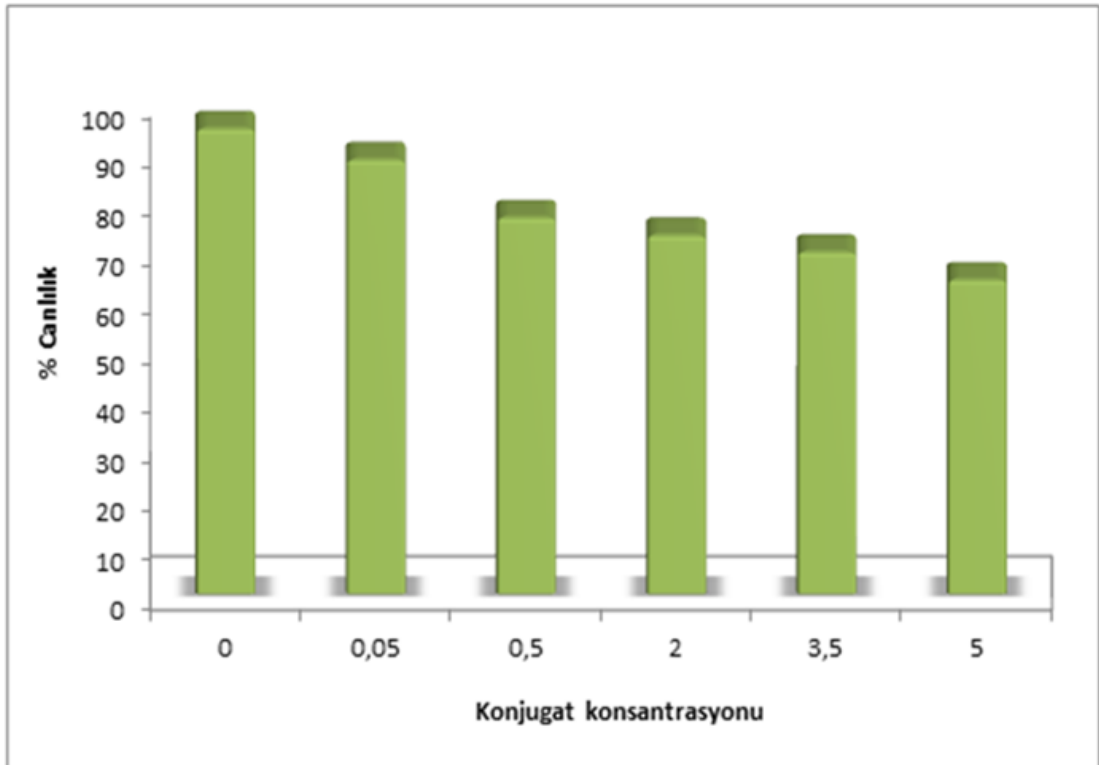
(f)

Şekil 4.103 Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ konsantrasyonuna maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (a) 0,05 mg/mL, (b) 0.5 mg/mL, (c) 1 mg/mL, (d) 2.5 mg/mL, (e) 3.5 mg/mL, (f) 5 mg/mL

Mikroplaktaki kuyucuklarında formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol ve konjugatların farklı konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan kuyucukların 570 nm'deki absorbans değerlerinin ortalamaları (herbir konsantrasyon için 5 kuyu) alınarak % canlılık hesaplandı.

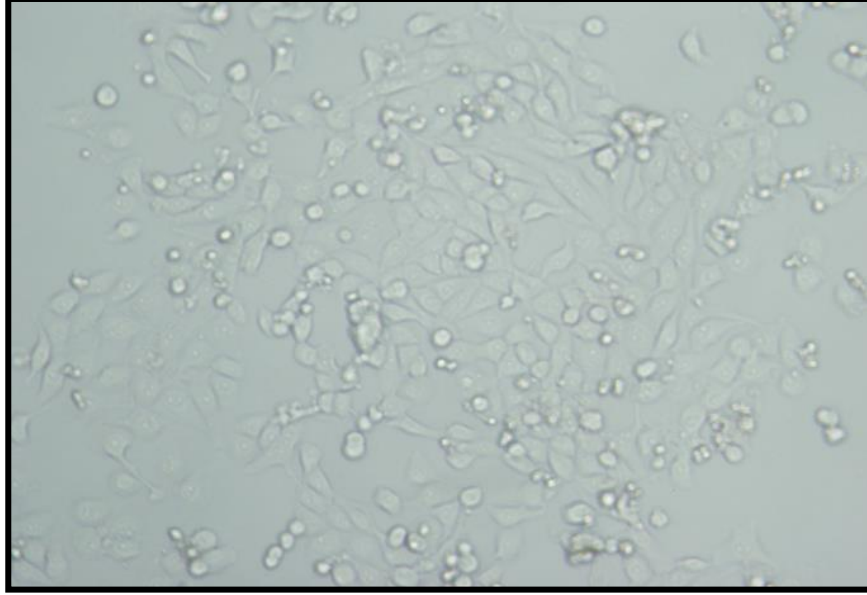


Şekil 4.104 MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=3'ün farklı konsantrasyonundaki absorbans değerlerine bağlı grafiği

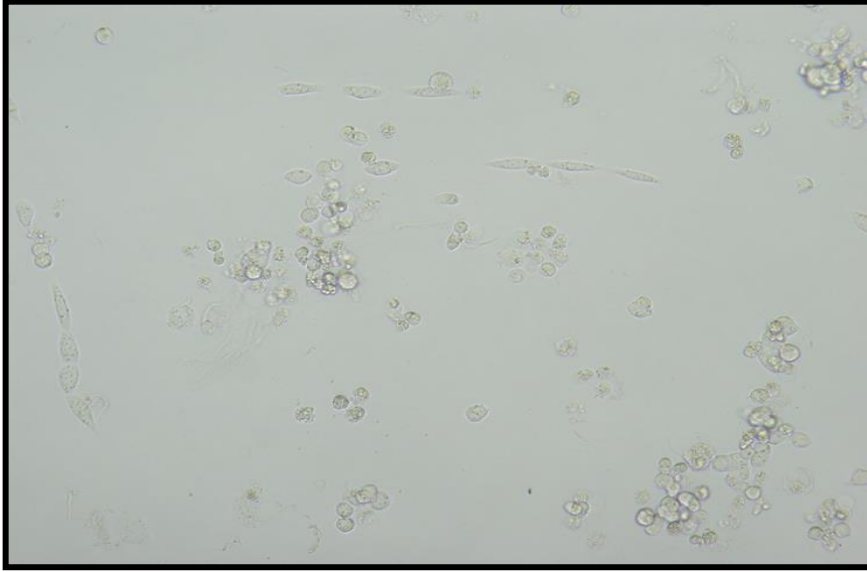


Şekil 4.105 MCF 7 hücrelerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği

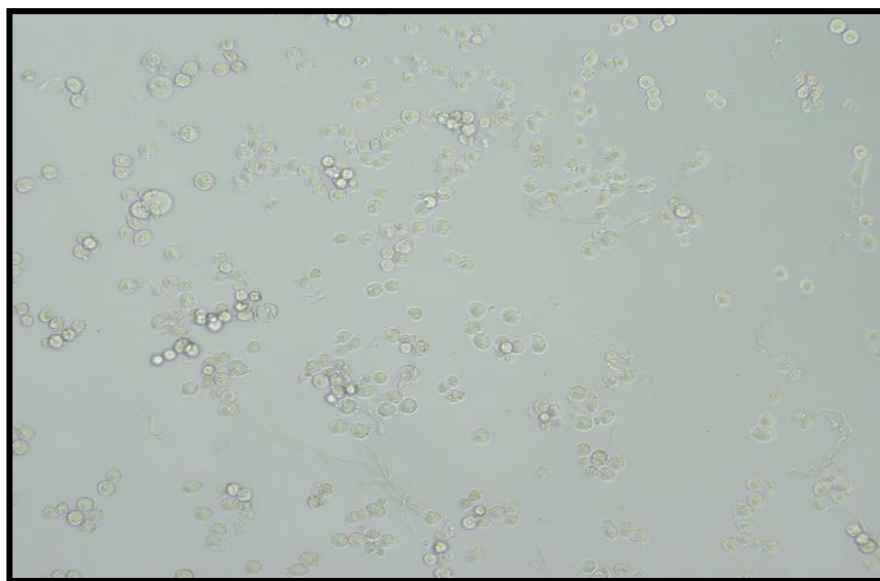
Aşağıdaki mikroskopik görüntüler ile, PAA-Peptid $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ biyokonjugatın değişik konsantrasyonlarının (0.05 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.5 mg/mL, 5 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.



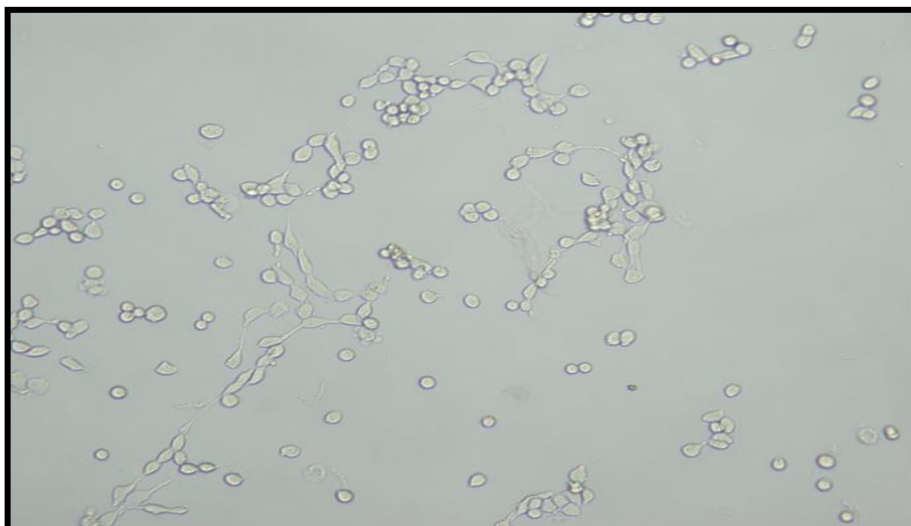
(a)



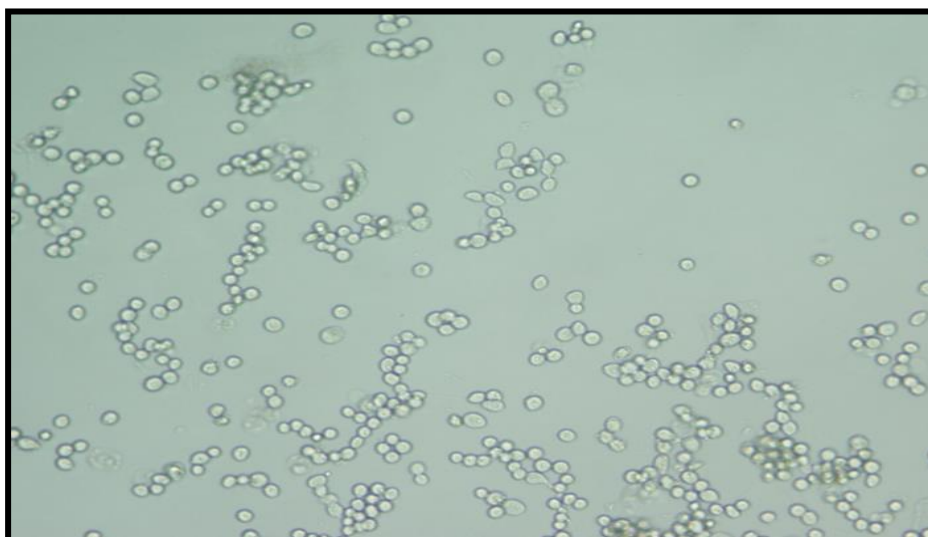
(b)



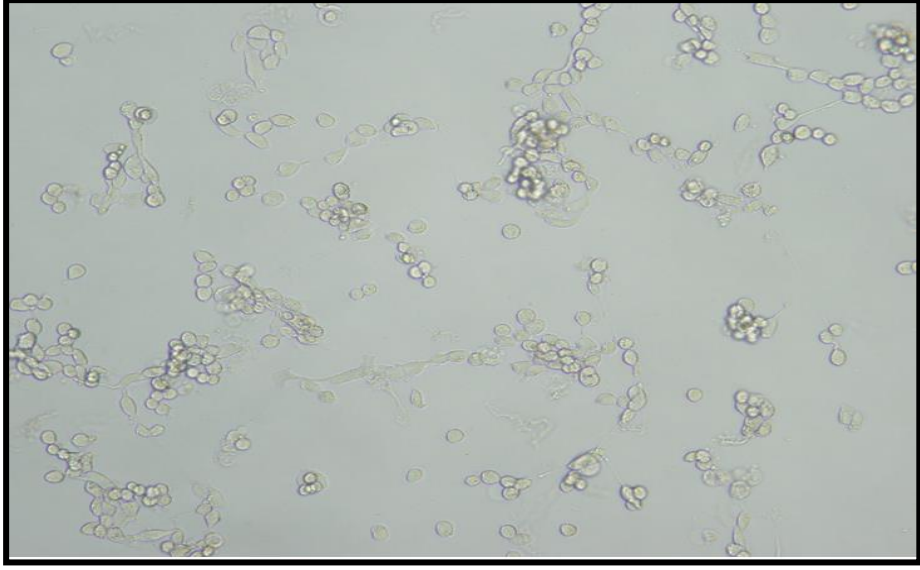
(c)



(d)

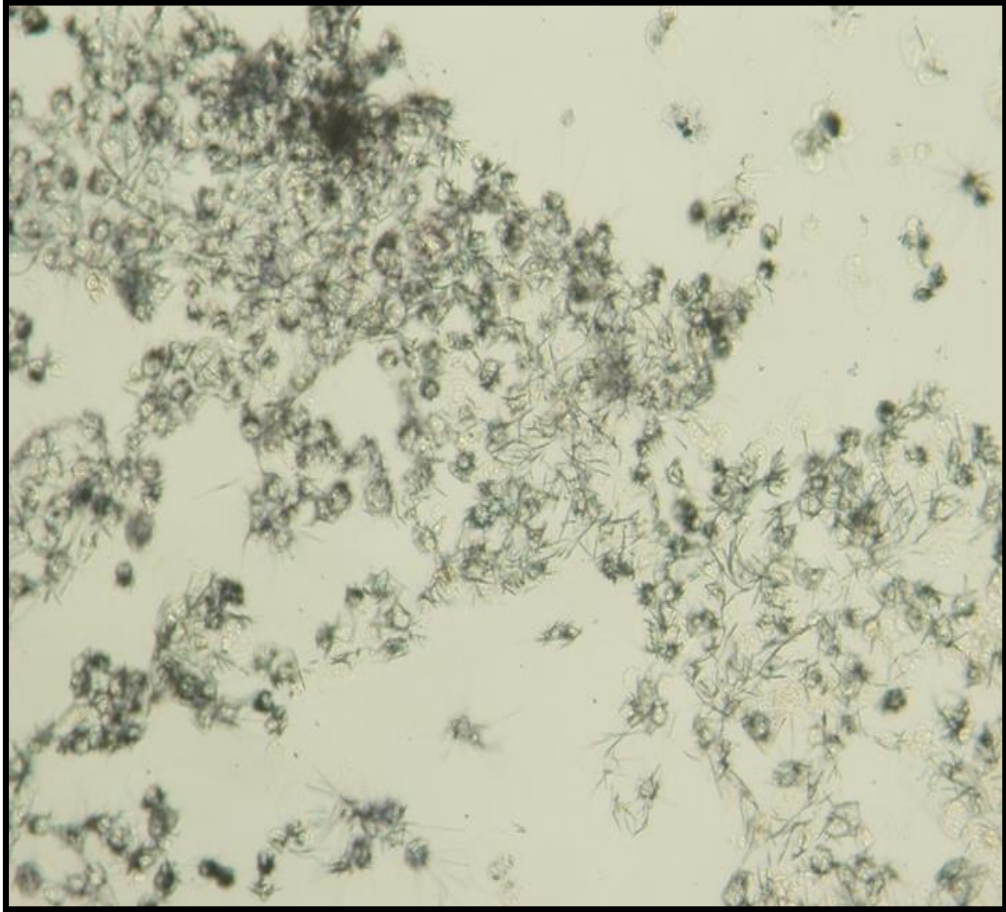


(e)

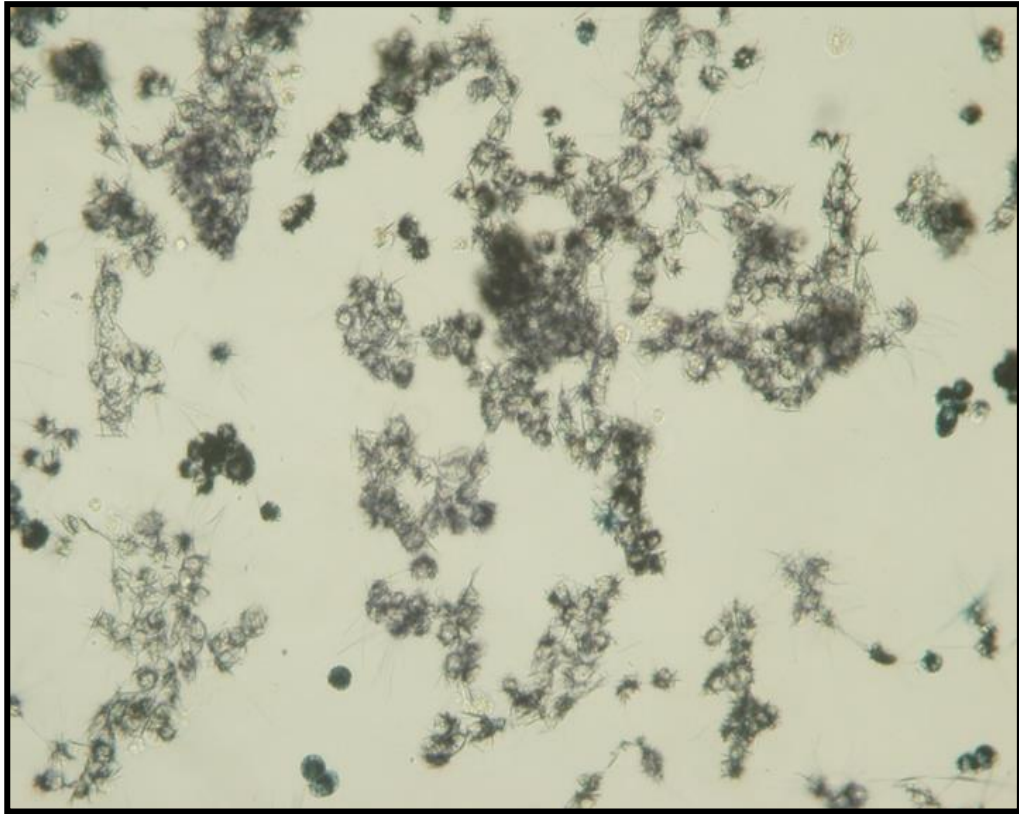


(f)

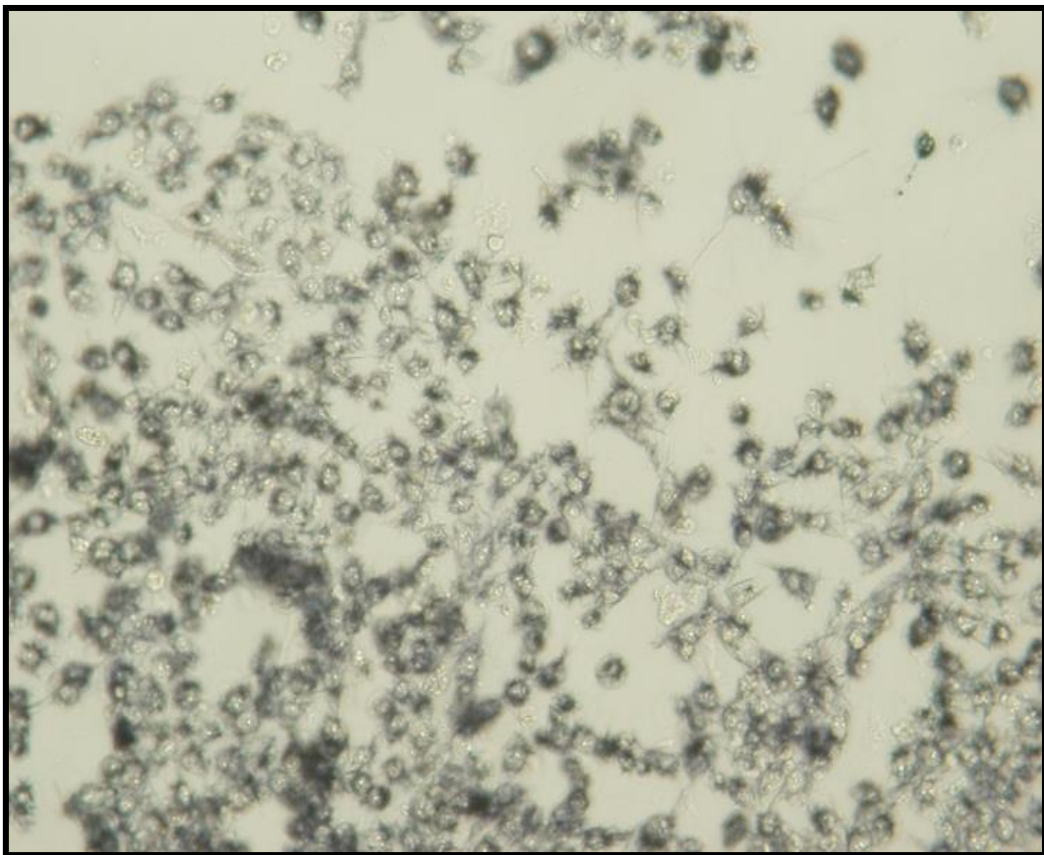
Şekil 4.106 Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ 'in farklı konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi (20x); (a) 0,05 mg/mL, (b) 0.5 mg/mL, (c) 1 mg/mL, (d) 2.5 mg/mL, (e) 3.5 mg/mL, (f) 5 mg/mL



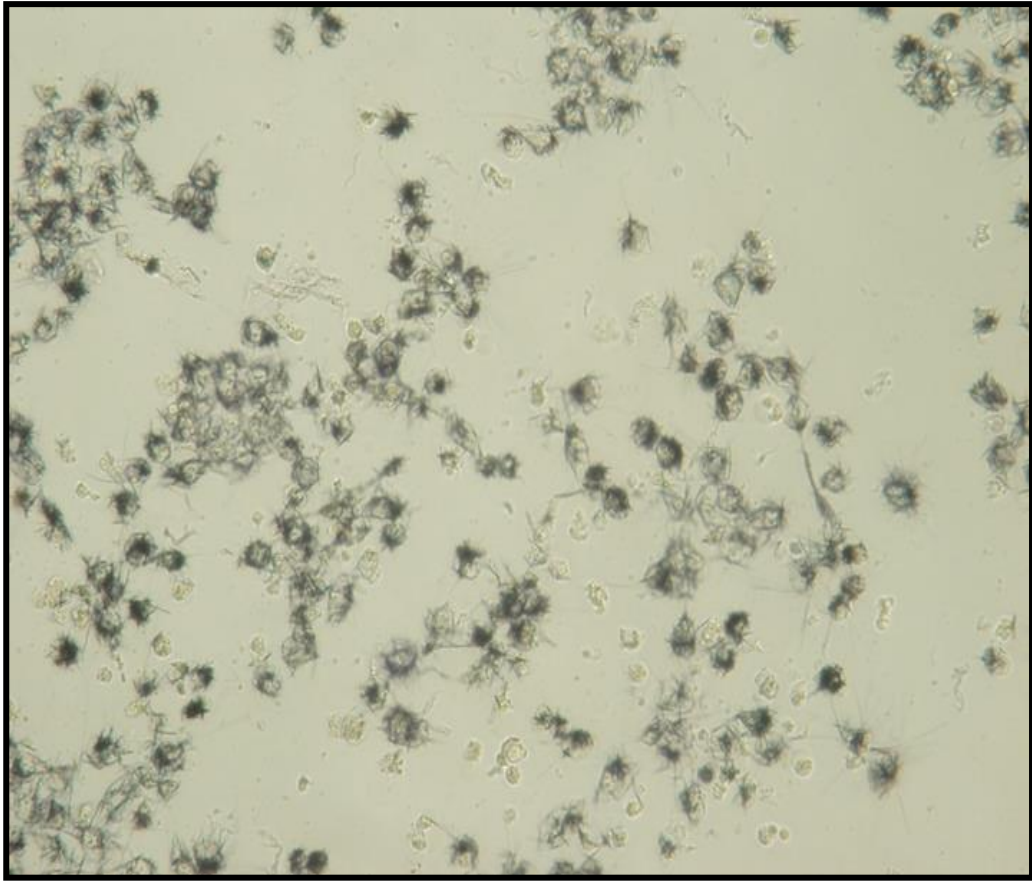
(a)



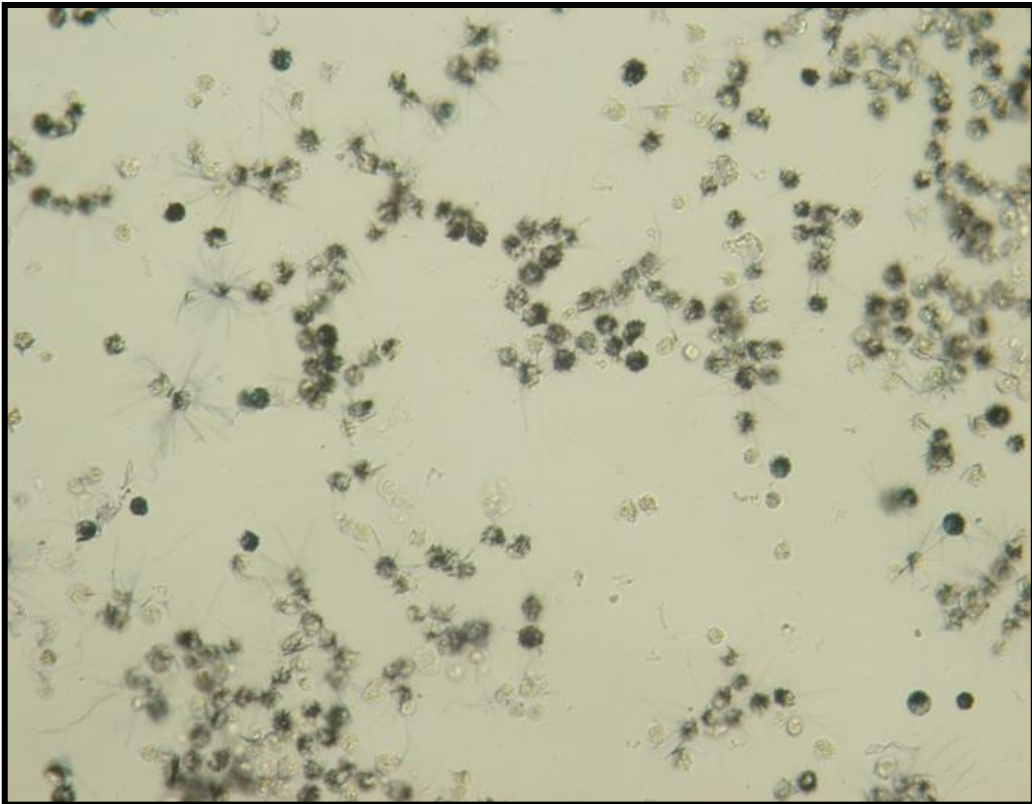
(b)



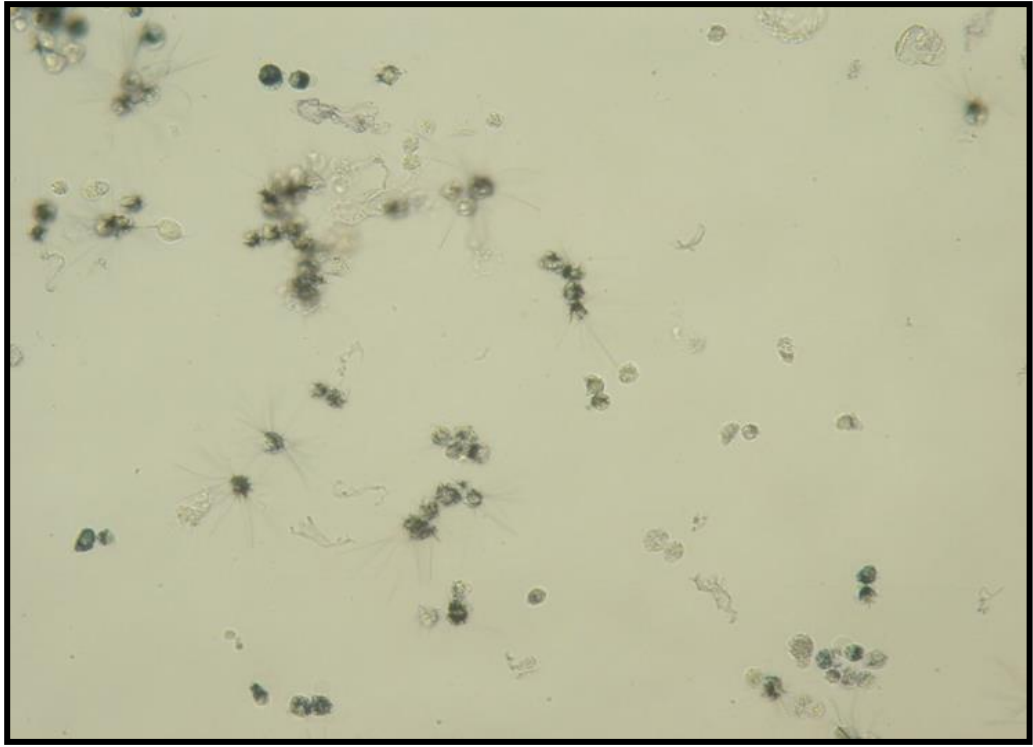
(c)



(d)

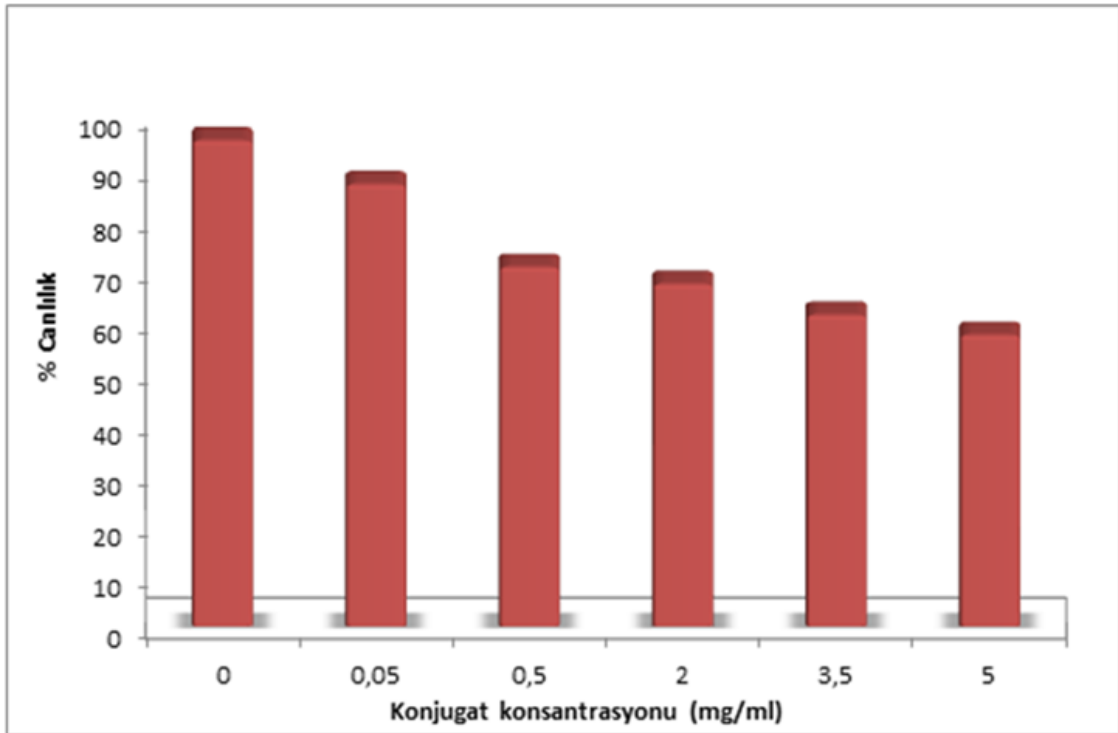


(e)

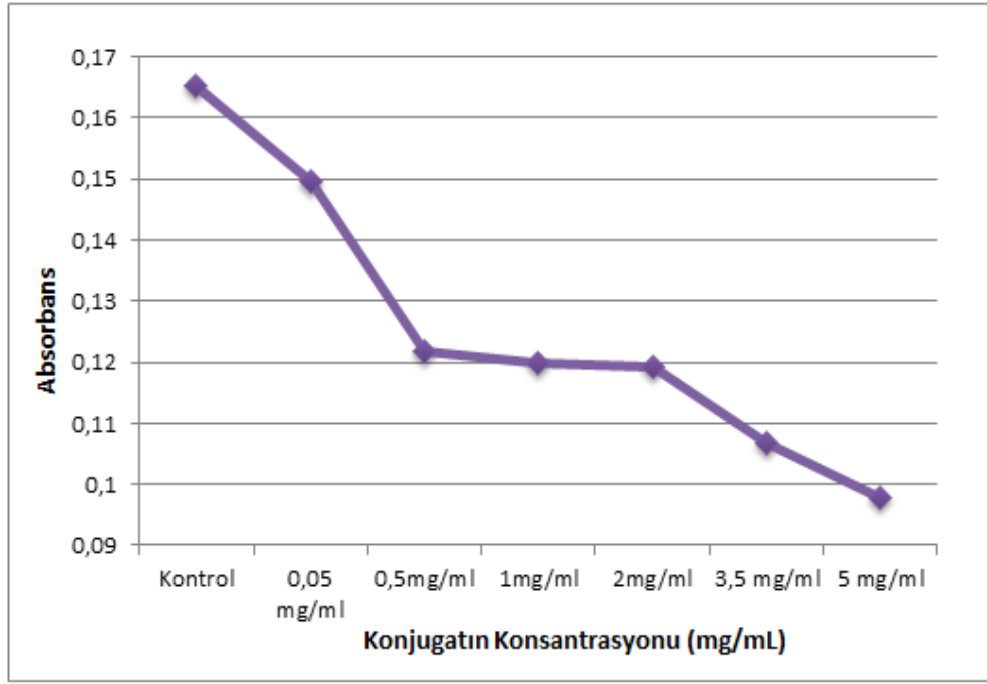


(f)

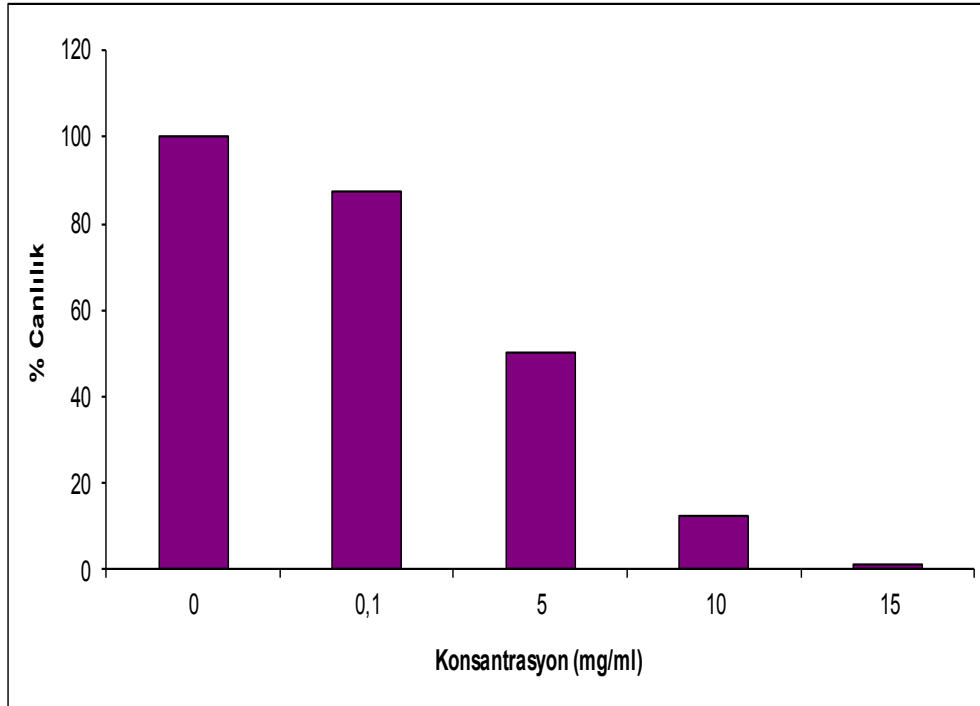
Şekil 4.107 Amiloid β (1-21) peptidi/PAA biyokonjugatlarından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ konsantrasyonuna maruz kalmış MCF 7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu (a) 0,05 mg/mL, (b) 0.5 mg/mL, (c) 1 mg/mL, (d) 2.5 mg/mL, (e) 3.5 mg/mL, (f) 5 mg/mL



Şekil 4.108 MCF 7 hücrelerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği



Şekil 4.109 MCF 7 hücrelerinin npeptid/nPAA=11'in farklı konsantrasyonundaki absorbans değerlerine bağlı grafiği



Şekil 4.110 Poliakrilik asitin 0.1-5-10-15 mg/ml konsantrasyonlarında toksisitesi [192]

Yapılan ölçümlerde $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ 'ün ve $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ 'in farklı konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerinin canlılık oranları Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerinin canlılık oranları

DOZ (mg/mL)	% CANLILIK	
	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$
0.05	92.9	90.4
0.5	80.4	73.6
2	73.5	72.1
3.5	71.5	64.5
5	64.9	59.1

4.13.5 Sentezlenen Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerin İnsan Kordon

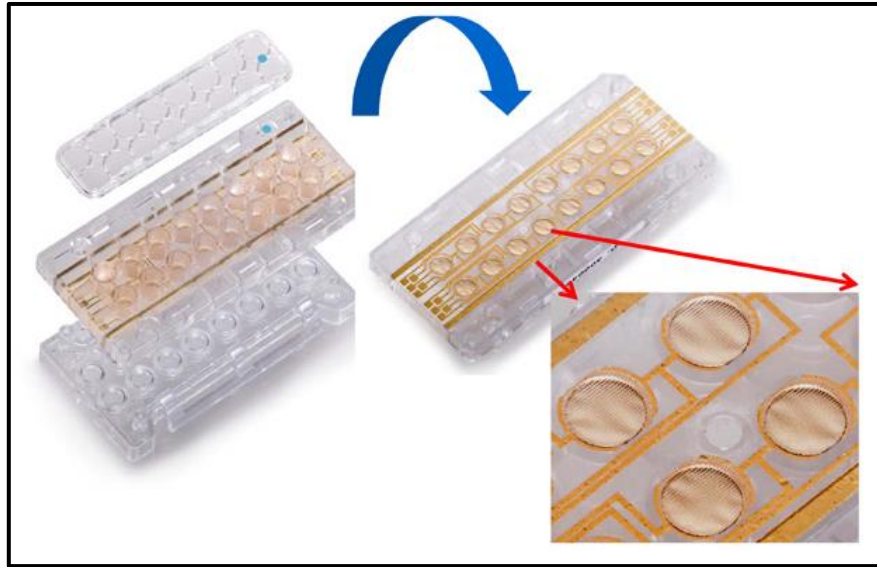
Toplardamar Endotel Hücreleri (HUVEC)'ndeki Etkilerinin xCELLieng System ile İncelenmesi

Literatüre göre, yapılan ilaç etkinlik testleri ya da ilaç geliştirme çalışmalarının %70'i hücre temelli testler olduğu bildirilmektedir[174]. Bu hücre temelli yoğun çalışmalar gelişmiş ve protokolleri oturtulmuş kültür şartlarına ihtiyaç duymaktadır. Farmasötik çalışmalarda yenilikçi yaklaşımların kullanımı dünyada yaygınlaşmaktadır [175]. Aslında, bu yaklaşımlar ilk aşamada prediktif bilgiyi sağlamakla beraber, etkinlik ve güvenlik anlamında yıpranma oranını düşürmekte ve aday bileşiklerle ilgili testlerin maliyetlerini büyük oranda düşürebileceği belirtilmektedir [175]. Label-free teknolojilerin biyoloji ve ilaç Ar-ge çalışmalarında uygulanması gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Akustik rezonans, elektriksel impedans, mikrokantileverler, nanotüpler ve diferansiyel kalorimetrliler temelli platformların da ortaya çıkmasıyla beraber ticari olarak temin edilebilen yüksek hassasiyetli anlık takip çalışmaları yapılabilmektedir [176]. Buna ek olarak, label-free teknolojilerin yenilikçi ve amaca uygun modellerin kullanımı insan örneklerinin güvenliği ve duyarlılığını arttırmada önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [177]. Sonuç olarak, ilaç ar-ge çalışmalarında yüksek verimli görüntüleme testlerinin uygulanması biyolojik mekanizmaların daha doğru bir şekilde aydınlatılması adına oldukça büyük bir öneme sahiptir [178]. Non invaziv ölçüm

yapılabilmesi, homojen test formatı, normal hücre fonksiyonlarıyla daha az etkileşim, kinetik ölçüm yapılabilmesi ve test zamanının daha düşük olması Label-free teknolojinin avantajlarının arasında yer almaktadır [179]. Gerçek zamanlı hücre analizörü (Real-time cell analyzer, RTCA) metodolojisi bu yeni label-free teknolojiler arasında olmakla beraber empedans ölçümü temelli çalışabilmektedir. RTCA hücre proliferasyonu, migrasyonu, sitotoksitesi ve reseptör aracılı sinyallerin incelenmesi gibi farklı hücresel prosesleri hakkında bilgi verirken, hücre morfolojisi ve adezyonundaki oldukça spesifik ve iyi tanımlanmış değişiklikleri inceleme fırsatı vermektedir [177]. Birden fazla cinsteki elemanın (direnç, bobin, kondansatör) seri, paralel veya seri- paralel bağlanması ile oluşturulan alternatif akım devresinin yerine geçebilecek aynı özellikleri verebilen tek bir eşdeğer dirence " empedans " denir. Empedansın hücresel okumalarda kullanımı 1993 yılında Giaever ve Keese tarafından açıklanmıştır [180]. Kısacası, empedans temelli bir platform olan xCELLigence (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) cihazında litografik teknikler kullanılarak, kuyucukların tabanlarına sabitlenmiş altın elektrotlar ve bunların üzerinde yapışan hücrelerin empedansı ölçülmektedir. Ortamda elektrolitlerinin varlığında 1 μ A kadar küçük bir alternatif akımın uygulanması elektrotlar ile var olan hücreler arasında bir elektriksel alanın oluşmasını sağlamaktadır. Empedansı etkileyen faktörler arasında, kuyucuklara ekilmiş hücre sayısı, hücrelerin etkileşimi, hücrelerin elektrotlar ile etkileşim kalitesi ve toplam hücre morfolojisi olarak belirtilmektedir [180]. Empedans temelli label-free teknolojinin bir çok avantaja sahip olmasına rağmen pek çok teknoloji gibi bazı kısıtlamaları da mevcuttur. Örnek olarak, yapışmayan hücreler altın elektrotlar ile bağlantı kurmadıkları için empedansın ölçümü mümkün olmamaktadır. Buna ek olarak, RTCA profillerinin analizlerini zorlaştırabilecek bazı faktörler de olabilmektedir [177]. Sonuç olarak, klasik toksisite test değerleri ile hücresel empedans ölçümleri arasında iyi bir korelasyon kurabilmek için daha fazla veriye ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. xCELLigence platformu üzerinde babun serumlarının domuz hücreleri üzerindeki immünotoksik etkilerinin zenotransplantasyon kapsamında test edildiği [181], insan gingival fibroblastlarının [182] ve fare embriyonik kök hücreler [183] üzerinde dental kompazit bileşeni olan okadiak asidin sitotoksitesinin ölçümü gibi güncel çalışmalar bulunmaktadır. Kirstein ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hücre temelli çalışmalarda yaşayan hücrelerin kalitesi, gerçek zamanlı hücre elektronik ölçüm

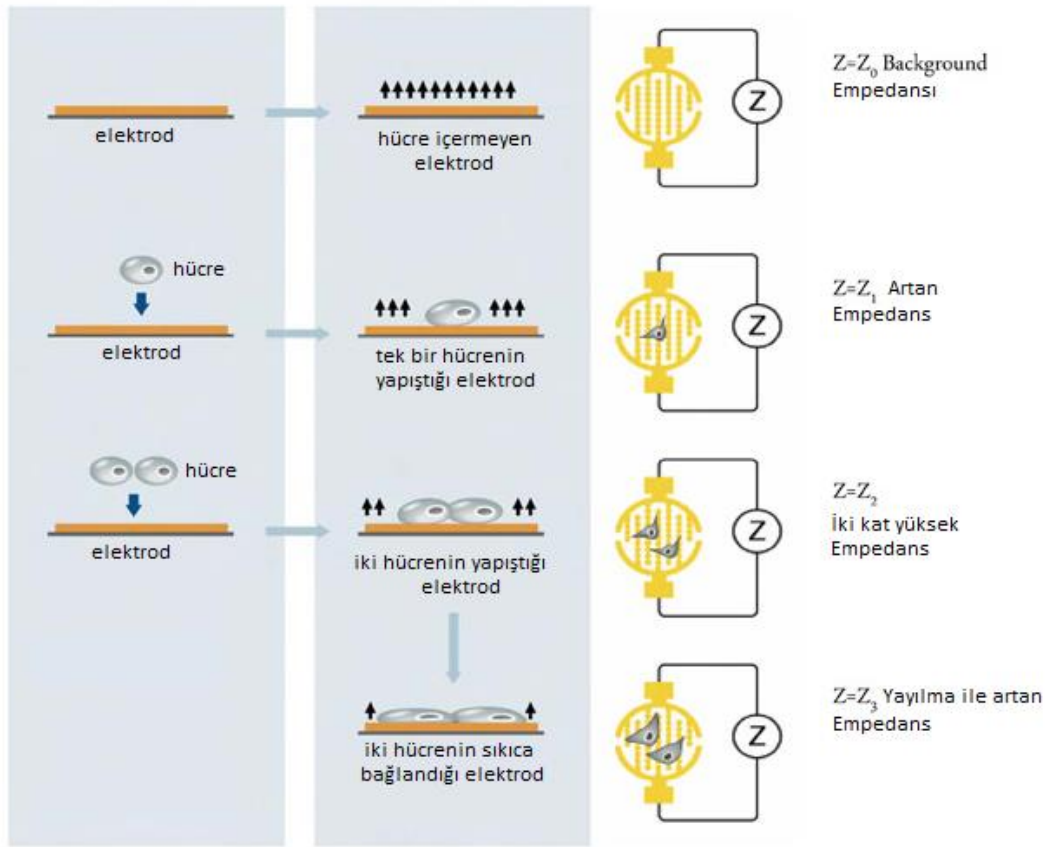
sisteminin kullanılması incelenmiştir. Araştırmacılar RTCA'nın tek-nokta testlerinde yüksek kalitede verilerin elde edilebildiğini belirtmişlerdir [174]. Daha güncel bir çalışma olarak, araştırmacılar hücre yoğunluğunu iki akciğer epitel hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatler arasında incelemişlerdir [184]. Buna benzer şekilde, hücre yoğunluğunun hücre indeksi üzerindeki etkileri insan gingival fibroblastlarında [182], iki tip trofoblast hücrelerinde [181], keratinosit ve fibroblast hücrelerinde [185] incelenmiştir. Sonuç olarak, RTCA ile ilgili yayınların büyük çoğunluğu bileşenlerin farmakolojide ya da toksisite çalışmalarında empedans ölçümü üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu yöntem hücre-esaslı mikroelettronik bir biyosensör sistemdir. Bu sistem, eş zamanlı, işaretlemeye gerek duyulmaksızın hücre analizi ve ilaç geliştirmek, toksikoloji, kanser çalışmaları, medikal mikrobiyoloji ve viroloji gibi çok sayıda uygulamanın bir arada yapılabilmesine olanak sağlar.

Gerçek zamanlı olarak hücre empedansını ölçmekte kullanılan E-Plate 96 (Roche), 96 kuyucuk içerir ve bu sistemin temelini oluşturur [182]. E-Plate 96, tek kullanımlık olup, her bir kuyucuğun en alt kısmında Altın (Au)'dan yapılmış mikroeletrod sensör bulunur ve bu elektrod ile yapılan gerçek zamanlı elektriksel empedans değerleri ile, hücre sayısındaki değişim, hücre büyümesi ve ölümü ya da hücrelerin morfolojilerindeki farklılaşmalar gibi değişimler ölçülebilir [186].



Şekil 4.111 xCELLienge Sistemine ait 96 kuyucuklu e Plate 96 [186]

Hücre kaplama ve hücre yoğunluğunun en iyi kombinasyonu iki önemli kritere göre seçilmelidir. İlki, herhangi bir deneye başlamadan önce, cihaz üreticisinin (Roche Diagnostics) önerdiği gibi, hücre indeksi en az 0.5, ideal olarak ise 1 ya da daha yüksek olmalıdır. İkinci olarak da kullanılacak hücre sayısı hücre indeksi/hücre sayısı lineer aralığında olmalıdır [187]. Alınan ölçümler sırasında kullanılan voltaj yaklaşık 20 mV değerindedir. Her bir kuyucuğun sahip olduğu elektroddan alınan empedans ölçüm değerleri, o kuyucuğun elektrod geometrisine, kuyucuktaki iyon konsantrasyonuna ve kuyucukta elektroda yapışmış hücre olup olmadığına göre değişiklik gösterir [182].



Şekil 4.112 Hücre yokluğunda ve varlığında elektrodun elektrik empedansındaki değişim

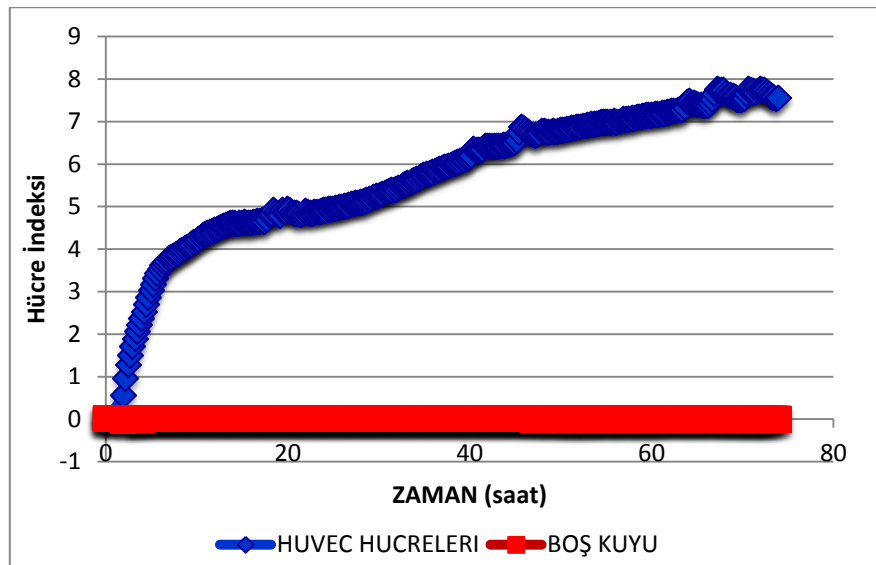
Ortamda elektroda yapışmış herhangi bir hücre olmadığında, elektrodun empedansı, elektrod çözeltisinin ve kuyucuktaki boş çözeltinin etrafındaki iyonik çevrenin empedansına göre belirlenir. Ancak elektroda yapışmış hücreler olduğunda, elektrodun sensör yüzeyine yapışan hücreler, bir yalıtkan gibi davranacağından ve elektrod çözeltisinin yüzeyindeki lokal iyonik çevreyi değiştireceğinden, empedansta bir artışa

sebeap olur. Bu nedenle de, elektrod zerindene kadar hücre çoğalırsa, elektrodan alınacak olan empedans değeri de o kadar artacaktır [186].

Deneyin Yapılışı:

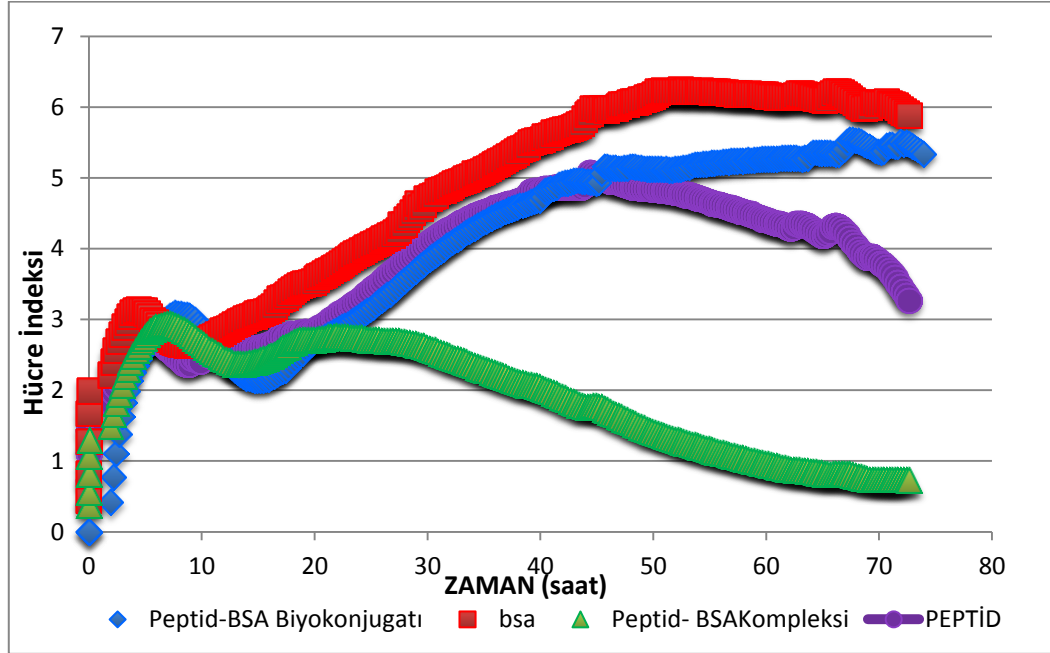
İnsan kordon toplardamar endotel hücreleri (HUVEC), göbek kordonundan alınan toplardamarlardaki endotel hücrelerdir. Bu hücreler endotel hücrelerin patolojisi ve fonksiyonlarını araştırmada laboratuvar model sistemi olarak kullanılmaktadırlar [188]. Çalışmada kullanılan, HUVEC hücreleri standart kültür koşullarında, %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren kültür şişelerine ekilerek 37  C'de %5 CO₂'li inkübatörde çoğaltıldı ve 2-3 günde bir kontrol edilen hücrelerin, belirli aralıklarla yeni pasajları yapıldı.

1. Flasktaki HUVEC hücreleri son hücre yoğunluğu 1×10^4 hücre/100 l olacak şekilde resspende edildi.
2. E-platte kuyuların background değeri 100 L medium konularak alındı. 100 L hacimde HUVEC hücre süspansiyonu eklendi.
3. Eklenir eklenmez E-Plate xCELLigence cihazına yerleştirilip yüklendi.
4. xCELLigence software programı açılarak plate 10 dakika okutuldu.
10. Kuyulardaki endotelyal hücreler üzerine sentezlenen maddelerin eklenmesinin ardından 74 saat boyunca gerçek zamanlı hücre sayım cihazında hücre indeks değişimi izlendi.

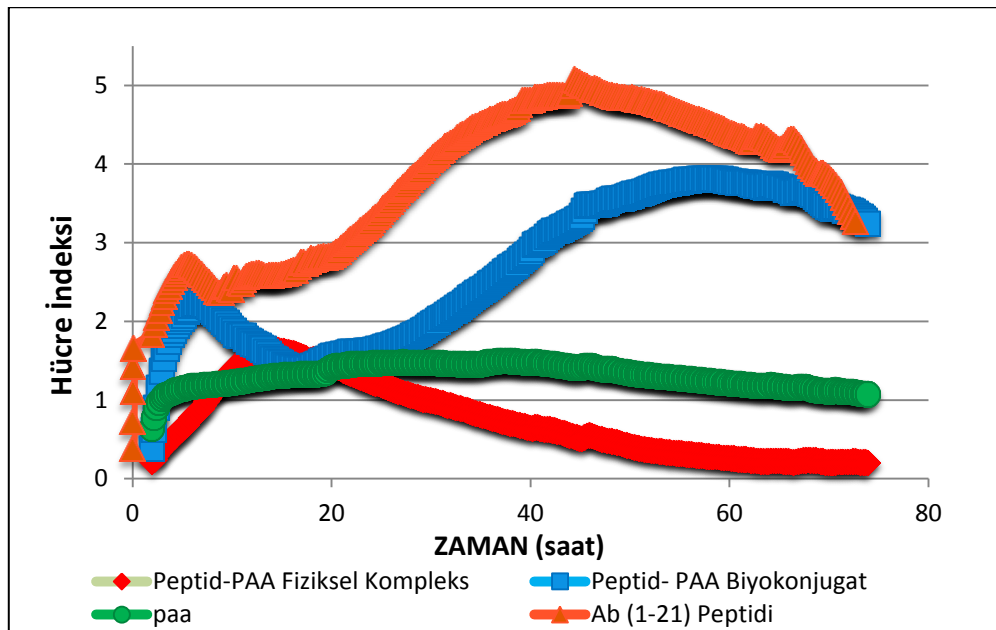


şekil 4.113 Kontrol grubuna ait kuyucukların hücre indeksinin analizi

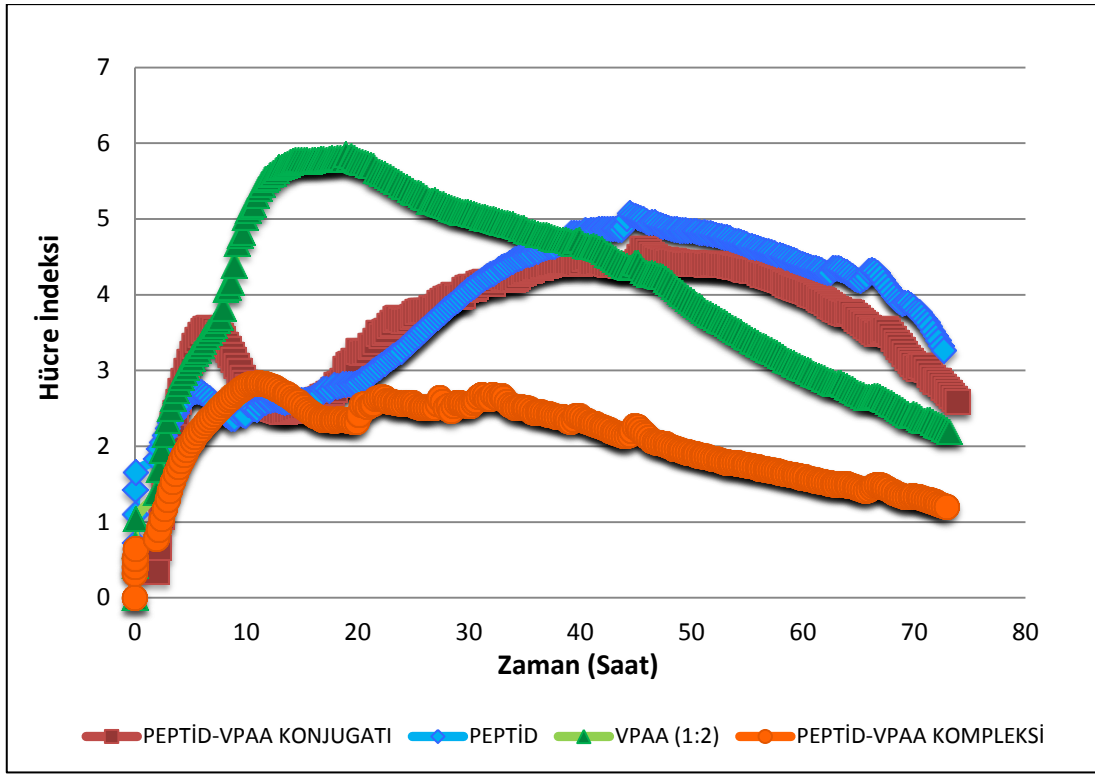
A β (1-21) peptid dizisinin XCELLienge cihazında 73 saat boyunca eş zamanlı olarak alınan ölçümlerinin sonuçları HUVEC hücrelerine verilen konjugat ve komplekslere ait grafikler kıyaslamalı olarak aşağıda gösterilmiştir.



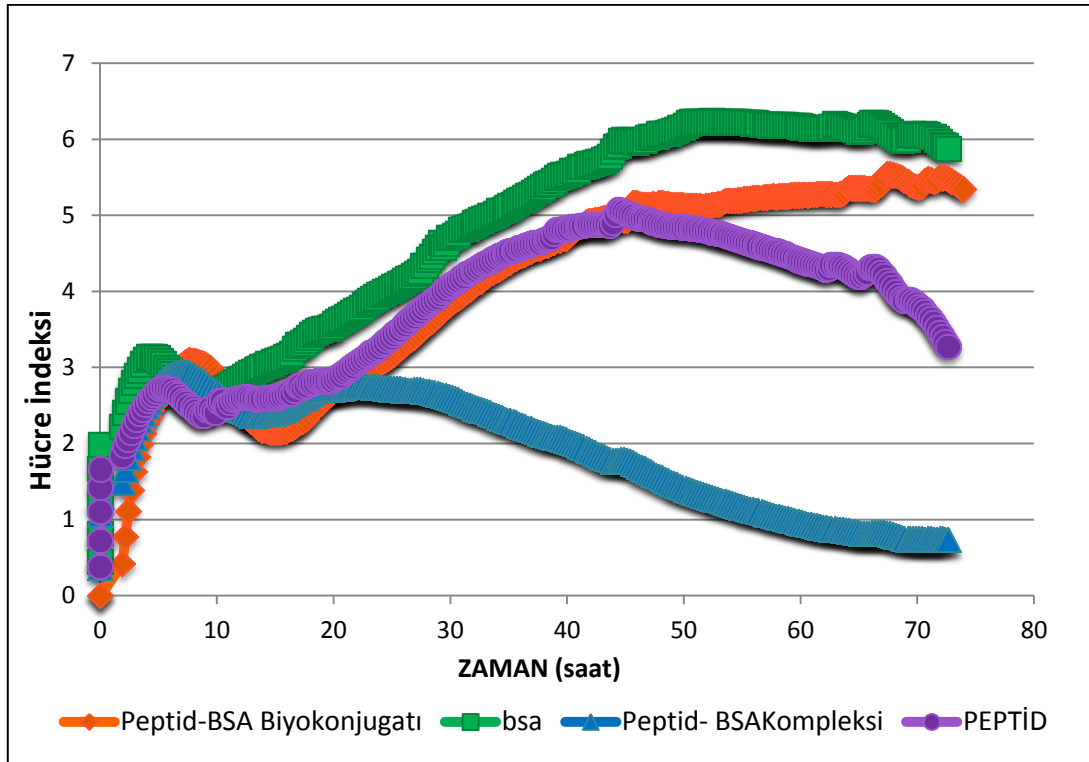
Şekil 4.114 A β (1-21) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına BSA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



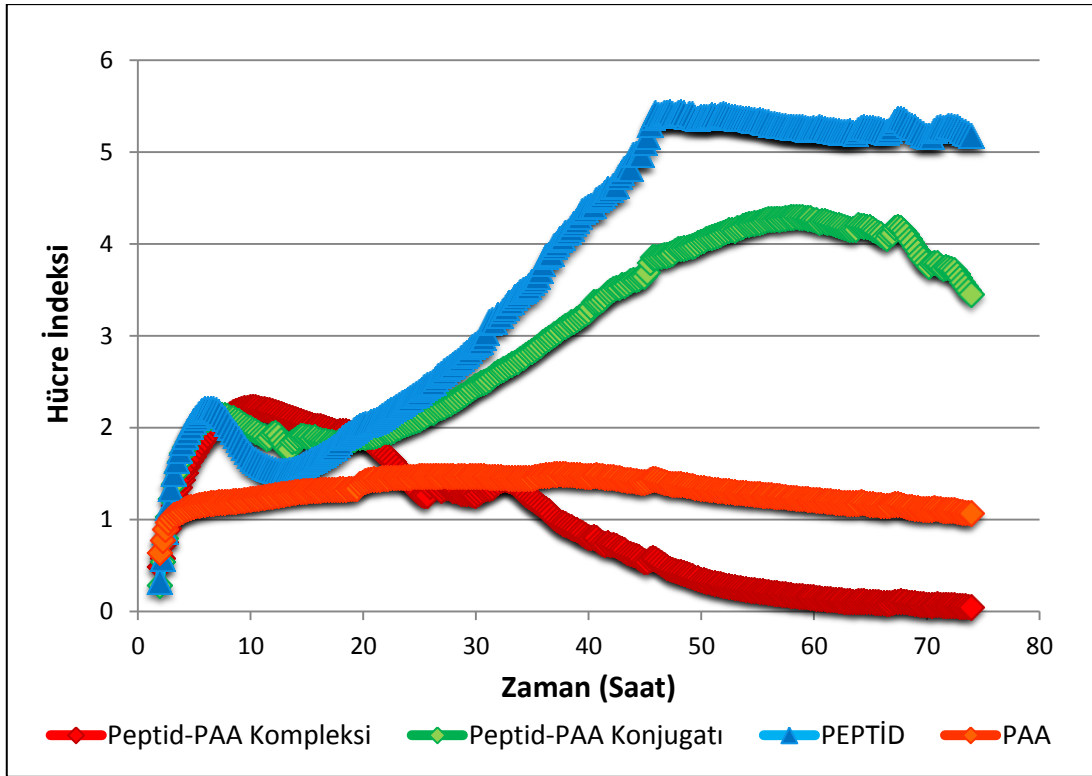
Şekil 4.115 A β (1-21) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına PAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



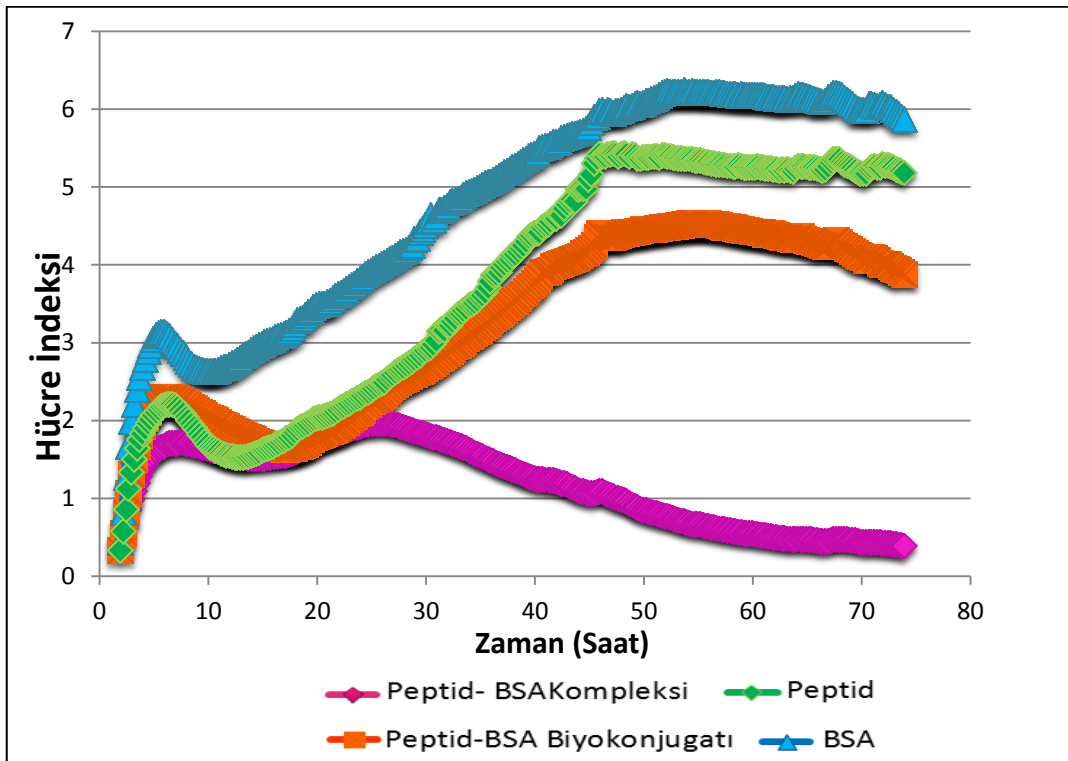
Şekil 4.116 Aβ (1-21) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına VPAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



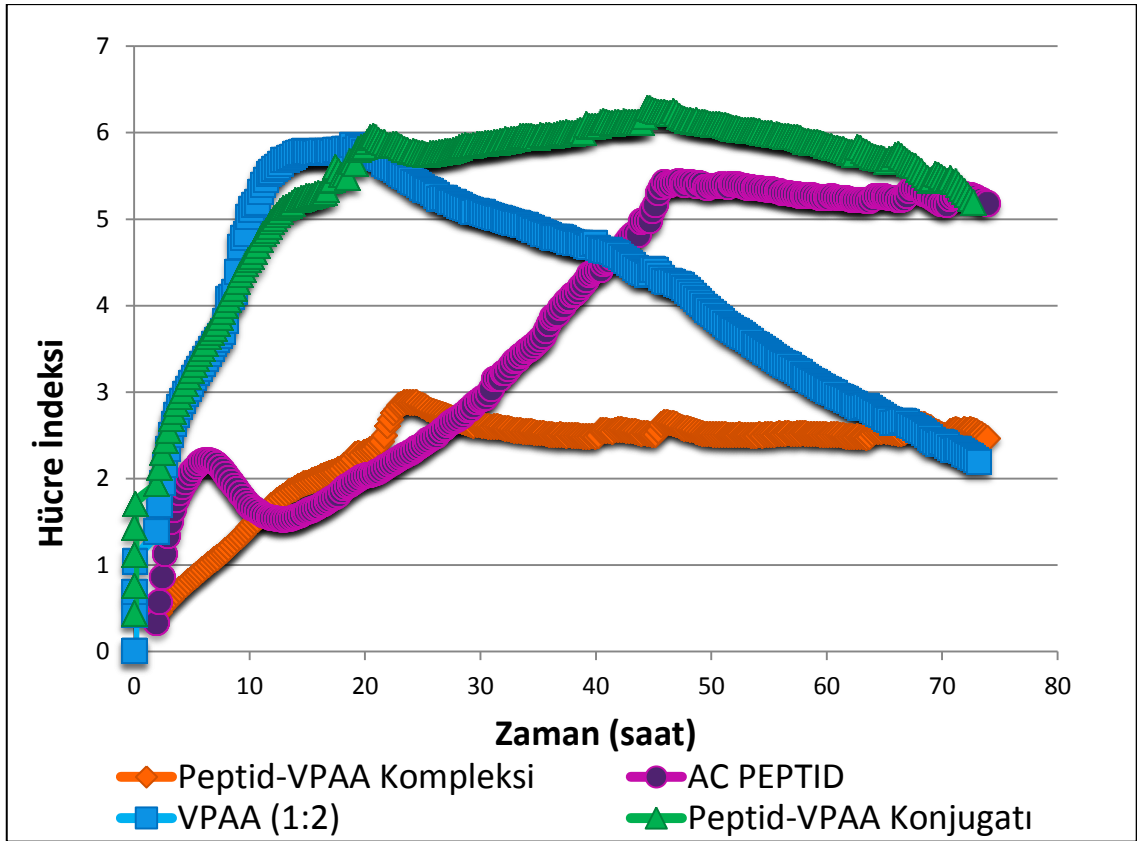
Şekil 4.117 Aβ (1-15) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına BSA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



Şekil 4.118 Aβ (1-15) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına PAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



Şekil 4.119 Aβ (1-15) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatlarının tek başına BSA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi



Şekil 4.120 A β (1-15) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel komplekslerinin tek başına VPAA ve peptid sonuçları ile kıyaslamalı analizi

Bu tez çalışmasında, Amloid Beta (A β) peptidine ait antijenik özellikli iki farklı peptid dizisi olan; A β (1-15) ve A β (1-21) peptid dizileri ve adjuvant olarak görev yapacak dört farklı taşıyıcı makromolekül PAA, VP/AA, Dekstran Aldehit ve BSA ile çalışılmıştır. Bu çalışmadan peptide bağlanacak olan makromolekülün konsantrasyonu sabit tutulmuş, sadece peptid miktarları arttırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan A β (1-15) peptid dizisi, beyinde senil plakların oluşumuna ve hücre apoptozuna neden olan 42 amino asitlik A β peptidinin B Hücreleri epitopudur. A β (1-21) peptid dizisinin bu çalışma açısından önemi ise, A β -A β bağlanmasında önemli bir bölge olan, hidrofobik merkez 16-20 dizisini (KLVFF) içeriyor olmasıdır. Deneylerde kullanılan bu iki dizinin sudaki çözünürlükleri, hidrofobik özellikleri ve fizikokimyasal özellikleri birbirlerinden tamamen farklıdır. Bu çalışmada öncelikle taşıyıcı molekül olarak kullanılacak olan Dekstran Aldehit'in sentezi, literatürdeki bilgilere dayanarak yapılmıştır. Her iki peptid dizisi ile yukarıda bahsedilen makromoleküllere kovalent konjugasyon ve fiziksel kompleks oluşumu gibi yöntemler ile bağlanması ve elde edilen biyokonjugatlarının ve fiziksel komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu yapılmıştır. A β (1-21) peptidinin PAA ile iki farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ bağlanma derecesine sahip olan biyokonjugatlarının biyoyumluluğunun incelenmesi amacıyla da MTT yöntemi ile sitotoksik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca her iki peptide ait farklı taşıyıcı makromoleküllere bağlanmış olan biyokonjugat ve biyokomplekslerin, İnsan Umbilikal Kordon kanı Hücreleri (HUVEC)'ne yapmış olduğu etkiler, XCELLienge sisteminde 72 saat boyunca eş zamanlı olarak incelenmiş ve 72 saat sonunda hücrelerin canlılıkları ölçülmüştür. Biyokonjugatların ve biyokomplekslerin sentezlenmesinde kullanılan yöntemler ise şöyledir:

- PAA, VPAA ve BSA ile: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) varlığında kovalent konjugasyon ile biyokonjugat oluşumu,

- PAA, VPAA ve BSA ile: Elektrostatik etkileşim ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan bağlanma metodlarına dayalı biyokompleks oluşumu,
- Dekstran aldehit ile: İndirgeyici olarak NaHB₄ kullanılarak ılımlı koşullarda yükseltgenmiş

Dekstran polimeri ile, kovalent bağlı biyokonjugatların sentezi gerçekleştirilmiştir.

İlk yöntemde, taşıyıcı moleküllerin karboksil (-COOH) grupları, EDC yardımıyla aktive edilmiş ve bu aktif karboksil gruplarının peptid moleküllerindeki amino polimerin karboksil grubu ile proteinin amino (-NH₂) grupları ile bağlanmıştır. Reaksiyonda yan ürün olarak oluşan aktif O-açıl-izoüre suda çözünabilir özellikte olduğundan ortamdan santrifüj ile uzaklaştırılmış ve peptid biyokonjugatları elde edilmiştir. Sentezlenen biyokonjugatların yapı-işlev analizleri, spektroskopik ve kromatografik yöntemler ile (HPLC, Floresans Spektrofotometre, UV ve SEC cihazlarında) karakterize edilmiştir.

İkinci yöntemde, herhangi bir kimyasal reaksiyon olmaksızın, peptid ile taşıyıcı makromolekülün, uygun pH ve ortamda reaktif grupları vasıtasıyla etkileşmesi ile peptid biyokompleksleri elde edilmiştir.

Son yöntem olan Dekstran Aldehit ile konjugasyon reaksiyonunda ise, peptidin amino (-NH₂) grubu ile Dekstran Aldehit'in karbonil gruplarının NaHB₄ vasıtasıyla kovalent bağlanması ile biyokonjugatlar elde edilmiştir.

HPLC ve SEC analizi sonucu elde edilen UV kromatogramlarında; BSA haricindeki diğer makromoleküllerin (PAA, [P(VP-co-AA)]_{80kDa}, Dekstran Aldehit) baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği görülmüştür. Biyokonjugatların analizinde ise, saf peptidin pik vermediği bölge olan yaklaşık olarak 10. dakika ile başlayan bölgede görülen 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 benzer sonuçları verdiği görülmektedir. Işık saçılması detektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, genel olarak taşıyıcı molekül ve peptidin birbirine bağlanması sonucu biyokonjugat

oluşumuyla beraber molekülün yarıçapının arttığını yani molekül boyutunun da giderek büyüdüğü gözlenmektedir. Biyokonjugatların Floresans Spektroskopisi ile analizlerine baktığımızda ise, serbest peptid moleküllerine ait spektrumlardaki dalga boyu olan $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin, aynı peptidlerin biyokonjugatları ile alınan spektrumdakilere kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu oluşumu sonrasında floresans spektrumlarında $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin 5 ila 24 nm'ye kadar blue shift (maviye kayma) yaptığı gözlenmiştir. Triptofanın hidrofobik özelliğinden dolayı, çözeltideki çözücü moleküllerinden izole olduğu, makromolekül zincirindeki hidrofobik bölgede kaldığı ve bu nedenle de biyokonjugatlara ait floresans spektrumlarında blue shift oluşumu gözlenmiştir. Komplekslerin floresans spektrumu analizinde ise, saf peptidin pik vermediği bölge olan, yaklaşık olarak 10. dakika ile başlayan ilk yarısında hemen hemen tüm oranlarda aynı şiddette, peptidin artan molar oranından bağımsız pikler gözlenmiştir. Kromatogramın ikinci yarısında, reaksiyona girmemiş serbest peptidi gözlemlediğimiz pik bölgesinde ise artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{makromolekül}}$ oranıyla birlikte piklerin şiddetlerinin arttığını gördük. Bu durum bize peptid ile makromolekül zinciri arasında meydana gelen kovalent olmayan etkileşimler sonucu meydana gelen kompleks oluşumunun peptid miktarından bağımsız olduğunu göstermektedir. Biyokomplekslerin 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 peptidlerde maksimum floresans şiddetinin aynı biyokonjugatlarda olduğu gibi genellikle min 5 ile maksimum 20 nm arasında değişen değerlerde blue shift yaptığı gözlenmiştir. Bu spektrumlarda istisnalarla mevcut olmakla birlikte genel tablo bu şekildedir ve istisnaya giren durumlar ilerdeki bölümlerde değerlendirilecektir.

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

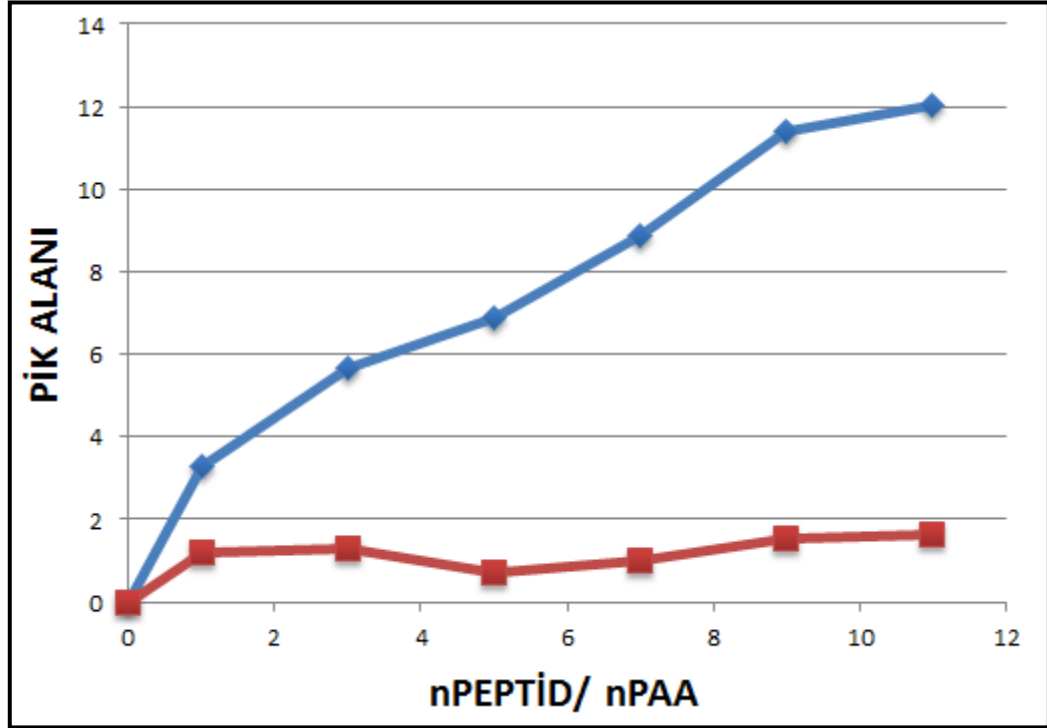
5.1 EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ile Konjugasyon Yöntemine Ait Tartışmalar

5.1.1 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Biyokonjugatları

5.1.1.1 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin 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. Bu koşulların kıyaslandığı HPLC kromatogramında 10. ile 14. dk.lar arasındaki pikler incelendiğinde, en verimli konjugasyonun Koşul2’de olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Koşul2’ye göre gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu sırasında, reaksiyona girmeden kalan peptid miktarının en az olduğu da, kromatogramdaki 20 ile 21. dakikalardan görülmektedir (Şekil 4.10). Floresans spektrumlarına göre karşılaştırma yaptığımızda ise, biyokonjugat oluşumunda en fazla dalga boyu kayması Koşul2’de yaşandığını görmekteyiz (Şekil 4.9). SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 10. ile 18. dakikalar arasında gözlenen ve biyokonjugasyon oluşumunu bize ifade eden pik alanı en büyük Koşul2’ye göre sentezlenen biyokonjugatta görülmüştür (Şekil 4.11c). Aynı şekilde ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlara bakıldığında ise en büyük pik alanının Koşul2’ye göre sentezlenen biyokonjugata ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.11a). Tüm bu sonuçları göz önünde bulundurduğumuzda Aβ (1-21) peptidinin ile PAA’nın, EDC yöntemiyle biyokonjugasyonu için en verimli reaksiyon koşulunun Koşul2 olduğunu söyleyebiliriz. Bu doğrultuda bu peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, npeptid/npolimer= 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 Koşul2’ye göre sentezlenmiştir. Serbest peptid, tek başına PAA ve sentezlenen biyokonjugatı içeren HPLC kromatogramında 10 ila 19. dakikalar arasındaki piklerden biyokonjugasyon oluşumu görülmektedir (Şekil 4.14).

Farklı n bağlanma derecelerinde sentezlenen biyokonjugatlar, HPLC kromatogramlarında I. Pik bölgesi dediğimiz 10 ile 14.dk arasında görülmekte ve artan peptid konsantrasyonu ile polimere kovalent olarak bağlanmış peptid miktarı da artmaktadır. Bağlanmamış serbest peptidi ifade eden 20 ile 24.dk arasında yer alan II. Pik bölgesindeki piklerde ise reaksiyona girmemiş serbest peptid miktarının belli bir değerin üzerine çıkması ve oldukça az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 5.1 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği.

Şekil 5.1'den görüldüğü üzere, Peptid-PAA 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 oldukça azdır. SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, I.Pik bölgesinde (9 ve 11,5. 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. Serbest yani polimer zinciri ile etkileşime girmemiş, bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise çok büyük bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.16c).

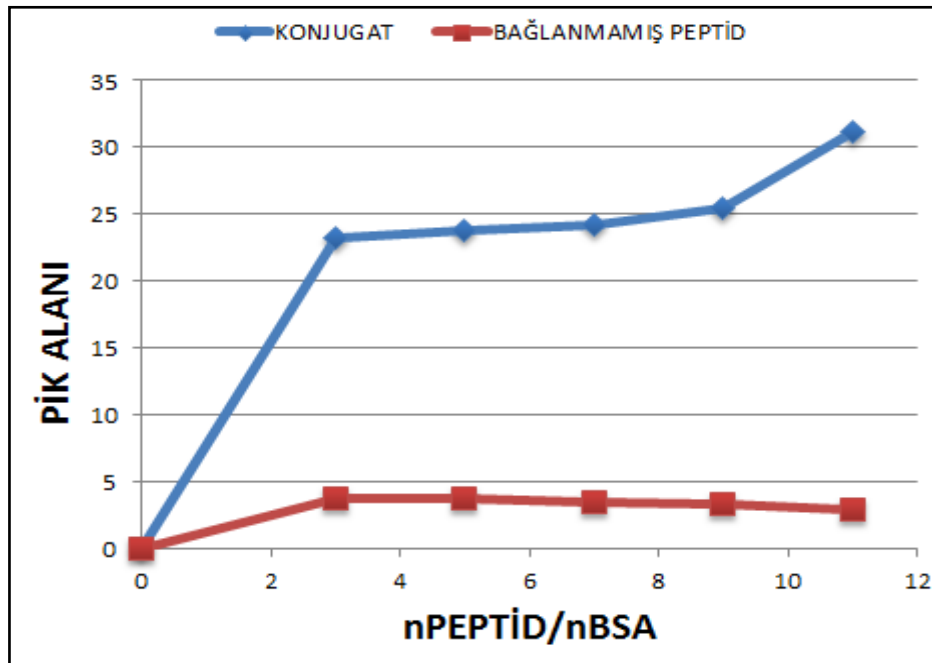
SEC cihazının ışık saçılması (RALS) dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, sentezlenen farklı mol oranlarındaki biyokonjugatların peptid ve polimere ait ışık saçılması pikleri ile kıyaslaması yapıldığında oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarının peptide göre çok daha büyük ancak PAA ile kıyaslandığında hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Şekil 4.26a).

Aβ (1-21) peptidinin PAA ile değişen oranlardaki biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptidin floresans spektrumu 347 nm’de gözlenmekte iken, etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yine yaklaşık olarak 342 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 4-5 nm’lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki dramatik azalma net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.15’deki n=5 oranındaki pik biyokonjugatının içerdiği peptid miktarı, serbest peptid pikiyle aynıdır. Şekilden görüldüğü üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon sonucu elde edilen biyokonjugata ait spektrumda, peptidin polimer zinciri tarafından sıkı bir şekilde sarılmış olmasından dolayı spektral dalga boyunda 4 nm’lik kayma ve floresans şiddetinde çok ciddi bir azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.15).

5.1.1.2 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin BSA ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Aβ (1-21) Peptid Dizisinin BSA ile olan konjugasyonun da 4 farklı koşulda sentez yapılmış olmasına karşın, HPLC, UV Absorbansı ve Floresans grafiklerinden en iyi bağlanmanın PAA ile konjugasyonunda olduğu gibi Koşul2’de gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). Bu farklı koşullarda sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin BSA kopolimeri ile elde edilen 4 farklı biyokonjugatının UV spektrometre ile ölçümü alınmıştır. Bu konjugatlara ait absorbans değerleri kıyaslandığında, en yüksek absorbansın yanı sıra başka bir deyişle en yüksek peptid miktarını içeren biyokonjugatın Koşul 2’ye ait olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.40).

Serbest peptid, tek başına PAA ve sentezlenen biyokonjugatı içeren HPLC kromatogramında 10 ila 19. dakikalar arasındaki piklerden biyokonjugasyon oluşumu net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.43). Konjugasyon metoduna karar verilmesinin ardından, Koşul2'ye göre $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 1:3:5:7:9:11$ oranlarında elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. Aβ (1-21) Peptid dizisinin BSA ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz ve 13. ve 19. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında Peptid/BSA biyokonjugatları görülmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile, oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı piklerin şiddetlerinden anlaşılmaktadır. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, 22. ile 24. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında görülen, BSA proteinine bağlanmamış peptid moleküllerine ait pikler görülmektedir. Bu piklerin şiddetleri ise, oluşan konjugat piki ile kıyaslandığında oldukça düşük bir değere sahiptir. HPLC kromatogramlarından elde edilen veriler doğrultusunda peptid ile BSA'nın kuvvetli bir şekilde bağlandığını ifade edebiliriz (Şekil 4.45). Peptid konsantrasyonunun artması ile ortamda oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı pik alanı grafiğinde açık olarak görülmektedir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) peptidinin BSA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

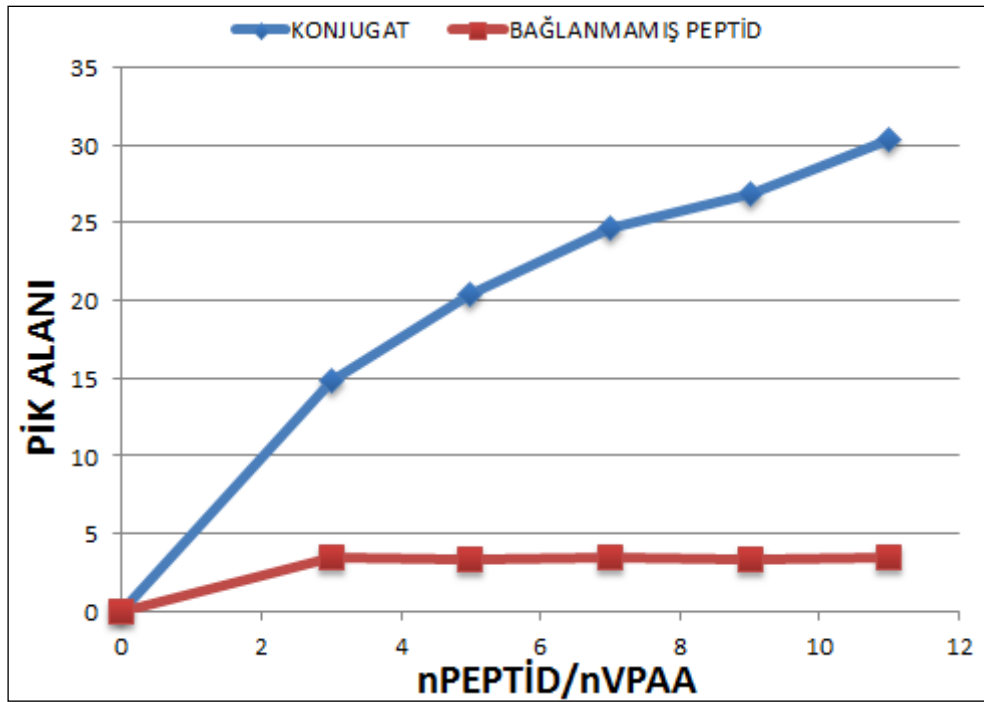
A β (1-21) Peptid dizisi amino ucunda yer alan bir tane Triptofan rezidüsü içermektedir. BSA proteini de iki tane Triptofan rezidüsüne sahiptir. A β (1-21) peptidi/BSA biyokonjugatı spektrofotometrik olarak incelendiğinde, her iki maddenin de yapısındaki floresans özellikli amino asitlerden dolayı farklı spektral özellikler gösterdiği bilinmektedir. Serbest peptide ait floresans spektrumunun maksimum dalga boyu 347 nm'de ve BSA'ya ait floresans spektrumunun maksimum dalga boyu 334 nm'de gözlenmekte iken, konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri mol oranına bağlı olarak yaklaşık olarak 324 nm ile 329 nm arasında izlenmektedir. Saf peptide göre peptid/BSA biyokonjugatlarının farklı mol oranlarında 18 ila 24 nm'lik dalga boyu kayması gözlenmektedir. Peptid konsantrasyonunun en az olduğu, en küçük mol oranı olan 1 oranında bu rakam 24 nm iken, peptid konsantrasyonunun en fazla olduğu mol oranı olan 11 oranında ise bu 20 nm'lik dalga boyu kaymasına denk gelmektedir Şekil 4.42'den de görüldüğü üzere aynı miktarda serbest peptid içermesine rağmen, EDC yöntemi ile Koşul2'ye göre yapılan, kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugatlarda serbest peptide kıyasla, çok net bir spektral kayma ve floresans şiddetinde azalma gözlenmiştir. Biyokonjugat oluşumu floresans spektroskopisi ile de spektral olarak da ispatlanmaktadır. Biyokonjugatların SEC cihazı ile analizinde, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan görüldüğü üzere, I. Pik bölgesinde, 14,5 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 genel olarak oldukça düşük miktarda bağlanmadan kalan peptid bulunduğu piklerden görülmektedir (Şekil 4.44a). SEC cihazında ışık saçılması (RALS) dedektöründen elde edilen peptid/BSA biyokonjugatlarının piklerini, tek başına peptid ve tek başına BSA'ya ait olan kromatogramlardaki pik değerleri ile kıyasladığımızda, biyokonjugatların molekül boyutlarındaki artışın $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranına bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Her bir artan n oranında peptid konsantrasyonu da arttığından, BSA ile bağlanan peptid molekülleri sayesinde oluşan biyokonjugatın yarıçapı büyümektedir (Şekil 4.44b). 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 bağlandığı görülmektedir.

5.1.1.3 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) (Mw=80000 Da) ile Biyokonjugasyonuna ait Tartışma

Molekül ağırlığı 80.000 Da olarak bölümümüzde sentezlenen VP/AA kopolimeri, antijenik Aβ (1-21) Peptidi ile 2 farklı koşul kullanılarak sentezlenmiştir. Bu koşullara ait konjugatlar sentezlendikten sonra yapılan analizler sonucunda, yine pH 5'te polimer aktivasyonunun yapıldığı ve daha önceki konjugasyonlarda kullanılan metodun daha verimli bağlandığı gözlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.28). Ayrıca konjugasyonun gerçekten gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için de, sentezlenen biyokonjugat, tek başına peptid ve tek başına VPAA kıyaslamalı olarak Şekil 4.27'de verilmiştir. Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-21) Peptidinin VPAA kopolimeri ile elde edilen biyokonjugatlarının UV spektrometre ile ölçümünde, absorbans değerlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ oranı arttıkça arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeni, biyokonjugatların yapısına katılan peptid miktarının artmasıyla, VPAA kopolimerine bağlanan peptid miktarının da artması, sonuçta oluşan biyokonjugatın UV absorbansını da arttırmıştır (Şekil 4.31). Aβ (1-21) peptidinin VPAA 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 4.30). Kromatogramlar incelendiğinde, pik alanlarından da anlaşılacağı üzere, biyokonjugatların n bağlanma oranı arttıkça konjugat oluşumu da artmakta ve I. Pik bölgesindeki piklerin alanları büyümektedir. Sentezlenen biyokonjugatların SEC cihazı ile incelenmesinde ise, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda, I. Pik bölgesinde (9.5 ve 18. dakikalar arasında) biyokonjugatdaki peptid oranının artmasıyla belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir (Şekil 4.32a). Biyokonjugatın yapısına katılan peptid konsantrasyonu arttığında, VPAA kopolimeri ile bağlanan peptid miktarı da artmaktadır. Buna karşılık polimer zincirine bağlanmamış serbest peptid miktarını ifade eden II. Pik bölgesindeki piklerin alanlarının ise, oldukça düşük değerlerde kaldığı ve biyokonjugatların pik alanları ile kıyaslandığında yok denecek küçük olduğu görülmektedir (Şekil 4.32a ve Şekil 5.3). RALS dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarındaki

artışın, genel olarak mol oranına bağlı şekilde arttığı ancak n=7 konjugatının hepsine göre en yüksek alana sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.32b).



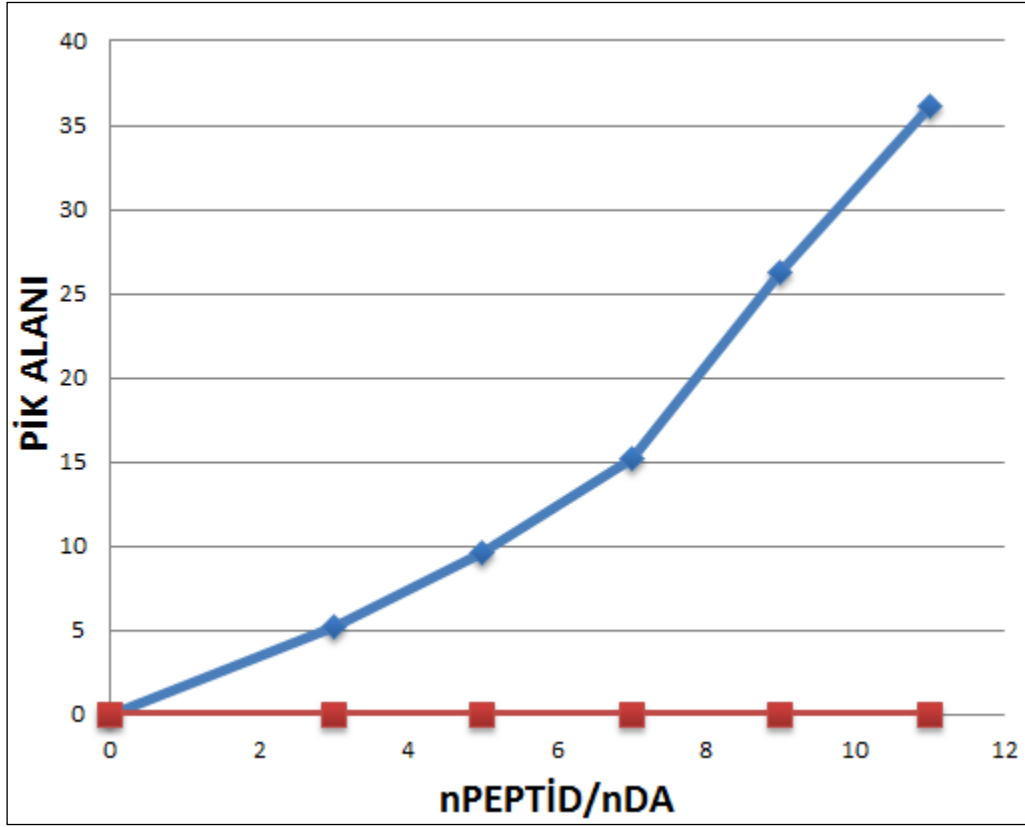
Şekil 5.3 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin VPAA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

A β (1-21) peptidinin VPAA kopolimeri ile biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 347 nm’de gözlenmekte iken konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 342 nm civarında izlenmektedir. 5 nm’lik dalga boyu kayması görülmektedir. Şekil 4.29’daki en üstteki. pik n=5 oranındaki biyokonjugatı ve 3. pik ise n=5 oranında serbest peptidi ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere, aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugat, VPAA 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 ise, saf peptidin floresans şiddeti ile kıyaslandığında çok fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.29).

Sonuç olarak, UV spektrumlarından, SEC cihazından elde edilen kromatogramlardan, HPLC sonuçlarından ve Floresans spektrumlarından görüldüğü üzere, her bir mol oranı için karbodiimid varlığında kovalent konjugasyonda peptid moleküllerinin VPAA kopolimeri ile kuvvetli bir şekilde bağlandığı ispatlanmıştır.

5.1.1.4 Aβ (1-21) Peptid Dizisinin Dekstran Aldehid (DA) ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Aβ (1-21) Peptid Dizisi Dekstran Aldehid konjugasyonunda, diğer taşıyıcı makromoleküllerden farklı ve tek bir bağlama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde peptid ile DA birbirine Schiff Bazı oluşumu üzerinden direkt olarak kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ancak diğer konjugasyon reaksiyonlarında olduğu gibi, yine $n_{\text{peptid}}/n_{\text{DA}}$: 1:3:5:7:9:11 olmak üzere farklı bağlanma dereceleri üzerinden konjugatlar sentezlenmiş ve spektroskopik ve kromatografik analizleri yapılmıştır. HPLC kromatogramı incelendiğinde, n bağlanma derecesi arttıkça, DA ile bağlanan peptid miktarı da artmakta ve oluşan biyokonjugata ait 12. Dakikalar ile 22. Dakikalar arasındaki piklerdeki artış net olarak görülmektedir. Ayrıca aynı kromatogramda DA ile reaksiyona girmemiş peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde, yaklaşık 20 ile 24. dakikalar arasında ise serbest peptide ait herhangi bir pik gözlenmemektedir (Şekil 4.56). Aynı biyokonjugatların SEC analizlerini incelediğimiz de ise, UV detektöründe yine bağlanmamış serbest peptid olmaksızın, biyokonjugatın artan n bağlanma derecelerine bağlı olarak artan pikler gözlenmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı, pik alanı grafiğinde açık olarak görülmektedir (Şekil 5.4).



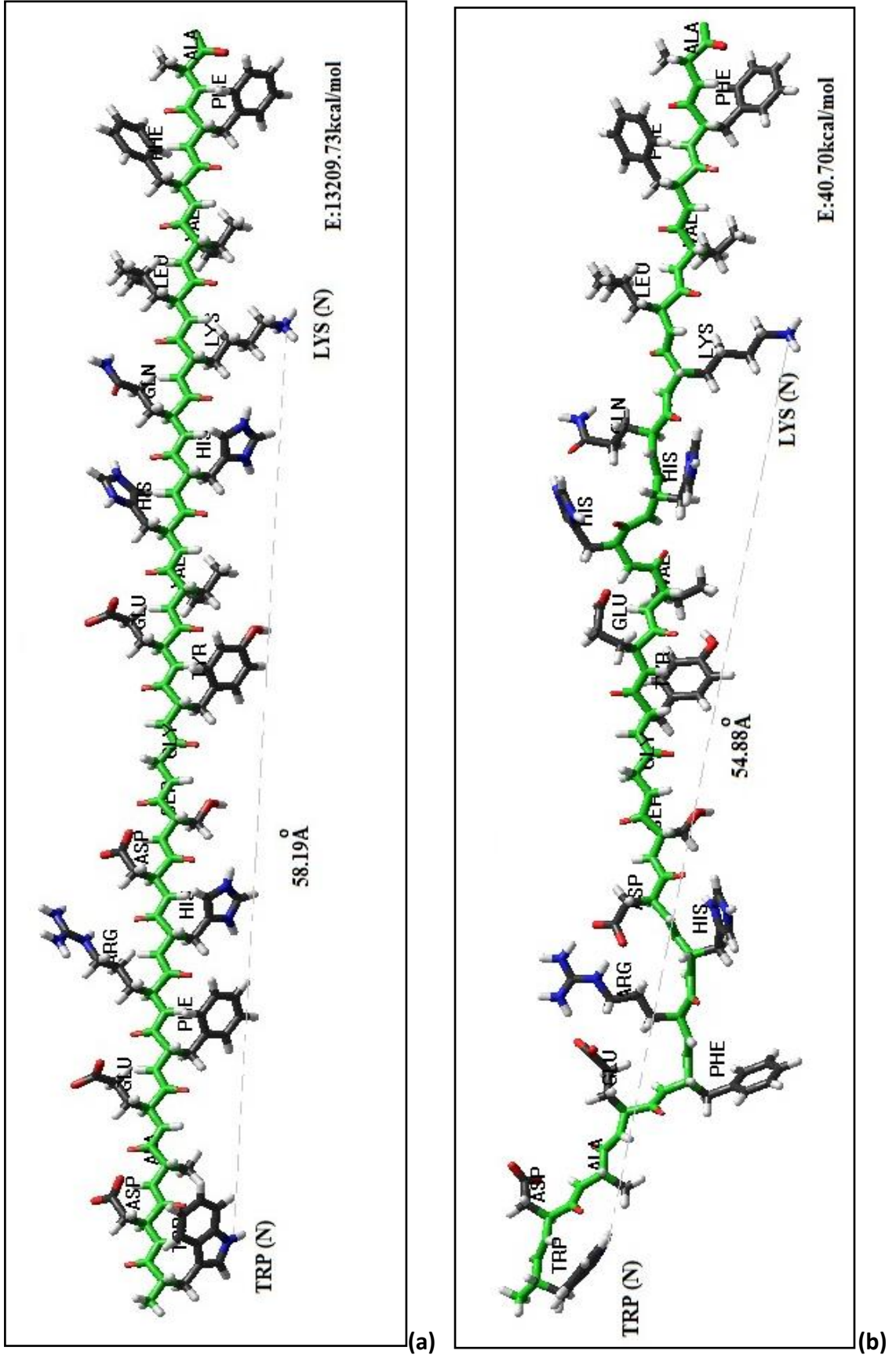
Şekil 5.4 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-21) peptidinin DA ile biyokonjugasyonunda (◆) **biyokonjugat** ve (■) **bağlanmamış peptidlere** ait pik alanı grafiği

SEC cihazının RALS detektöründen elde edilen kromatogramı incelediğimizde ise, peptidin artan oranlarında biyokonjugatın yapısına daha fazla peptid katılması ile, oluşan biyokonjugatların molekül ağırlıklarının da artmış olduğunu görmekteyiz (Şekil 4.57). Biyokonjugatların Floresans Spektroskopisi analizlerinde ise, tek başına peptid molekülünün spektrumuna ait $\lambda_{\max}$ değerinin, aynı peptidin DA ile bağlanması sonucu oluşan biyokonjugatların $\lambda_{\max}$ değerlerine göre yaklaşık 5-6 nm'lik bir sola kayma (Blue Shift) gösterdiğini görmekteyiz. Bunun nedeni, biyokonjugasyon oluşurken, peptidin amino ucunda yer alan triptofan, serbest peptide göre çözeltiden uzaklaşarak daha hidrofobik kısımlara çekilmiştir ve bunun sonucu olarak da floresans şiddetinde azalma ve daha küçük dalga boyuna kayma gözlenmektedir (Şekil 4.54).

5.1.1.5 A β (1-21) Peptid Dizisinin PAA ile sentezlenen Biyokonjugatlarının Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) ve Modelleme Sonuçlarına ait Tartışma

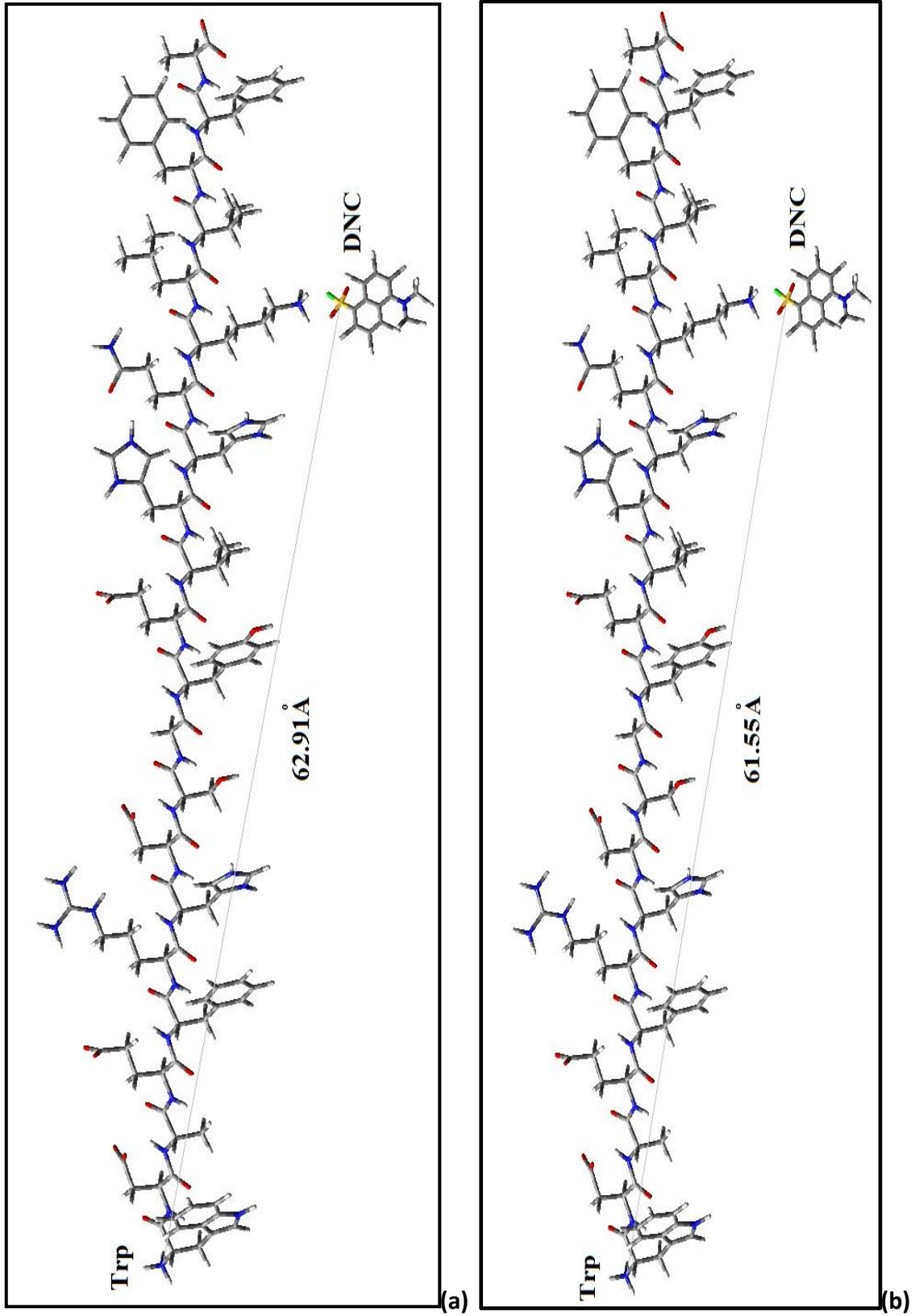
Konjugasyon reaksiyonunun oluşumu sırasında, Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi yardımı ile; intermoleküler mesafe hesabı yapıp, biyokonjugattaki donör ve akseptör arasındaki mesafe hesabı ile elde edilen bilgiler, saf peptidin konformasyonu ve biyokonjugat oluşumu durumunda peptidin konformasyonundaki değişimler hesaplanmış ve sayısal değerlerle de ifade edilmiştir. Ayrıca A β (1-21) peptid dizisi, moleküler mekanik yöntem ile modellenmiş ve minimum enerjiye sahip olduğu optimize geometrisi belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle A β (1-21) peptid dizisinin PAA ile, daha önceki deneylerde iyi sonuç veren n=7 oranındaki biyokonjugatı sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Saf peptidin ve sentezlenen biyokonjugatın ayrı ayrı olmak üzere floresans özellikteki bir boya olan Dansil Klorür (DNC) ile titrasyonu yapılmış ve DNC boya molekülünün FRET deneyleri için kullanılacak optimum konsantrasyonunun 2 μ l olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çeşitli deneyler sonucunda boya molekülünün Lys amino asidine bağlanması için gerekli inkübasyon süresinin de 1 dakika olduğu bulunmuştur. Deney için optimum koşullar belirlendikten sonra yapılan çalışmalardan FRET deneyine ait spektrumlar elde edilmiştir. A β (1-21) peptid dizisine FRET deneyleri için akseptör olarak görev yapacak, olan A β (1-21) peptid dizisinin 17. amino asit rezidüsü olan Lizin amino asidinden bağlanan DNC'nin spektral özellikleri incelendiğinde, absorpsiyon spektrumunda maksimum dalga boyu 347 nm. (Şekil 4.97), emisyon spektrumunda ise maksimum dalga boyunun 500 nm olduğu görülmektedir (Şekil 4.98). FRET deneyleri için donör olarak görev yapacak, A β (1-21) peptidinin –N terminal ucunda bulunan Triptofan'ın emisyon spektrumu ile akseptörümüz olan DNC'nin absorpsiyon spektrumlarının çakıştığı görülmektedir (Şekil 4.99). Borat tamponunda hazırlanan saf peptid çözeltisi DNC ile titre edildiğinde elde edilen spektrumlardan, her bir seferlik 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 4.100). Saf peptid ile aynı koşullarda hazırlanan peptid/PAA biyokonjugat çözeltisinin 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 4.101). Literatürden Triptofan amino asitinin kuantum veriminin 0.14 olduğu bilinmektedir [147]. 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 tek tek hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda peptidin kuantum veriminin 0,054 ve biyokonjugatın kuantum veriminin 0,042 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) $R_0=76,377 \text{ Å}$ olarak hesaplanmıştır. Donör ile akseptör arasındaki mesafe $r_{DA}=58,752 \text{ Å}$ 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 $R_0=82,513 \text{ Å}$ olarak hesaplanmıştır. Biyokonjugat oluşumundan sonra donör ile akseptör arasındaki mesafe ise $r_{DA}=63,296 \text{ Å}$ olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerlerden, biyokonjugat oluşumunda donör ile akseptör arasındaki mesafenin $4,544 \text{ Å}$ daha uzadığı ispatlanmıştır. Bu sayısal değerler bize biyokonjugat oluşumunda peptid dizisinin konformasyonunun değiştiğini peptid dizisinin bükülmek yerine, açıldığını göstermektedir. Aβ (1-21) peptid dizisinin mekanik modelleme analizinde, tek başına peptid molekülünün ve peptid/PAA biyokonjugatının daha önce yapılan FRET yöntemi sonuçları ve intermoleküler mesafe hesabı teorik olarak da konformasyon analizi ile yapılarak, elde edilen sonuçlar deneysel veriler ile karşılaştırılmıştır. Peptid, DNC eklenmiş peptid ve akrilik monomeri ile etkileşen peptid için geometri optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Donör molekül olan peptid dizisinin ilk amino asit rezidüsü Triptofan'ın –N terminal ucundan, 17. amino asit rezidüsü olan Lizin amino asitinin yan zincirinin en son noktasına olan mesafe hesabı teorik olarak yapılmıştır.

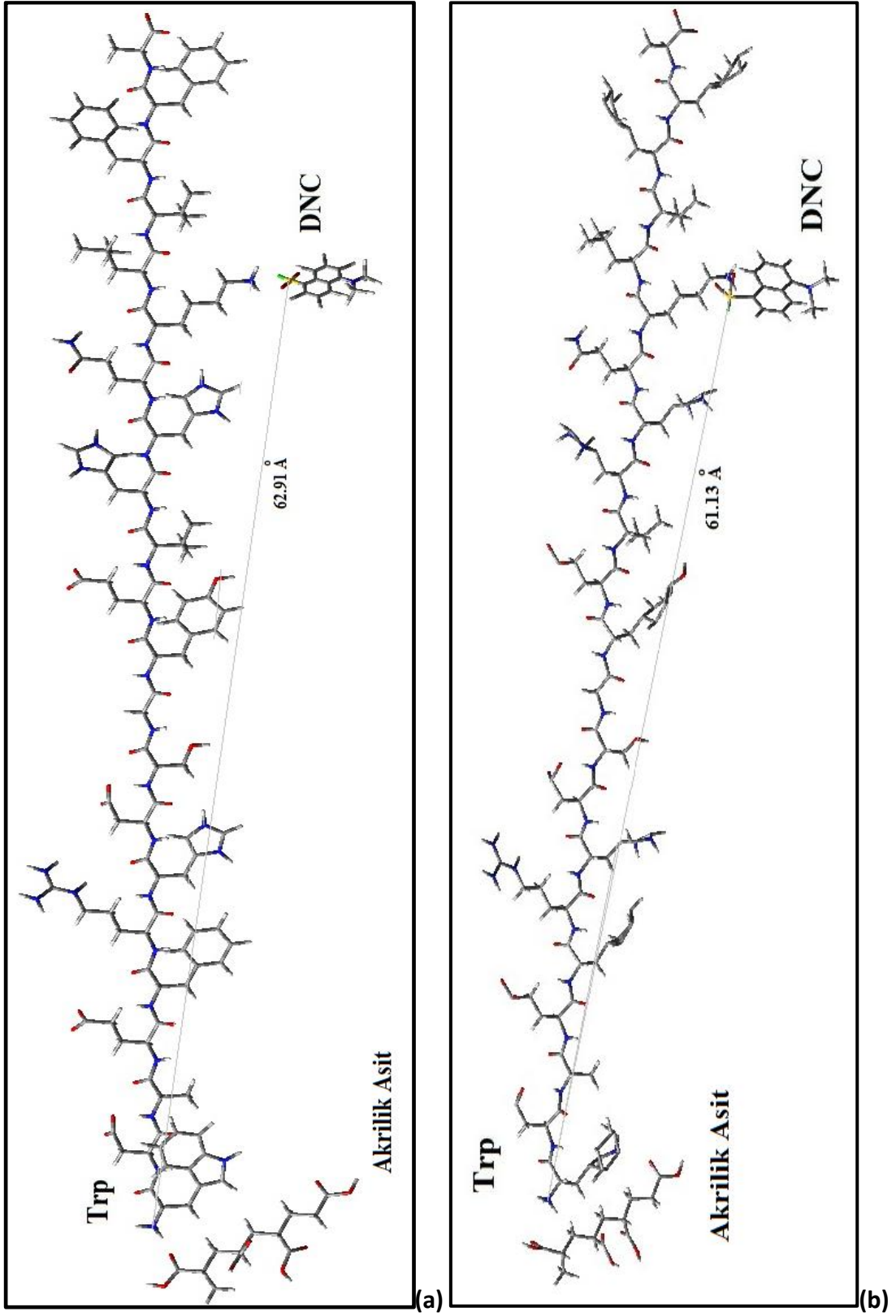


Şekil 5.5 Aβ (1-21) peptid dizisinin (a) optimizasyon öncesindeki, (b) optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellenmesi

A β (1-21) peptid dizisinin yan zincirlerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda bu peptid dizisinin β -sheet yapıdaki konformasyonunun optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon öncesi ve sonrasında peptid dizisinin $-\text{NH}_2$ ucundaki Triptofan rezidüsünün amin grubundan, 17. amino asit rezidüsü olan Lizin amino asitinin yan zincirindeki amin grubuna olan uzaklıklar hesaplanmıştır. A β (1-21) peptid dizisinin en kararlı olduğu hali modellenmiştir ve optimize geometrisi belirlenmiştir. Optimizasyon öncesinde molekülün enerjisi 13209.73 kcal/mol sonrasındaki enerjisi 40.70 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Peptid dizisinin optimizasyon öncesinde, birinci amino asit rezidüsü Triptofan'ın $-\text{NH}_2$ ucu ile Lizin amino asitinin yan zincirindeki amino grubu arasındaki mesafe 58,19 Å'dür (Şekil 5.5a). Peptid dizisinin optimizasyon sonrasındaki geometrisinde Trp amino asitinin $-\text{NH}_2$ ucu ile Lys amino asitinin yan zincirindeki amino grubu arasındaki mesafenin 54,88 Å olduğu bulunmuştur (Şekil 5.5b). A β (1-21) peptid dizisine DNC boya molekülü eklendiğinde en kararlı olduğu hali modellenmiştir ve optimize geometrisi ortaya konulmuştur. DNC eklenmiş peptid dizisinin optimizasyon öncesinde, birinci amino asit rezidüsü Triptofan'ın $-\text{N}$ terminal ucu ile DNC molekülünün peptide bağlanma noktası arasındaki mesafe 62,91 Å'dür. (Şekil 5.6a). FRET yöntemi ile hesaplanan deneysel olarak bulunan donör molekülümüz olan Triptofan amino asidinin $-\text{N}$ ucu ile, akseptör molekülümüz olan peptid dizimizdeki 17. amino asit olan Lizin amino asidinin yan zincirindeki amin grubundan diziye bağlanan DNC arasındaki mesafenin ise $r_{\text{DA}}=61,13$ Å olarak bulunmuştur. Yapılan deneysel ve teorik çalışmalar sonucunda, deneysel olarak elde edilen donör akseptör çifti arasındaki mesafenin % 7,05 hata ile ispat edilmiştir.



Şekil 5.6 Aβ (1-21) peptid dizisinin DNC boya molekülü eklendikten sonra **(a)** optimizasyon öncesindeki, **(b)** optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellenmesi



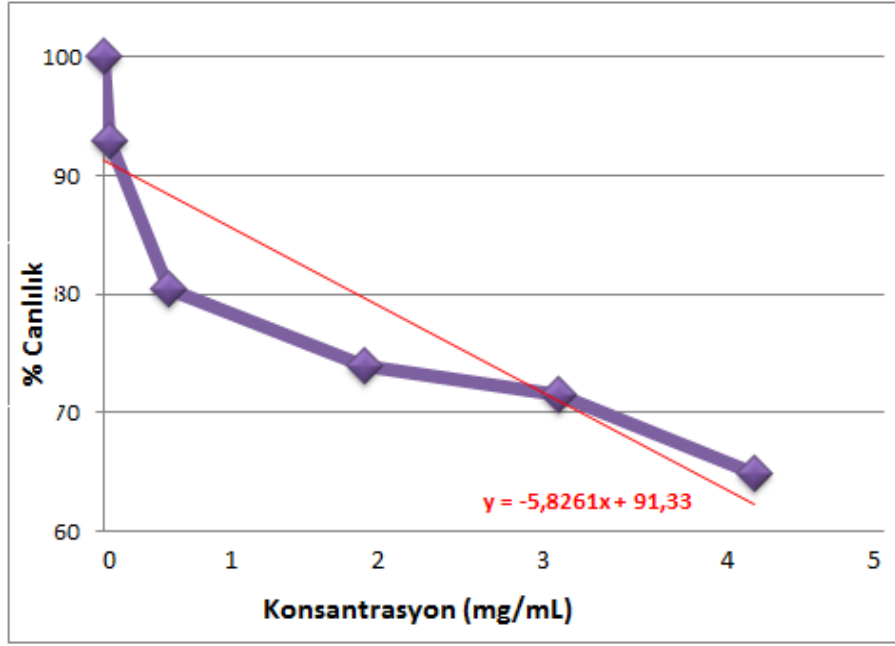
Şekil 5.7 Aβ (1-21) peptid dizisinin Akrilik asit monomeri ile konjugatının DNC boya molekülü klendikten sonra **(a)** optimizasyon öncesindeki, **(b)** optimizasyon sonrasındaki geometrisinin modellemesi

Biyokonjugatta ise donör ile akseptör arasındaki mesafe FRET yöntemi ile $rDA=63,296$ Å olarak bulunmuştur. HyperChem programında ise poliakrilik asitin tek bir monomeri için yapılabilmektedir ve mesafe 61,13 Å olarak hesaplanmıştır. İlerleyen çalışmalarda polimer zinciri için teorik hesaplamalara devam edilecektir. Literatürde ilk kez N ucunda Trp bulunan A β (1-21) peptid dizisi modellenmiş ve peptid-PAA biyokonjugatlarının üç boyutlu konformasyonunun nasıl değişime uğradığı sayısal değerlerle ispat edilmiştir.

5.1.1.6 Hücre Kültürü Deneylerine ait Tartışma

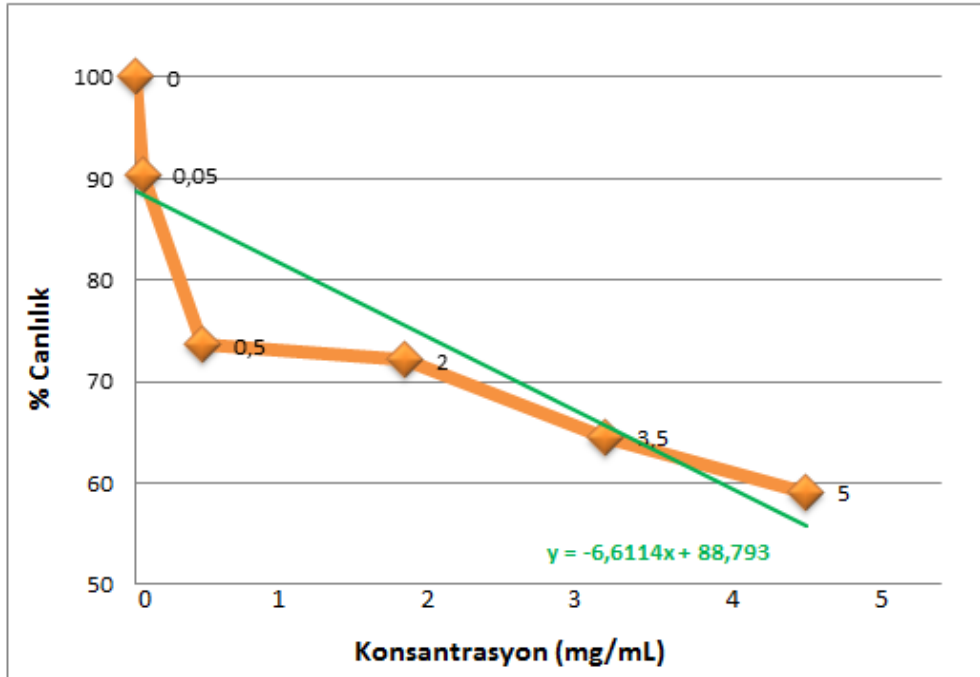
5.1.1.6.1 A β (1-21) Peptid Dizisinin PAA ile Sentezlenen Biyokonjugatlarının MCF-7 Hücre Kültüründe Yapılan Analizlerine ait Tartışma

A β (1-21) peptidinin PAA ile $n=3$ ve $n=9$ olmak üzere 2 farklı n bağlanma derecesinde sentezlenen konjugatının, 0.05, 0.5, 2, 3.5, 5 mg/ml konsantrasyonlarında toksik etkisinin MTT yöntemi kullanılarak incelendiği deneylerde, yüksek konjugat konsantrasyonlarında hücre canlılığının kontrole göre düşüşte olduğu görülmektedir. Ancak bu konjugatların 0,05 mg/ml ve 0,5 mg/ml gibi düşük konsantrasyonlarında ise, hücre canlılığında kontrole göre önemli bir fark bulunmamaktadır. En yüksek konsantrasyon olan 5 mg/ml’de ise hücre canlılığının kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre en az seviyede olduğu gözlenmektedir. Şekil 5.11’de ise MTT yönteminde absorbans olarak okunan değerlerin % canlılık olarak ifadesi gösterilmiştir. Konjugat konsantrasyonu arttıkça, hücrelerin canlılığının azalmakta olduğu tespit edilmiştir. $n=3$ oranında sentezlenen konjugat için, en düşük konsantrasyon olan 0,05mg/ml’de hücre canlılığı %92.9 iken bu değer değer artan konsantrasyonlarda sırasıyla %80.4, %73.5, %71.5 ve %64.9 şeklinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.8 Aβ (1-21) peptidinin PAA ile sentezlenen n=3 konjugatının MCF7 hücrelerinin canlılığına etkisi

Yukarıdaki grafikteki değerler göz önünde bulundurulduğunda, MCF7 hücrelerinin %50'sine etki eden npeptid/nPAA=3 konjugatının konsantrasyonu, yani bu konjugatın IC₅₀ değeri 7,094 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.9 Aβ (1-21) peptidinin PAA ile sentezlenen n=11 konjugatının MCF7 hücrelerinin canlılığına etkisi

n=9 oranında sentezlenen konjugat için ise, en düşük konsantrasyon olan 0,05mg/ml'de hücre canlılığı %90,46 iken bu değer değer artan konsantrasyonlarda sırasıyla %73.6, %72.1, %72.16, %64.5 ve % 59.1 şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Yukarıdaki grafikteki değerler doğrultusunda, MCF7 hücrelerinin %50'sine etki eden npeptid/nPAA=11 konjugatının konsantrasyonu, yani bu konjugatın IC₅₀ değeri 5,87 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, npeptid/nPAA=3 oranının npeptid/nPAA=11 oranına göre hücre kültüründe daha düşük toksisiteye neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, her iki oranda da toksik etki ancak çok yüksek konsantrasyonlarda görülmüştür. In vivo çalışmalar için gerekli olan düşük konsantrasyonlarda ise, hücre kültüründe önemli bir toksik etkisinin olmaması bu bileşiklerin ileride deney hayvanları ile yapılacak çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir. MTT ile yapılan analizler sonucunda elde edilen morfoloji sonuçlarında, Şekil 4.64'de kontrol hücrelerinin morfolojileri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi hücreler, intakt ve tutunmuş normal morfolojiye sahiptirler. Sırasıyla bu hücrelere verilen 0.05, 0.5, 2, 3.5 ve 5 mg/ml Aβ (1-21) peptidinin PAA ile n=3 konjugatına maruz kalmış MCF7 hücrelerinin morfolojileri incelendiğinde, hücrelerin kontrole benzer şekilde, morfolojilerinin düzgün olduğu intakt hücrelerle beraber uzantılarını kaybetmiş yuvarlak hücreler de bulunmaktadır (Şekil 4.65a-f). Aβ (1-21) peptidinin PAA ile konjugatının en yüksek konsantrasyonu (5 mg/ml) bulunan kültür ortamında hücrelerin mikroskopik görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.65f). Şekil 4.65f'deki görüntüler bu grupta yer alan hücrelerin atipik forma dönüşmüş, büzülüp küçülmüş, yüzey uzantılarını kaybetmiş hücre sayısının oldukça fazla olduğunu göstermektedir. Canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi, sarı renkli MTT reaktifini, mor renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir. Şekil 4.64'te MTT reaktifi eklenmiş kontrol grubundaki hücrelerdeki formazan kristali oluşumları gösterilmiştir. Hücrelerin neredeyse tamamında formazan kristalleri oluşmuş olması hücrelerin canlılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir. n=9 oranında sentezlenen konjugat için de, morfoloji sonuçları benzerlik taşımaktadır. Şekil 4.69'da hücrelerin morfolojik görüntüleri görülmekte iken, Şekil 4.70'te ise MTT yöntemi ile formazan kristali oluşumları görülmektedir. Sonuç olarak, Aβ (1-21) peptidi-PAA biyokonjugatlarının bulunduğu kültür ortamında hücrelerin mikroskopik görüntülerinden ve MTT yöntemi ile incelendiğinde;

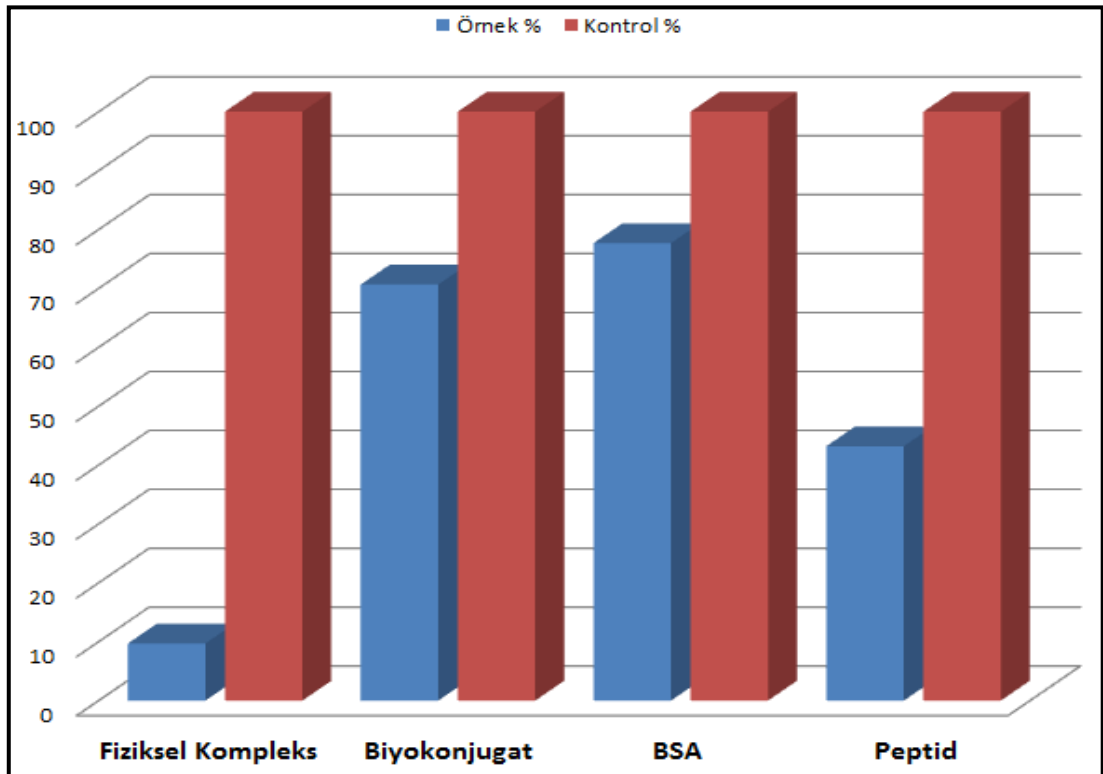
- $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$ oranının $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ oranına göre hücre kültüründe **daha düşük toksisitesi** olduğunu görülmektedir.
- Biyokonjugatların düşük konsantrasyonlarında kontrole göre morfolojik olarak önemli bir fark görülmemiştir.
- Her iki oranda da toksik etki ancak **çok yüksek konsantrasyonlarda** görülmüştür.
- *In vivo* çalışmalar için gerekli olan çok düşük konsantrasyonlarda ise, hücre kültüründe önemli bir toksik etkisinin olmaması, bu konjugatların ileride deney hayvanları ile yapılacak çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir.

5.1.1.6.2 Sentezlenen A β (1-21) Peptid Dizisinin Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerinin İnsan Fibroblast Hücrelerindeki Etkilerinin xCELLienge System ile İncelenmesine ait Sonuçlar

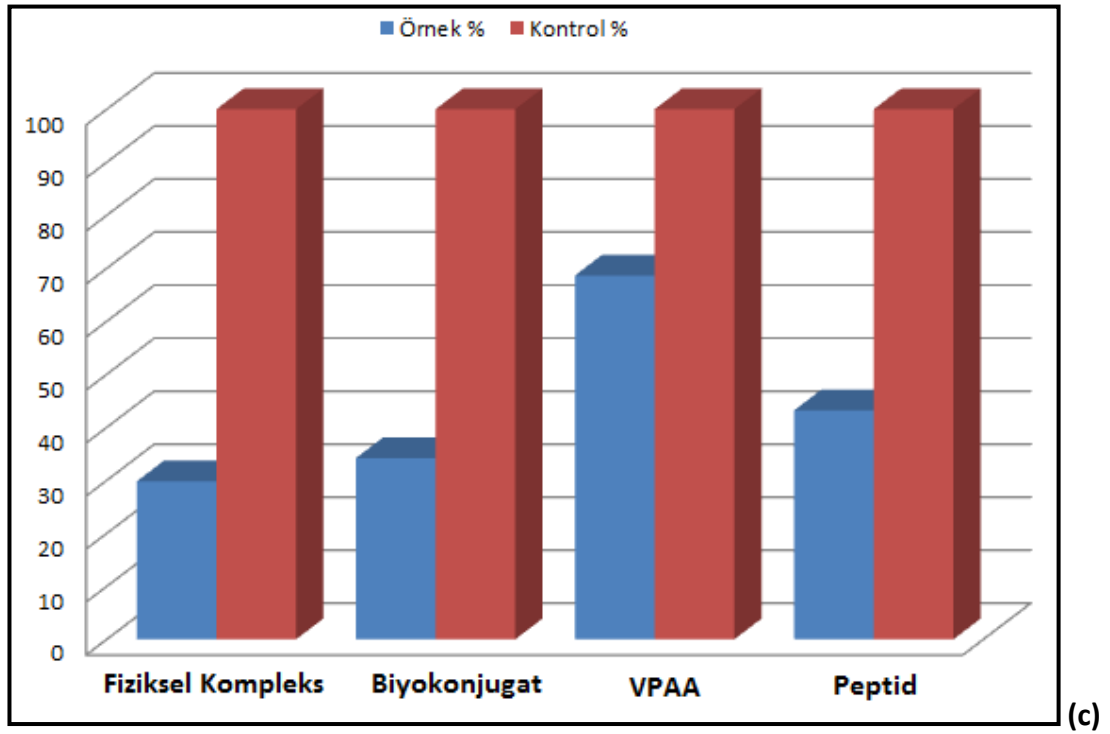
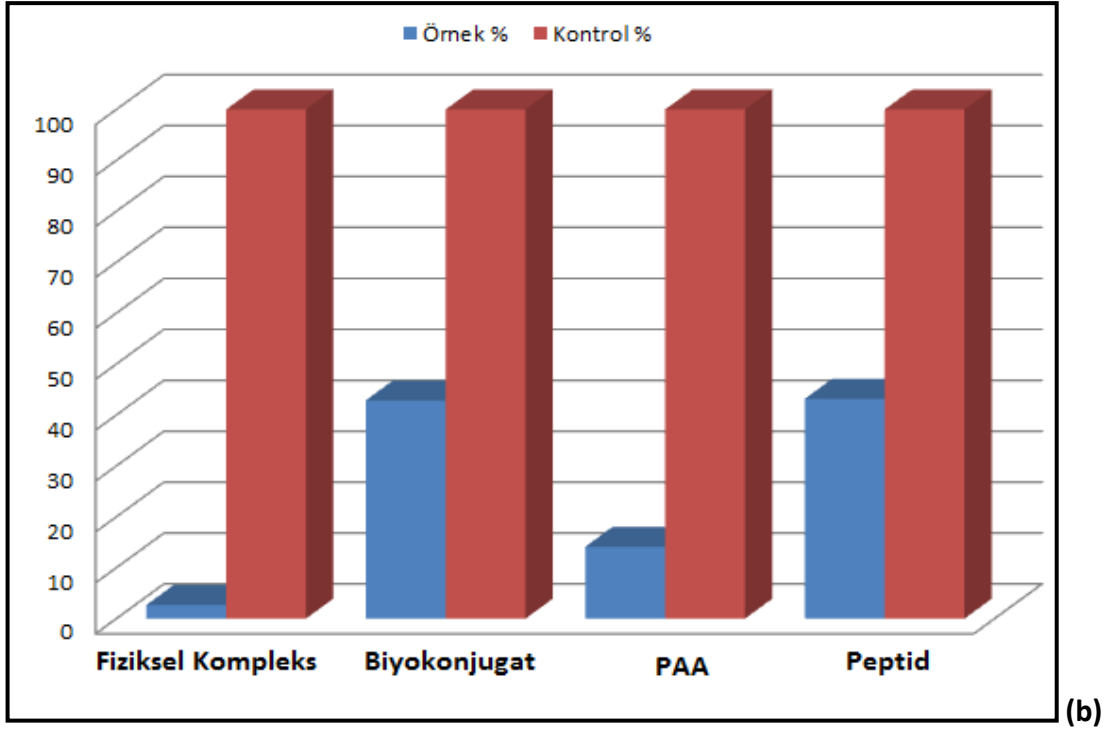
XCELLienge cihazında gerçek zamanlı olarak yapılan ölçümlerde, kontrol grubuna ait 2 kuyucuktan birinde sadece boş medium diğerinde ise sadece medium verilmiş olan HUVEC hücreleri yer almaktadır.

Şekil 4.75'te de görüldüğü gibi, sadece hücrelerin olduğu kuyucukta hücre çoğalmasına etki eden herhangi bir etken madde olmadığından hücreler çoğalmaya devam etmiştir. Bu gruptaki hücrelerin 74 saat sonundaki hücre indeksi değeri ise 7'nin üzerindedir. Buna karşılık sadece medium içeren ve hücre içermeyen kuyucuktan alınan ölçümler ise sıfırı göstermektedir (Şekil4.87). Bu sonuçlar bize cihazın aldığı ölçümlerin doğruluğu hakkında net bir bilgi vermektedir. Kontrol grubu dışında E Plate 96'ya A β (1-21) ve A β (1-15) peptid dizilerinin PAA, BSA ve VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel kompleks örnekleri ile, tek başına peptid ve tek başına taşıyıcı makromoleküllerin kendileri verilmiştir. A β (1-21) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatı ve fiziksel kompleksinin, tek başına peptid molekülü ve BSA ile karşılaştırmalı olarak verilen analiz sonucunu incelediğimizde, biyokonjugatın, tek başına peptidin ve tek başına BSA'nın verildiği kuyucuktaki HUVEC hücrelerinin hücre indeksi değerlerinde herhangi bir azalma gözlenmezken, fiziksel komplekse ait sonuçlarda ise hücre indeksinin 1'in altına düştüğü, yani hücrelerin çoğalma hızı gittikçe azalmış ve hücre apoptozları artmakta olduğu görülmektedir (Şekil4.88).

A β (1-21) peptid dizisinin PAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel kompleksinin, tek başına peptid molekülü ve PAA'nın sonuçları kıyaslandığında ise, PAA'nın hücre indeksi değeri literatürde belirtilen referans değer olan 1'e oldukça yakın olduğu ve fiziksel kompleksin hücre indeksinin ise, neredeyse sıfıra yakın ölçüldüğü yani 72 saat sonunda ortamda neredeyse hiç canlı hücre kalmadığını göstermektedir (Şekil4.89). A β (1-21) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugatı ve fiziksel kompleksinin, tek başına peptid molekülü ve VPAA ile karşılaştırmalı olarak verilen analiz sonuçlarında, VPAA'nın hücre indeksinin oldukça yüksek olduğu, VPAA ile sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatın HI değerlerinin birbirlerine çok yakın düzeyde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, A β (1-21) peptidi-VPAA biyokonjugatlarının ve fiziksel komplekslerinin canlı hücreler üzerinde hemen hemen aynı etkiyi yaptığını söyleyebiliriz (Şekil4.90). Yapılan analizler sonucunda elde edilen hücre indeksi değerlerinde kontrol grubunun HI üzerinden hesaplama yapılmış ve kontrol grubuna göre örnek uygulanan kuyucuklardaki canlı hücre sayısı % olarak hesaplanmıştır.



(a)



Şekil 5.10 Aβ (1-21) peptidinin (a) BSA, (b) PAA, (c) VPAA örnekleri ile yapılan analizler sonucunda hücre sayılarındaki değişimlerin yüzde olarak kıyaslamalı grafiği

Sonuç olarak bakıldığında, Aβ (1-21) peptidi ile EDC bağlanma yöntemi kullanılarak kovalent olarak bağlanan biyokonjugatlarının hücre indeks değerlerinin her üç taşıyıcı makromolekül için de daha iyi sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz. Böylece ilerleyen

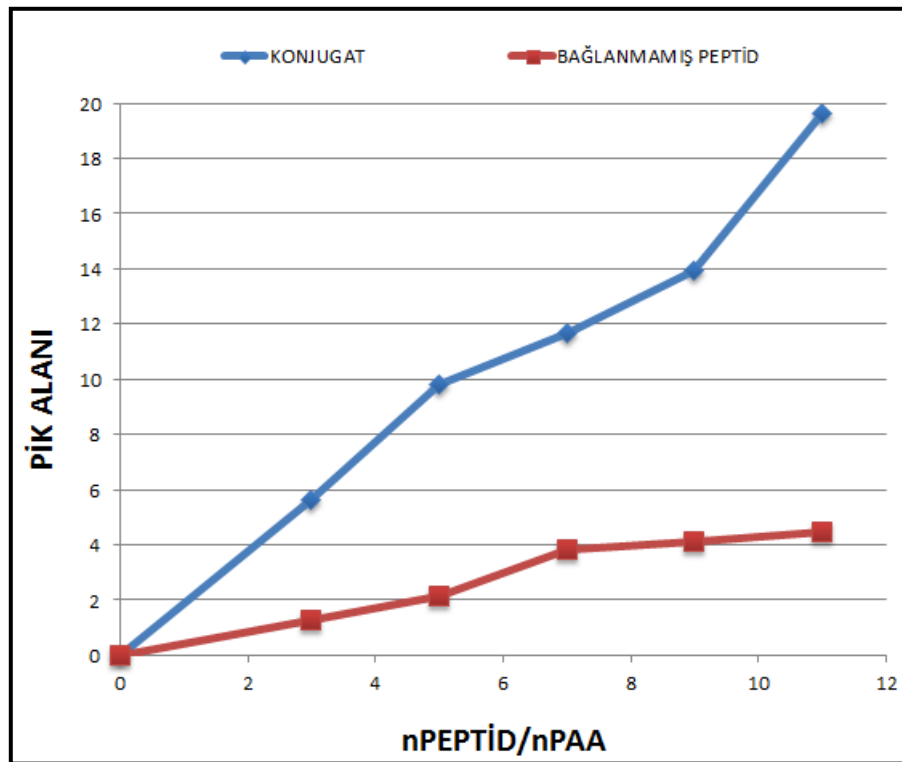
çalışmalarda, hayvan deneyleri sırasında, fiziksel kompleksler veya tek başına peptid dizisi ile çalışmak yerine bu peptidin biyokonjugatlarını kullanmak, bize zaman ve para tasarrufu sağlayacaktır.

5.1.2 Aβ (1-15) Peptid Dizisinin Biyokonjugatları

5.1.2.1 Aβ (1-15) Peptid Dizisinin Poliakrilik Asit ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Aβ (1-15) 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. Bu koşulların kıyaslandığı HPLC kromatogramında 11. ile 15. dk.lar arasındaki pikler incelendiğinde, en verimli konjugasyonun Koşul2’de oluştuğunu görmekteyiz. Çünkü Koşul2’ye göre gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu sırasında, reaksiyona girmeden kalan peptid miktarının en az olduğu da, kromatogramdaki 20 ile 24. dakikalardan da görölmektedir (şekil 4.19). Floresans spektrumlarına göre karşılaştırma yaptığımızda ise, biyokonjugat oluşumunda en fazla dalga boyu kayması 10 nm’lik bir değer ile Koşul2’de gerçekleşmiştir (şekil 4.18). SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 10. ile 14. dakikalar arasında gözlenen ve biyokonjugasyon oluşumunu bize ifade eden pik alanı en büyük Koşul2’ye göre sentezlenen biyokonjugatta görölmüştür (şekil 4.20a). Aynı şekilde ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlara bakıldığında ise en büyük pik alanının Koşul2’ye göre sentezlenen biyokonjugata ait olduğu görölmektedir (şekil 4.20b). Tüm bu sonuçları göz önünde bulundurduğumuzda Aβ (1-15) peptidinin ile PAA’nın, EDC yöntemiyle biyokonjugasyonu için en verimli reaksiyon koşulunun Koşul2 olduğunu söyleyebiliriz. Bu doğrultuda bu peptid dizisi için PAA polimeri ile biyokonjugatları, npeptid/npolimer= 3:5:7:9:11 oranlarında, her bir biyokonjugat için 0.5 mg/ml sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine, değişen konsantrasyonlardaki peptid çözeltisinden eklenerek en verimli reaksiyon koşulu olan Koşul2’ye göre sentezlenmiştir.

Serbest peptid, tek başına PAA ve sentezlenen biyokonjugatı içeren HPLC kromatogramında ise, 10 ila 14. dakikalar arasındaki piklerden biyokonjugasyon oluşumu görülmektedir (Şekil 4.21). Ayrıca her bir koşulda sentezlenen biyokonjugatların UV Spektrofometrede UV absorbansları ölçülmüş, en iyi absorbans değerinin Koşul2'ye ait olduğu bulunmuştur (4.22). Farklı n bağlanma derecelerinde sentezlenen biyokonjugatlar, HPLC kromatogramlarında I. Pik bölgesi dediğimiz 10 ile 18.dk arasında görülmekte ve artan peptid konsantrasyonu ile polimere kovalent olarak bağlanmış peptid miktarı da artmaktadır. Bağlanmamış serbest peptidi ifade eden 20 ile 24.dk arasında yer alan II. Pik bölgesindeki piklerde ise, reaksiyona girmemiş serbest peptid miktarının yine n bağlanma derecesi arttıkça arttığı görülmektedir (4.23). Bu grafiklere ait sonuçlarda pik alanı ölçümlerinde yüksek n bağlanma oranlarına doğru gidildikçe, bağlanmadan kalan serbest peptid miktarının neredeyse sabit kaldığı görülmektedir (Şekil 5.13).



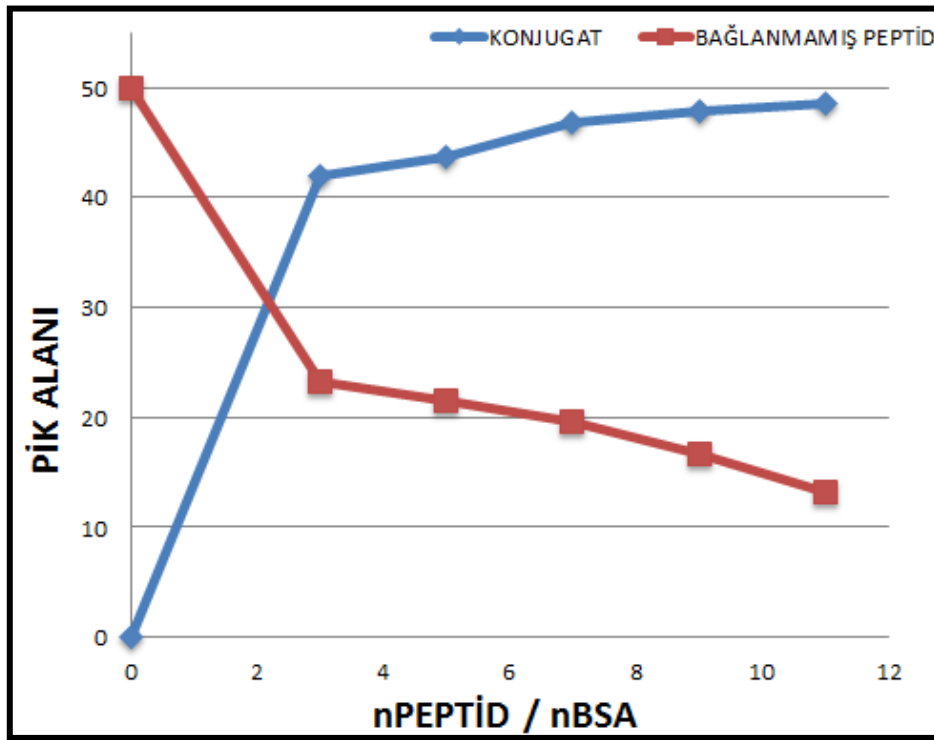
Şekil 5.11 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin PAA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

SEC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, I. Pik bölgesinde (10 ve 15. 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. Serbest yani polimer zinciri ile etkileşime girmemiş, bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise, n bağlanma derecesi ile orantılı olarak bağlanmamış peptid miktarı da artmaktadır (Şekil 4.25b). SEC cihazının ışık saçılması (RALS) dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, sentezlenen farklı mol oranlarındaki biyokonjugatların polimere ait ışık saçılması pikleri ile kıyaslaması yapıldığında, oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarının PAA ile kıyaslandığında hemen hemen aynı olduğu ve $n=11$ oranında sentezlenen biyokonjugatın molekül yarıçapının en yüksek konjugat olduğu görülmektedir (Şekil 4.25). A β (1-15) peptidinin PAA ile değişen oranlardaki biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptidin floresans spektrumu 347 nm’de gözlenmekte iken, etkileşim sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yine yaklaşık olarak 342 nm civarında izlenmektedir. Yaklaşık olarak 9 nm’lik dalga boyu kayması ve floresans şiddetlerindeki dramatik azalma net bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.24’teki $n=7$ oranındaki pik biyokonjugatının içerdiği peptid miktarı, serbest peptid pikiyle aynıdır. Aynı miktarda peptid içermesine rağmen kovalent konjugasyon sonucu elde edilen biyokonjugata ait spektrumda, peptidin polimer zinciri tarafından sıkı bir şekilde sarılmış olmasından dolayı spektral dalga boyunda 11 nm’lik kayma ve floresans şiddetinde çok ciddi bir azalma şeklinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.24).

5.1.2.2 A β (1-15) Peptid Dizisinin BSA ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

A β (1-15) Peptid Dizisinin BSA ile olan konjugasyonun da 3 farklı koşulda sentez yapılmış olmasına karşın, HPLC, UV Absorbansı ve Floresans grafiklerinden en iyi bağlanmanın PAA ile konjugasyonunda olduğu gibi Koşul2’de gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). Serbest peptid, tek başına PAA ve sentezlenen biyokonjugatı içeren HPLC kromatogramında 15 ila 19. dakikalar arasındaki piklerden biyokonjugasyon oluşumu net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.49).

Konjugasyon metoduna karar verilmesinin ardından, Koşul2'ye göre $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3:5:7:9:11$ oranlarında elde edilen biyokonjugatların karakterizasyonu, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. A β (1-15) Peptid dizisinin BSA ile biyokonjugatlarının HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz ve 15. ve 20. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında Peptid/BSA biyokonjugatları görülmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile, oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı piklerin şiddetlerinden anlaşılmaktadır. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, 21. ile 24. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında görülen, BSA proteinine bağlanmamış peptid moleküllerine ait pikler görülmektedir. Bu piklerin şiddetleri ise, oluşan konjugat piki ile ters orantılı olarak azaldığı gözlenmektedir (Şekil 4.51).



Şekil 5.12 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin BSA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

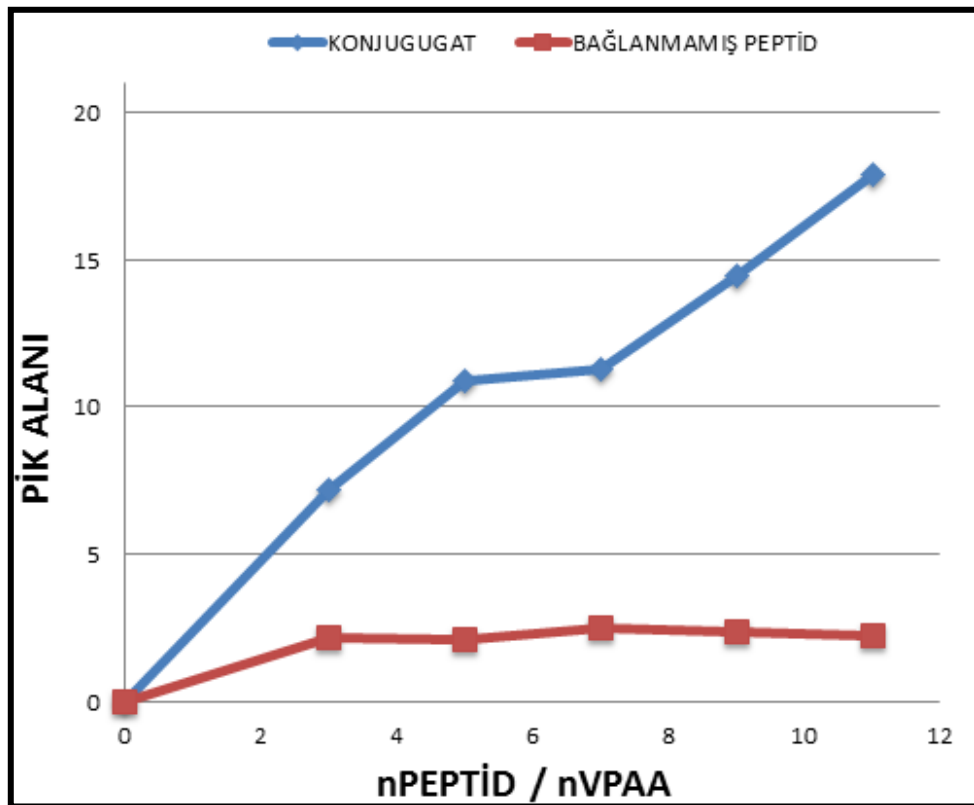
Peptid konsantrasyonunun artması ile ortamda oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı pik alanı grafiğinde açık olarak görülmektedir (Şekil 5.14). Reaksiyon ortamında az da bağlanmadan kalan serbest peptid molekülleri olmasına rağmen, n

bağlanma oranı arttıkça bağlanmadan kalan peptid miktarının azaldığı alan grafiklerinden de görülmektedir. Bu da bize elde edilen biyokonjugatların kuvvetli bağlanma gösterdiklerini göstermektedir. Aβ (1-15) Peptid dizisi amino ucunda yer alan bir tane Triptofan rezidüsü içermektedir. BSA proteini de iki tane Triptofan rezidüsüne sahiptir. Aβ (1-15) peptidi/BSA biyokonjugatı spektrofotometrik olarak incelendiğinde, her iki maddenin de yapısındaki floresans özellikli amino asitlerden dolayı farklı spektral özellikler gösterdiği bilinmektedir. **Serbest peptide** ait floresans spektrumunun maksimum dalga boyu 348 nm’de ve BSA’ya ait floresans spektrumunun maksimum dalga boyu 334 nm’de gözlenmekte iken, konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri mol oranına bağlı olarak yaklaşık olarak 332 nm ile 337 nm arasında izlenmektedir. Saf peptide göre peptid/BSA biyokonjugatlarının farklı mol oranlarında 26 ila 11 nm’lik dalga boyu kayması gözlenmektedir. Peptid konsantrasyonunun en az olduğu, en küçük mol oranı olan 3 oranında bu rakam 11 nm iken, peptid konsantrasyonunun en fazla olduğu mol oranı olan 11 oranında ise bu 24 nm’lik dalga boyu kaymasına denk gelmektedir. Şekil 4.50’deki siyah renk ile gösterilen spektrum n=7 oranındaki serbest peptidi, yeşil ile gösterilen spektrum ise n= 7 oranındaki biyokonjugatı ifade etmektedir. Şekilden görüldüğü üzere aynı miktarda serbest peptid içermesine rağmen, EDC yöntemi ile Koşul2’ye göre yapılan, kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugatta serbest peptide kıyasla, 22 nm’lik spektral kayma ve floresans şiddetinde azalma gözlenmiştir. Biyokonjugat oluşumunun çok güçlü olduğu floresans spektroskopisi ile de spektral olarak da ispatlanmaktadır (Şekil 4.50). Biyokonjugatların SEC cihazı ile analizinde, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan görüldüğü üzere, I. Pik bölgesinde (14 ve 19. dakikalar arasında) konjugatdaki peptid konsantrasyonunun artması ile, belirgin bir şekilde arttığı ve HPLC sonuçları ile benzer şekilde bağlanmamış peptid moleküllerindeki azalma görülmektedir (Şekil 4.52a). 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 oldukça güçlü bir şekilde bağlandığı görülmektedir (Şekil 4.52). SEC cihazında ışık saçılması (RALS) dedektöründen elde edilen peptid/BSA biyokonjugatlarının piklerini, tek başına peptid ve tek başına BSA’ya ait olan kromatogramlardaki pik değerleri ile kıyasladığımızda, biyokonjugatların moleköl

boyutlarındaki artışın $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$ oranına bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Her bir artan n oranında peptid konsantrasyonu da arttığından, BSA ile bağlanan peptid molekülleri sayesinde oluşan biyokonjugatın yarıçapı büyümektedir (Şekil 4.52c).

5.1.2.3 A β (1-15) Peptid Dizisinin N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) ile Biyokonjugasyonuna ait Tartışma

Molekül ağırlığı 80.000 Da olarak bölümümüzde sentezlenen VP/AA kopolimeri, antijenik A β (1-15) Peptidi ile 2 farklı koşul kullanılarak sentezlenmiştir. Bu koşullara ait konjugatlar sentezlendikten sonra yapılan analizler sonucunda, yine pH 5'te polimer aktivasyonunun yapıldığı ve daha önceki konjugasyonlarda kullanılan metodun daha verimli bağlandığı gözlenmiştir (Şekil 4.33, 4.34). Ayrıca konjugasyonun gerçekten gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için de, sentezlenen biyokonjugat, tek başına peptid ve tek başına VPAA kıyaslamalı olarak Şekil 4.35'de verilmiştir.

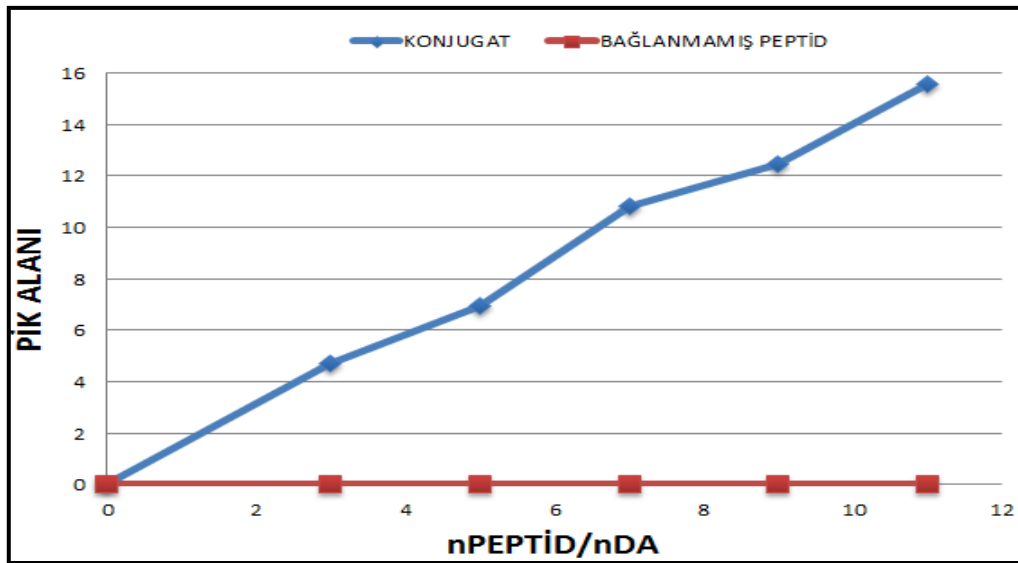


Şekil 5.13 Farklı mol oranlarında sentezlenen A β (1-15) peptidinin VPAA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

A β (1-15) peptidinin VPAA kopolimeri ile sentezlediğimiz biyokonjugatlarının HPLC kromatogramları incelendiğinde, 9,5. ve 19. Dakikalar arasında I. Pik bölgesinde oluşan biyokonjugatlar ve II. Pik bölgesinde ise polimer zincirine bağlanmamış yani reaksiyona girmemiş serbest peptid görülmektedir (Şekil 4.37). Kromatogramlar incelendiğinde, pik alanlarından da anlaşılacağı üzere, biyokonjugatların n bağlanma oranı arttıkça konjugat oluşumu da artmakta ve I. Pik bölgesindeki piklerin alanları büyümektedir. Buna karşılık polimer zincirine bağlanmamış serbest peptid miktarını ifade eden II. Pik bölgesindeki piklerin alanlarının ise, oldukça düşük değerlerde kaldığı ve biyokonjugatların pik alanları ile kıyaslandığında çok daha küçük olduğu görülmektedir (Şekil 4.37 ve Şekil 5.15). A β (1-15) peptidinin VPAA kopolimeri ile biyokonjugatlarına ait floresans spektrumlarında ise, serbest peptide ait floresans spektrumu 348 nm’de gözlenmekte iken konjugasyon sonucunda biyokonjugatlara ait piklerin maksimum floresans şiddetleri yaklaşık olarak 338 nm civarında izlenmektedir yani yaklaşık 10 nm’lik dalga boyu kayması görülmektedir. Kovalent konjugasyon ile oluşan biyokonjugatlardaki peptid molekülünün VPAA kopolimeri tarafından sıkı bir şekilde sarılması ve çözücü ortamından uzaklaşması, spektral olarak dalga boyunda 10 nm’lik kayma ve floresans şiddetinde azalma gibi değişiklikler göstermiştir (Şekil 4.35). Sentezlenen biyokonjugatların SEC cihazı ile incelenmesinde ise, UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda, I. Pik bölgesinde (9.5 ve 17. dakikalar arasında) biyokonjugatdaki peptid oranının artmasıyla belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Biyokonjugatın yapısına katılan peptid konsantrasyonu arttığında, VPAA kopolimeri ile bağlanan peptid miktarı da artmaktadır. Serbest yani polimer zincirine bağlanmamış peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde ise, konjugatın n mol oranı arttıkça, serbest peptid miktarı da azalmaktadır (Şekil 4.37a). RALS dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise sonuç oldukça çarpıcı şekilde görülmektedir. Oluşan biyokonjugatların molekül boyutlarındaki artışın, genel olarak mol oranına bağlı şekilde arttığı ve $n=11$ oranına sahip konjugatının hepsine göre en yüksek alana sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.38b). Sonuç olarak, UV spektrumlarından, SEC cihazından elde edilen kromatogramlardan, HPLC sonuçlarından ve Floresans spektrumlarından görüldüğü üzere, her bir mol oranı için karbodiimid varlığında kovalent konjugasyonda peptid moleküllerinin VPAA kopolimeri ile kuvvetli bir şekilde bağlandığı ispatlanmıştır.

5.1.2.4 Aβ (1-15) Peptid Dizisinin Dekstran Aldehid (DA) ile Biyokonjugasyonuna Ait Tartışma

Aβ (1-15) Peptid Dizisi ile Dekstran Aldehidin konjugasyonunda, diğer taşıyıcı makromoleküllerden farklı ve tek bir bağlama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde peptid ile DA birbirine Schiff Bazı oluşumu üzerinden direkt olarak kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ancak diğer konjugasyon reaksiyonlarında olduğu gibi, yine $n_{\text{peptid}}/n_{\text{DA}}$ 3:5:7:9:11 olmak üzere farklı bağlanma dereceleri üzerinden konjugatlar sentezlenmiş ve spektroskopik ve kromatografik analizleri yapılmıştır. Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-15) Peptidinin DA ile elde edilen biyokonjugatlarının UV spektrometre ile ölçümünde, absorbands değerlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{DA}}$ oranı arttıkça arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeni, biyokonjugatların yapısına katılan peptid miktarının artmasıyla, DA ile bağlanan peptid miktarının da artması, sonuçta oluşan biyokonjugatın UV absorbandsını da arttırmıştır (Şekil 4.58). HPLC kromatogramı incelendiğinde, n bağlanma derecesi arttıkça, DA ile bağlanan peptid miktarı da artmakta ve oluşan biyokonjugata ait 16. Dakikalar ile 21. Dakikalar arasındaki piklerdeki artış net olarak görülmektedir. Ayrıca aynı kromatogramda DA ile reaksiyona girmemiş peptidi ifade eden II. Pik bölgesinde, yaklaşık 20 ile 23. dakikalar arasında ise serbest peptide ait herhangi bir pik gözlenmemektedir (Şekil 4.59).



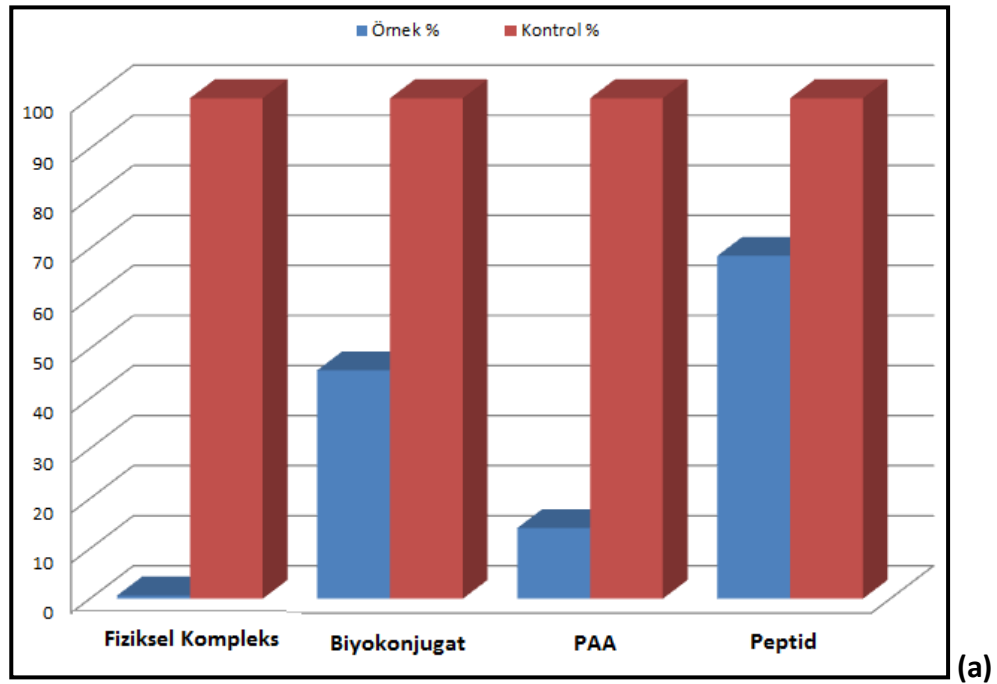
Şekil 5.14 Farklı mol oranlarında sentezlenen Aβ (1-15) peptidinin DA ile biyokonjugasyonunda (◆) biyokonjugat ve (■) bağlanmamış peptidlere ait pik alanı grafiği

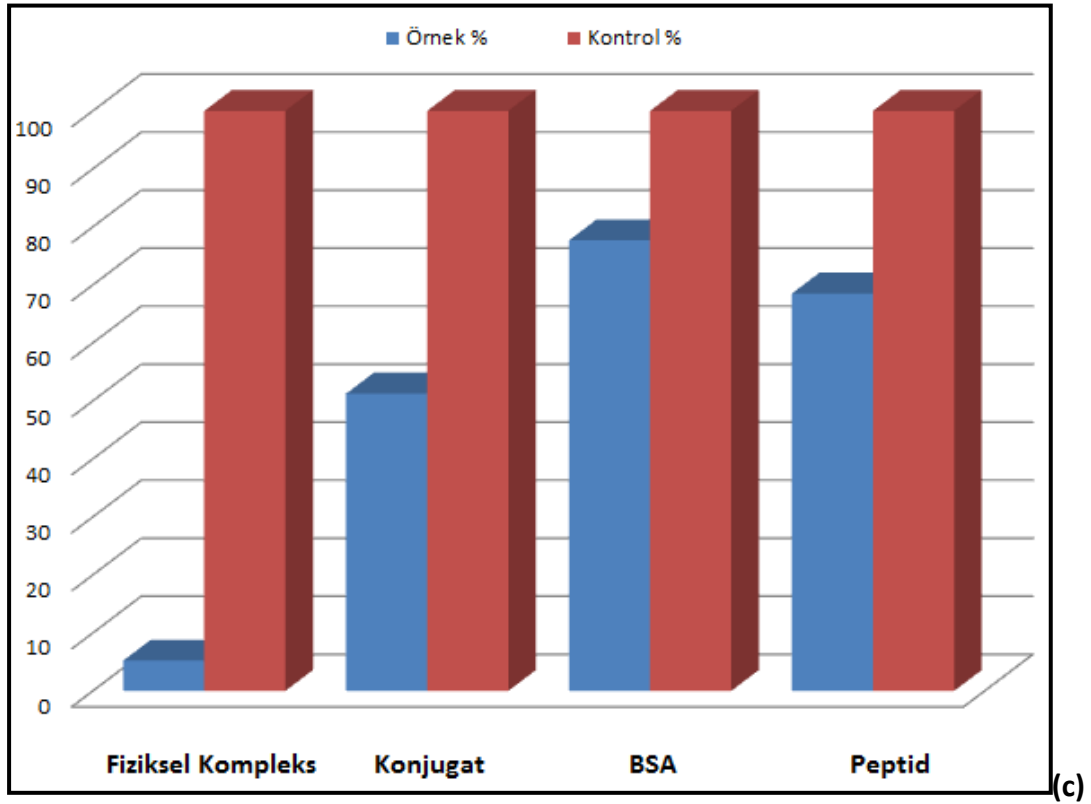
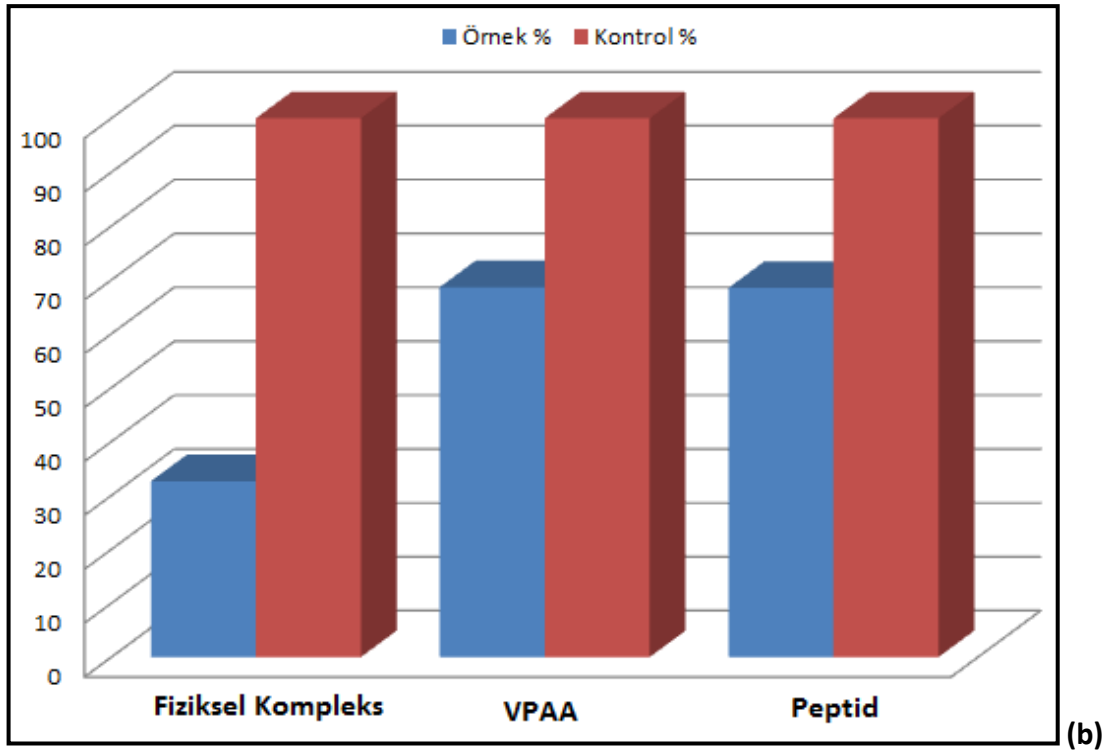
Aynı biyokonjugatların SEC analizlerini incelediğimiz de ise, UV detektöründe yine bağlanmamış serbest peptid olmaksızın, biyokonjugatın artan n bağlanma derecelerine bağlı olarak artan pikler gözlenmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile oluşan biyokonjugat miktarının da arttığı, pik alanı grafiğinde açık olarak görülmektedir (Şekil 5.61a). SEC cihazının RALS detektöründen elde edilen kromatogramında ise, DA piki ile karşılaştırıldığında, peptidin artan oranlarında biyokonjugatın yapısına daha fazla peptid katılması ile, oluşan biyokonjugatların molekül ağırlıklarının da artmış olduğunu görmekteyiz (Şekil 4.61b). Biyokonjugatların Floresans Spektroskopisi analizlerinde ise, tek başına peptid molekülünün spektrumuna ait $\lambda_{\max}$ değerinin, aynı peptidin DA ile bağlanması sonucu oluşan biyokonjugatların $\lambda_{\max}$ değerlerine göre yaklaşık 6-7 nm'lik bir sola kayma (Blue Shift) gösterdiğini görmekteyiz. Bunun nedeni, biyokonjugasyon oluşurken, peptidin amino ucunda yer alan triptofan, serbest peptide göre çözeltilen uzaklaşarak daha hidrofobik kısımlara çekilmiştir ve bunun sonucu olarak da floresans şiddetinde azalma ve daha küçük dalga boyuna kayma gözlenmektedir (Şekil 4.60).

5.1.1.4.1 Sentezlenen A β (1-15) Peptid Dizisinin Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerinin İnsan Fibroblast Hücrelerindeki Etkilerinin xCELLieng System ile İncelenmesine ait Sonuçlar

XCELLieng cihazında gerçek zamanlı olarak yapılan ölçümlerde, kontrol grubuna ait 2 kuyucuktan birinde sadece boş medium diğerinde ise sadece medium verilmiş olan HUVEC hücreleri yer almaktadır. Şekil 4.75'te de görüldüğü gibi, sadece hücrelerin olduğu kuyucukta hücre çoğalmasına etki eden herhangi bir etken madde olmadığından hücreler çoğalmaya devam etmiştir. Bu gruptaki hücrelerin 74 saat sonundaki hücre indeksi değeri ise 7'nin üzerindedir. Buna karşılık sadece medium içeren ve hücre içermeyen kuyucuktan alınan ölçümler ise sıfırı göstermektedir (Şekil 4.87). Bu sonuçlar bize cihazın aldığı ölçümlerin doğruluğu hakkında net bir bilgi vermektedir. Kontrol grubu dışında E Plate 96'ya A β (1-15) peptid dizisinin PAA, BSA ve VPAA ile sentezlenen biyokonjugat ve fiziksel kompleks örnekleri ile, tek başına peptid ve tek başına taşıyıcı makromoleküllerin kendileri verilmiştir. A β (1-15) peptid dizisinin BSA ile sentezlenen biyokonjugatı ve fiziksel kompleksinin, tek başına peptid molekülü ve BSA ile karşılaştırmalı olarak verilen analiz sonucunu incelediğimizde,

biyokonjugatın, tek başına peptidin ve tek başına BSA'nın verildiği kuyucuktaki HUVEC hücrelerinin hücre indeksi değerlerinde herhangi bir azalma gözlenmezken, fiziksel komplekse ait sonuçlarda ise hücre indeksinin 1'in altına düştüğü, yani hücrelerin çoğalma hızı gittikçe azalmış ve hücre apoptozları artmakta olduğu görülmektedir (Şekil4.91). Aβ (1-15) peptid dizisinin VPAA ile sentezlenen biyokonjugatı ve fiziksel kompleksinin, tek başına peptid molekülü ve VPAA ile karşılaştırmalı olarak verilen analiz sonuçlarında, VPAA'nın hücre indeksinin oldukça yüksek olduğu, VPAA ile sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatın HI değerlerinin birbirlerine çok yakın düzeyde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, Aβ (1-21) peptidi-VPAA biyokonjugatlarının ve fiziksel komplekslerinin canlı hücreler üzerinde hemen hemen aynı etkiyi yaptığını söyleyebiliriz (Şekil4.94). Yapılan analizler sonucunda elde edilen hücre indeksi değerlerinde kontrol grubunun HI değeri üzerinden hesaplama yapılmış ve kontrol grubuna göre örnek uygulanan kuyucuklardaki canlı hücre sayısı % olarak hesaplanmıştır.





Şekil 5.15 Aβ (1-21) peptidinin (a) PAA, (b) VPAA, (c) BSA örnekleri ile yapılan analizler sonucunda hücre sayılarındaki değişimlerin yüzde olarak kıyaslamalı grafiği

Sonuç olarak bakıldığında, Aβ (1-15) peptidi ile EDC bağlanma yöntemi kullanılarak kovalent olarak bağlanan biyokonjugatlarının hücre indeks değerlerinin her üç taşıyıcı

makromolekül için de daha iyi sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz. Böylece ilerleyen çalışmalarda, hayvan deneyleri sırasında, fiziksel kompleksler veya tek başına peptid dizisi ile çalışmak yerine bu peptidin biyokonjugatlarını kullanmak, bize zaman ve para tasarrufu sağlayacaktır.

5.2 Kompleks Oluşumu Yöntemine Ait Tartışmalar

5.2.1 PAA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar

Her iki peptid dizisinde, PAA ile 2 farklı reaksiyon koşulu kullanılarak fiziksel kompleksleri sentezlenmiştir. Şekil 4.62 ve 4.63'te her iki peptid için sentezlenen fiziksel komplekslere ait floresans spektrumu yer almaktadır. Hem A β (1-21) hem de A β (1-15) peptid dizisinde, pH 5 'te Fiziksel kompleks oluşumunun sağlandığı Koşul2, hem yaklaşık sola kayma gösterdiği hem de floresans şiddetlerindeki azalma göz önünde bulundurulduğunda en iyi sonuçları vermiştir. Farklı oranlarda sentezlenen fiziksel komplekslere ait floresans spektrumlarına baktığımızda, A β (1-21) peptidi ile sentezlenenlerde serbest peptide göre yaklaşık 16 nm'lik net bir sola kayma olduğunu ve kompleksin yapısına giren peptid miktarının azalması ile floresans şiddetinin de azaldığını görmekteyiz (Şekil 4.64). Benzer şekilde, A β (1-15) peptidi ile sentezlenenlerkomplekslerde serbest peptide göre yaklaşık 9 nm'lik bir sola kayma olduğunu ve kompleksin yapısına giren peptid miktarının azalması ile floresans şiddetinin de azaldığını görmekteyiz (Şekil 4.65).A β (1-21) peptidi ile sentezlenen FK'lerin HPLC kromatogramlarında kompleks oluşumunu 10. ile 18. Dakikalar arasında, artan *n* bağlanma derecelerinde arttığını, peptide ait piki ise, 20 ile 24. dakikalarda görmekteyiz (Şekil 4.66). A β (1-15) peptidi ile sentezlenen FK'lerin kompleks oluşumunu 9. ile 14. dakikalar arasında, artan *n* bağlanma derecelerinde arttığını, peptide ait piki ise, 20 ile 24. dakikalarda görmekteyiz (Şekil 4.68)Bu sonuçlar doğrultusunda peptid molekülleri ile PAA arasında fiziksel kompleks oluşumu söz konusu olduğunu söyleyebiliriz.

5.2.2 BSA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar

Bu çalışmada kullanılan peptid dizilerinin her ikisi de BSA gibi hem hidrofobik residüleri ile etkileşime girebilen, hem de hidrofilik ve yüklü residüleri ile elektrostatik olarak da etkileşen bir makromolekül ile oldukça iyi bağlanmış fiziksel kompleksler oluşturmuşlardır. Özellikle her iki dizi ile yapılan HPLC analizleri bunu doğrulamaktadır. A β (1-15) peptidi ile sentezlenen FK'ler, BSA ile peptidin birbiriyle etkileşime girebileceği düşünülen 3 farklı pH'da sentezlenmiştir. Bu pH değerleri sırasıyla; BSA'nın nötre yakın olduğu pH 5, pH 7 ve pH 6'dır. Floresans sonuçları, en iyi etkileşimin, pH 5'te gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil4.70). Ayrıca SEC ile yapılan analizlerde, UV detektörü sonuçları en fazla kompleks oluşumunun yine Koşul2'de gerçekleştiğini net bir şekilde ortaya koymaktadır (Şekil4.71a). Bu sonuçları doğrulayan başka bir grafik ise, RALS kromatogramlarıdır. RALS detektöründen alınan sonuçlarda da, molekül yarı çapı en büyük molekül yani fiziksel kompleks, Koşul2'de meydana gelmiştir. Koşul2'ye göre $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3:5:7:9:11$ oranlarında elde edilen fiziksel komplekslerin karakterizasyonu, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. A β (1-15) Peptid dizisinin BSA ile fiziksel komplekslerinin HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz ve 16. ve 20. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında Peptid/BSA fiziksel kompleksleri görülmektedir. Peptid konsantrasyonunun artması ile, oluşan fiziksel kompleks miktarının da arttığı piklerin şiddetlerinden anlaşılmaktadır. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, 21. ile 24. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında görülen, BSA proteinine bağlanmamış peptid moleküllerine ait pikler görülmektedir. Bu piklerin şiddetleri ise, oluşan fiziksel kompleks piki ile kıyaslandığında ters orantılı şekilde azaldığı görülmektedir. Bunun en önemli nedeni ise, kompleksin yapısına katılan peptid miktarının gittikçe artması ve buna bağlı olarak da ortamda kompleks oluşumuna katılacak olan peptid miktarının azalmasıdır. HPLC kromatogramlarından elde edilen veriler doğrultusunda peptid ile BSA'nın kuvvetli bir şekilde bağlandığını ifade edebiliriz (Şekil 4.73). A β (1-21) peptidi ile sentezlenen FK'leri de benzer şekilde, BSA ile peptidin birbiriyle etkileşime girebileceği düşünülen 3 farklı pH'da sentezlenmiştir. Bu pH değerleri sırasıyla; BSA'nın nötre yakın olduğu pH 5, pH 7 ve pH 5,75'dir. Floresans sonuçları, en iyi etkileşimin, Koşul1 yani pH 5'te gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil4.70).

Koşul1'e göre $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3:5:7:9:11$ oranlarında elde edilen fiziksel komplekslerin karakterizasyonu, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. A β (1-21) Peptid dizisinin BSA ile fiziksel komplekslerinin HPLC kromatogramlarında, I. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz ve 14. ve 18. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında Peptid/BSA fiziksel kompleksleri görülmektedir. n bağlanma derecesinin artmasıyla, ile, oluşan fiziksel kompleks miktarının hemen hemen sabit kaldığı ancak buna karşılık. II. Pik bölgesi olarak ifade ettiğimiz, 21. ile 25. dakikalar arasındaki alıkonma zamanında görülen, BSA proteinine bağlanmamış peptid moleküllerine ait piklerin ise peptid miktarının artmasıyla orantılı olarak arttığı görülmektedir. Bu durum bize, kompleksin yapısına katılan peptid miktarının n bağlanma derecesi veya çözeltideki serbest peptid miktarına bağlı olmadığını göstermektedir (Şekil 4.78). Ayrıca SEC ile yapılan analizlerde, UV detektörü sonuçları da bunu doğrulamaktadır (Şekil4.77a).

5.2.3 VPAA ile Sentezlenen Fiziksel Komplekslere ait Sonuçlar

VPAA ile A β (1-15) ve (1-21) Peptid dizlerinin fiziksel kompleks oluşumu yönteminde farklı reaksiyon koşulları kullanılarak 2 farklı sayıda fiziksel kompleks sentezlenmiştir. VPAA-A β (1-21) ve VPAA-A β (1-15) peptidlerinin farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VPAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ başlangıç molar oranlarda sentezlenen fiziksel kompleksleri, en iyi kompleks oluşumu gözlenen Koşul1'e göre yapılmıştır. Şekil 4.79'daki floresans spektrumunu incelediğimizde, yeşil renkli pikin A β (1-15) peptidine ait olduğunu görmekteyiz. Bu peptid ile elde edilen VPAA komplekslerine ait piklere baktığımızda orana bağlı olarak; dalga boyunda peptide göre yaklaşık 7 ile 12 nm'lik bir kayma gözlemleniyorken, floresans şiddetleri ise artış görülmektedir. Peptid-VPAA komplekslerinin etrafı çok sayıda su molekülü ile çevrilidir ve kompleksin yapısına giren peptid miktarı arttıkça fiziksel kompleks globular halden açık hale geçmekte ve böylece sistemin çevre ile etkileşimi ve dolayısıyla da enerjisi artmaktadır. Benzeri bir durum farklı oranlarda elde edilen VPAA-A β (1-21) komplekslerinin floresans spektrumlarında da gözlenmektedir. Komplekslerde serbest peptide göre yaklaşık, 11 ile 15 nm'lik bir sola kayma oluşmuş iken, floresans şiddetleri aynı nedenden ötürü artmıştır (Şekil 4.80). Sentezlenen bütün fiziksel kompleksler ile ilgili sonuçlar incelendiğinde, en kuvvetli kompleks oluşumlarının BSA ile olduğu görülmektedir. Bunun en büyük nedenlerinden biri de, BSA'nın taşıdığı farklı amino asitlerdeki $-\text{OH}$ $-\text{HN}_3^+$ ve $-\text{COO}^-$ gibi fonksiyonel gruplar ve

hidrofobik bölgeler dolayısıyla peptid molekülleri ile çok daha güçlü etkileşimlere girmesinden kaynaklanmaktadır. S

Bu tez çalışması sayesinde, 42 amino asitlik Amiloid beta peptidine ait farklı peptid epitopları kullanılarak değişik makromoleküller ile bağlanmış, biyokonjugatları ve kompleksleri oluşturulmuştur. Biyokonjugatların ve komplekslerin oluşumu farklı spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, suda çözünen karbodiimid varlığında kovalent bağlar ile oluşan biyokonjugatların daha verimli bağlanma gösterdiği ve çeşitli hücre kültürlerinde yapılan incelemelerinde ise, bu konjugatların toksik etkilerinin neredeyse olmadığı bulunmuştur.

Ayrıca beyin hücrelerinde amiloid birikimine neden olan A β peptidinin (1-21) fragmentinin, 3 boyutlu konformasyonları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu peptidin PAA gibi bir taşıyıcı makromolekülle bağlandığında, bükülerek β -tabaka yapısı oluşturmak yerine, tam tersine peptidin açılarak bu formdan uzaklaştığının bulunması, hem FRET yöntemi ile elde edilen deneysel veriler, hem de Moleküler Modelleme sonuçları ile teorik olarak ispatlanmıştır.

Bütün bu sonuçlar doğrultusunda, tez kapsamında elde edilen bilgiler Amiloid beta peptidinin neden olduğu Alzheimer Hastalığı'na karşı spesifik antikörlerin elde edilmesi, tanı kitlerinin ve biyosensörlerin oluşturulması ve sentetik aşının geliştirilmesi yönünde ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

- [1] Sipe, J.D. ve Cohen, A.S., (2000). "Review: history of the amyloid fibril", J Struct Biol, 130: 88-98.
- [2] Merlini, G. ve Bellotti, V., (2003). "Molecular mechanisms of amyloidosis", N Engl J Med, 349: 583-596.
- [3] Finch, C.E. ve Cohen, D.M., (1997). "Aging, metabolism, and Alzheimer disease: review and hypotheses", Exp Neurol, 143: 82-102.
- [4] Mustafaev, M., (2004). "Functionally Biopolymer Systems", Sigma Journal of Engineering and Natural Science, 4: 1-201.
- [5] Ozeroğlu, C., Namazova, N. ve Mustafaev, M.I., (1996). "The Complex Formation Between Polyacrylamide Containing Glycine end Groups and Bovin Serum Albumin in the Presence of Copper (II) in Neutral Aqueous Media", Colloid Polymer Science, 274: 418-427.
- [6] Mustafaev, M.I., Saraç, A.S. ve Erkol, A.Y., (1996). "Effects of Cu²⁺ on Stability and Composition of Water Soluble Ternary Polyacrylic Acid-Cu²⁺-Protein Complexes Against Polyelectrolytes and its Biological Properties Radiation Damage", Polymer Bulletin, 36 623-627.
- [7] Mustafaev, M.I., Yucel, F. ve Ozturk, S., (1996). "Cu²⁺-mediated Complex Formation Between Polyacrylic Acid (PAA) and Bovine Serum Albumin", Journal of Immunological Methods, 197: 31-37.
- [8] Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Nekrasov, A.V., Norimov, A. ve Petrov, R.V., (1984). "[Critical nature of the effect of the degree of polyelectrolyte polymerization on immunostimulating properties]", Dokl Akad Nauk SSSR, 274: 998-1001.
- [9] Mustafaev, M.I., Romanova, R.Y. ve Norimov, A.Sh., (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.
- [10] Petrov, R.V., Mustafaev, M.I. ve Norimov, A.Sh., (1992). "Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes", Harwood Acad. Pub., UK.
- [11] Mustafaev, M., Yucel, F. ve Çirakoglu, B., (1996). "Immune Response to Progesterone Involved in Cu²⁺-mediated Polyanion-Protein Complex-Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma clones", Immunology Letters, 52: 63-68.

- [12] Mustafaev, M.I., (1996). "“Biyopolymerler” (Biopolymers)", TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, Türkiye.
- [13] Mustafaev, M. ve Mustafaeva, Z., (2002). "Novel Polypeptide-Comprising Biopolimer Systems", Technology and Health Care, 10: 217-226.
- [14] Vas, J.C., Rajkumar, S., Tanyakitpisal ve Panas, C. (2001). "alzheimer’s disease: The Brain Killer, When old age becomes a disease", World Health Organization.
- [15] http://stemcelltreatments.in/yahoo_site_admin/assets/images/alzheimers_disease1.74165944_std.JPG. Alzheimer Hastalığı, 5 Mayıs 2014
- [16] Tarlacı, S., (2009). Kuantum Beyin: Bilinç-Beyin Sorununa Yeni Bilimsel Yaklaşım.
- [17] Selekler, K., (2010). "Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı", Geriatri Dergisi, 13/Özel Sayı 3: 9-14.
- [18] Emillien, G., Durlach, C., Minaker, L., Winblad, B., Gauthier, S. ve Maloteaux, J., (2005). Alzheimer Hastalığı, Nöropsikoloji ve Farmakoloji: Global Publishing, Birkhauser.
- [19] Wimo, A. ve Prince, M., (2010). "Alzheimer’s Disease International World Alzheimer Report 2010 The Global Economic Impact of Dementia", Alzheimer’s disease international (Adi).
- [20] Maltsev, A.V., Bystryak, S. ve Galzitskaya, O.V., (2011). "The role of beta-amyloid peptide in neurodegenerative diseases", Ageing Res Rev, 10: 440-452.
- [21] Selkoe, D.J., (2008). "Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease", Handb Clin Neurol, 89: 245-260.
- [22] Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. ve Pericak-Vance, M.A., (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", Science, 261: 921-923.
- [23] Reisberg, B., Borenstein, J., Salob, S.P., Ferris, S.H., Franssen, E. ve Georgotas, A., (1987). "Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment", J Clin Psychiatry, 48 Suppl: 9-15.
- [24] White, K.E. ve Cummings, J.L., (1996). "Schizophrenia and Alzheimer's disease: clinical and pathophysiologic analogies", Compr Psychiatry, 37: 188-195.
- [25] Bartus, R.T. ve Emerich, D.F., (1999). "Cholinergic markers in Alzheimer disease", JAMA, 282: 2208-2209.
- [26] Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. ve Quirion, R., (2002). "Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies", Prog Neurobiol, 68: 209-245.
- [27] Shen, Z.X., (2004). "Brain cholinesterases: III. Future perspectives of AD research and clinical practice", Med Hypotheses, 63: 298-307.

- [28] Muntane, G., Dalfo, E., Martinez, A. ve Ferrer, I., (2008). "Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies", *Neuroscience*, 152: 913-923.
- [29] Martin, L., Latypova, X. ve Terro, F., (2011). "Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease", *Neurochem Int*, 58: 458-471.
- [30] Di Domenico, F., Sultana, R., Barone, E., Perluigi, M., Cini, C., Mancuso, C., Cai, J. Pierce, W.M. ve Butterfield, D.A., (2011). "Quantitative proteomics analysis of phosphorylated proteins in the hippocampus of Alzheimer's disease subjects", *J Proteomics*, 74: 1091-1103.
- [31] Ittner, L.M. ve Gotz, J., (2011). "Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease", *Nat Rev Neurosci*, 12: 65-72.
- [32] Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H. ve Tarazi, F.I., (2012). "Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors", *Pharmacol Ther*, 134: 8-25.
- [33] Hardy, J.A. ve Higgins, G.A., (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis", *Science*, 256: 184-185.
- [34] Mudher, A. ve Lovestone, S., (2002). "Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?", *Trends Neurosci*, 25: 22-26.
- [35] Robinson, S.R. ve Bishop, G.M., (2002). "Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging*, 23: 1051-1072.
- [36] Talaga, P., (2004). "Inhibitors of beta-amyloid aggregation: still an issue of structure and function.", *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 1: 7-12.
- [37] <http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0553/bst0330553f01.htm>. Amiloid şelale hipotezi, 5 Mayıs 2014
- [38] Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D. ve Teplow, D.B. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism", *Nature*, 359: 322-325.
- [39] Findeis, M.A. (2000). "Approaches to discovery and characterization of inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization", *Biochim Biophys Acta*, 1502: 76-84.
- [40] Woo, H.N., Baik, S.H., Park, J.S., Gwon, A.R., Yang, S., Yun, Y.K. ve Jo, D.G., (2011). "Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease", *Biochem Biophys Res Commun*, 404: 10-15.
- [41] Dobson, C.M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease", *Trends Biochem Sci*, 24: 329-332.
- [42] Morgan, C., Colombres, M., Nunez, M.T. ve Inestrosa, N.C., (2004). "Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease", *Prog Neurobiol*, 74: 323-349.

- [43] Cutler, N.R. ve Sramek, J.J., (2001). "Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25: 27-57.
- [44] Boddapati, S., Levites, Y. ve Sierks, M.R., (2011). "Inhibiting beta-secretase activity in Alzheimer's disease cell models with single-chain antibodies specifically targeting APP", *J Mol Biol*, 405: 436-447.
- [45] Supnet, C. ve Bezprozvanny, I., (2011). "Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis", *Cell Calcium*, 50: 303-309.
- [46] Sonkusare, S.K., Kaul, C.L. ve Ramarao, P., (2005). "Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope", *Pharmacol Res*, 51: 1-17.
- [47] Pocernich, C.B. ve Butterfield, D.A., (2012). "Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease", *Biochim Biophys Acta*, 1822: 625-630.
- [48] Mecocci, P. ve Polidori, M.C., (2012). "Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease", *Biochim Biophys Acta*, 1822: 631-638.
- [49] Wilkinson, B.L., Cramer, P.E., Varvel, N.H., Reed-Geaghan, E., Jiang, Q., Szabo, A. Herrup, K., Lamb, B.T. ve Landreth, G.E., (2012). "Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging*, 33: 197 e121-132.
- [50] Xing, X., Sha, S., Li, Y., Zong, L., Jiang, T. ve Cao, Y., (2012). "Immunization with a new DNA vaccine for Alzheimer's disease elicited Th2 immune response in BALB/c mice by in vivo electroporation", *J Neurol Sci*, 313: 17-21.
- [51] Subramanian, S., Bveopadhyay, D., Mishra, P.K., Mathew, M. ve John, M., (2010). "Design and development of non-fibrillar amyloid b as a potential Alzheimer vaccine", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 393-397.
- [52] Lippincott, W.v.W., (2010). "Alzheimer Disease Drugs", *Nursing 2010 Drug Handbook*: 46-51.
- [53] Selkoe, D.J., (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy", *Physiol Rev*, 81: 741-766.
- [54] Golde, T.E., (2003). "Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted?", *J Clin Invest*, 111: 11-18.
- [55] Schenk, D., Barbour, R. Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S. Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. ve Seubert, P., (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", *Nature*, 400: 173-177.
- [56] Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P.,

- Schenk, D. ve Yednock, T., (2000). "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease", *Nat Med*, 6: 916-919.
- [57] Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, C., Lee, M., Motter, R., Nguyen, M., Reed, A., Schenk, D., Tang, P., Vasquez, N., Seubert, P. ve Yednock, T., (2003). "Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2023-2028.
- [58] Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M. Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. ve Westaway, D., (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease", *Nature*, 408: 979-982.
- [59] Lemere, C.A., Maron, R., Spooner, E.T., Grenfell, T.J., Mori, C., Desai, R., Hancock, W.W., Weiner, H.L. ve Selkoe, D.J., (2000). "Nasal A beta treatment induces anti-A beta antibody production and decreases cerebral amyloid burden in PD-APP mice", *Ann N Y Acad Sci*, 920: 328-331.
- [60] Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. ve Arendash, G.W., (2000). "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease", *Nature*, 408: 982-985.
- [61] Weiner, H.L., Lemere, C.A., Maron, R., Spooner, E.T., Grenfell, T.J., Mori, C. Issazadeh, S., Hancock, W.W. ve Selkoe, D.J., (2000). "Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease", *Ann Neurol*, 48: 567-579.
- [62] Gandy, S., DeMattos, R.B., Lemere, C.A., Heppner, F.L., Leverone, J., Aguzzi, A. Ershler, W.B., Dai, J., Fraser, P., St George Hyslop, P., Holtzman, D.M., Walker, L.C. ve Keller, E.T., (2004). "Alzheimer's Abeta vaccination of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)", *Mech Ageing Dev*, 125: 149-151.
- [63] Lemere, C.A., Beierschmitt, A., Iglesias, M., Spooner, E.T., Bloom, J.K., Leverone, J.F., Zheng, J.B., Seabrook, T.J., Louard, D., Li, D., Selkoe, D.J., Palmour, R.M. ve Ervin, F.R., (2004). "Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet", *Am J Pathol*, 165: 283-297.
- [64] Nicoll, J.A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H. ve Weller, R.O., (2003). "Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report", *Nat Med*, 9: 448-452.
- [65] Bayer, A.J., Bullock, R., Jones, R.W., Wilkinson, D., Paterson, K.R., Jenkins, L., Millais, S.B. ve Donoghue, S., (2005). "Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD", *Neurology*, 64: 94-101.
- [66] Cribbs, D.H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N. Babikyan, D., Kessler, P., Kieber-Emmons, T., Cotman, C.W. ve Agadjanyan, M.G.,

- (2003). "Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid", *Int Immunol*, 15: 505-514.
- [67] Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A. ve Hock, C., (2003). "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization", *Neurology*, 61: 46-54.
 - [68] Ferrer, I., Boada Rovira, M., Sanchez Guerra, M.L., Rey, M.J. ve Costa-Jussa, F., (2004). "Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease", *Brain Pathol*, 14: 11-20.
 - [69] Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F. ve Orgogozo, J.M., (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial", *Neurology*, 64: 1553-1562.
 - [70] Geylis, V., Kourilov, V., Meiner, Z., Nennesmo, I., Bogdanovic, N. ve Steinitz, M., (2005). "Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults", *Neurobiol Aging*, 26: 597-606.
 - [71] McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M.E., Tian, X., Phinney, A.L., Manea, M., French, J.E., Lambermon, M.H., Darabie, A.A., Brown, M.E., Janus, C., Chishti, M.A., Horne, P., Westaway, D., Fraser, P.E., Mount, H.T., Przybylski, M. ve St George-Hyslop, P., (2002). "Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis", *Nat Med*, 8: 1263-1269.
 - [72] Agadjanyan, M.G., Ghochikyan, A., Petrushina, I., Vasilevko, V., Movsesyan, N. Mkrtichyan, M., Saing, T. ve Cribbs, D.H., (2005). "Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide", *J Immunol*, 174: 1580-1586.
 - [73] Monsonago, A., Zota, V., Karni, A., Krieger, J.I., Bar-Or, A., Bitan, G. Budson, A.E. Sperling, R. Selkoe, D.J. ve Weiner, H.L., (2003). "Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease", *J Clin Invest*, 112: 415-422.
 - [74] Maier, M., Seabrook, T.J., Lazo, N.D., Jiang, L., Das, P., Janus, C. ve Lemere, C.A., (2006). "Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response", *J Neurosci*, 26: 4717-4728.
 - [75] Seabrook, T.J., Jiang, L., Thomas, K. ve Lemere, C.A., (2006). "Boosting with intranasal dendrimeric Abeta1-15 but not Abeta1-15 peptide leads to an effective immune response following a single injection of Abeta1-40/42 in APP-tg mice", *J Neuroinflammation*, 3: 14.
 - [76] Seabrook, T.J., Thomas, K., Jiang, L., Bloom, J., Spooner, E., Maier, M., Bitan, G. ve Lemere, C.A., (2007). "Dendrimeric Abeta1-15 is an effective immunogen in wildtype and APP-tg mice", *Neurobiol Aging*, 28: 813-823.

- [77] Sigurdsson, E.M., Knudsen, E., Asuni, A., Fitzer-Attas, C., Sage, D., Quartermain, D., Goni, F., Frangione, B. ve Wisniewski, T., (2004). "An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives", *J Neurosci*, 24: 6277-6282.
- [78] Ghochikyan, A., Mkrtichyan, M., Petrushina, I., Movsesyan, N., Karapetyan, A., Cribbs, D.H. ve Agadjanyan, M.G., (2006). "Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-Abeta antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch", *Vaccine*, 24: 2275-2282.
- [79] Liu, B., Frost, J.L., Sun, J., Fu, H., Grimes, S., Blackburn, P. ve Lemere, C.A., (2013). "MER5101, a novel Aβ₁₋₁₅:DT conjugate vaccine, generates a robust anti-Aβ antibody response and attenuates Aβ pathology and cognitive deficits in APP^{swe}/PS1^{ΔE9} transgenic mice", *J Neurosci*, 33: 7027-7037.
- [80] Guan, X., Yang, J., Gu, H., Zou, J. ve Yao, Z., (2013). "Immunotherapeutic efficiency of a tetravalent Aβ₁₋₁₅ vaccine in APP/PS1 transgenic mice as mouse model for Alzheimer's disease", *Hum Vaccin Immunother*, 9: 1643-1653.
- [81] University of Rochester Medical Center, (2008). "Vaccine Triggers Immune Response, Prevents Alzheimer's In Mice.", *ScienceDaily*.
- [82] Das, P., Howard, V., Loosbrock, N., Dickson, D., Murphy, M.P. ve Golde, T.E., (2003). "Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in Fcγ₁-knock-out mice", *J Neurosci*, 23: 8532-8538.
- [83] Bacskai, B.J., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D. ve Hyman, B.T., (2002). "Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy", *J Neurosci*, 22: 7873-7878.
- [84] DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M. ve Holtzman, D.M., (2001). "Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8850-8855.
- [85] Lemere, C.A., Spooner, E.T., LaFrancois, J., Malester, B., Mori, C., Leverone, J.F., Matsuo, Y., Taylor, J.W., DeMattos, R.B., Holtzman, D.M., Clements, J.D., Selkoe, D.J. ve Duff, K.E., (2003). "Evidence for peripheral clearance of cerebral Aβ protein following chronic, active Aβ immunization in PSAPP mice", *Neurobiol Dis*, 14: 10-18.
- [86] Klyubin, I., Walsh, D.M., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Shankar, G.M., Betts, V., Spooner, E.T., Jiang, L., Anwyl, R., Selkoe, D.J. ve Rowan, M.J., (2005). "Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Aβ oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo", *Nat Med*, 11: 556-561.
- [87] Yamada, K., Yabuki, C., Seubert, P., Schenk, D., Hori, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Hashimoto, T. ve Iwatsubo, T., (2009). "Aβ immunotherapy: intracerebral sequestration of Aβ by an anti-Aβ monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Aβ", *J Neurosci*, 29: 11393-11398.
- [88] Britschgi, M., Olin, C.E., Johns, H.T., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, M.C., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, W.H., Clark, C.M., Fagan, A.M.

- Galasko, D.R., Holtzman, D.M., Jutel, M., Kaye, J.A. Lemere, C.A., Leszek, J. Li, G. Peskind, E.R., Quinn, J.F., Yesavage, J.A., Ghiso, J.A. ve Wyss-Coray, T., (2009). "Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 12145-12150.
- [89] Effros, R.B., Fletcher, C.V., Gebo, K., Halter, J.B., Hazzard, W.R., Horne, F.M. Huebner, R.E. Janoff, E.N. Justice, A.C. Kuritzkes, D. Nayfield, S.G. Plaeger, S.F. Schmader, K.E. Ashworth, J.R. Campanelli, C. Clayton, C.P. Rada, B. Woolard, N.F. ve High, K.P., (2008). "Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions", *Clin Infect Dis*, 47: 542-553.
- [90] Lemere, C.A. ve Masliah, E., (2010). "Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy?", *Nat Rev Neurol*, 6: 108-119.
- [91] Wilcock, D.M. ve Colton, C.A., (2008). "Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials", *J Alzheimers Dis*, 15: 555-569.
- [92] Sewald N., J.H., (2002). "Peptides: Chemistry and Biology", Wiley–VCH.
- [93] Nijkamp F.P., P.M.J., (2005). "Principles of Immunopharmacology", Birkhauser, Verlag.
- [94] Wnek G.E., B.G.L., (2008). *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical engineering*, Vanderbilt Avenue New York: Informa Healthcare.
- [95] Loupy A., (2006). *Microwaves in Organic Synthesis 2nd Ed.*, Weinheim: Wiley-Vch.
- [96] Reichert, J.P., P., Tartat, A., Dunn, M.K., (2010). "Development trends for peptide therapeutics: A comprehensive quantitative analysis of peptide therapeutics in clinical development", *Peptide Therapeutics Foundation*.
- [97] Babiuk, L.A., (1999). "Broadening the approaches to developing more effective vaccines", *Vaccine*, 17: 1587-1595.
- [98] Moyle, P.M. ve Toth, I., (2008). "Self-adjuvanting lipopeptide vaccines", *Curr Med Chem*, 15: 506-516.
- [99] Moyle, P.M. McGeary, R.P. Blanchfield, J.T. ve Toth, I., (2004). "Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems", *Curr Drug Deliv*, 1: 385-396.
- [100] Tam, J.P., (1988). "Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 5409-5413.
- [101] Croft, N.P. ve Purcell, A.W., (2011). "Peptidomimetics: modifying peptides in the pursuit of better vaccines", *Expert Rev Vaccines*, 10: 211-226.
- [102] Nelson, L.N., Cox, M. M., (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (N. Kılıç), Ankara: Palme Yayınları.

- [103] Solomons, G.T.W., Fryhle, C. B., (2004). Organic Chemistry, United States of America.: John Wiley & Sons.
- [104] Franks, H.S., Evans, M. W., (1945). Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures: J. Chem. Phys.
- [105] McDonald, I.K. ve Thornton, J.M., (1994). "Satisfying hydrogen bonding potential in proteins", J Mol Biol, 238: 777-793.
- [106] Pace, C.N. Shirley, B.A. McNutt, M. ve Gajiwala, K., (1996). "Forces contributing to the conformational stability of proteins", FASEB J, 10: 75-83.
- [107] Crabtree, R.H. Siegbahn, P.E. Eisenstein, O. Rheingold, A.L. ve Koetzle, T.F., (1996). "A new intermolecular interaction: unconventional hydrogen bonds with element-hydride bonds as proton acceptor", Acc Chem Res, 29: 348-354.
- [108] Patthy, L., (1999). Protein Evolution: Published Blackwell Publishing.
- [109] Kauzmann, W., (1959). "Some factors in the interpretation of protein denaturation", Adv Protein Chem, 14: 1-63.
- [110] Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, Ch., Stscherbina, D., (1994). Polyelectrolytes, Munich.
- [111] Mustafaev, M., (1996). "Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives", Turkish Journal of Chem. Soc., 20: 126–138.
- [112] Tsetska, R., (2001). Physical Chemistry of Polyelectrolytes, New York: Marcel Dekker Inc.
- [113] Mazumder, M.A., Shen, F., Burke, N.A., Potter, M.A. ve Stover, H.D., (2008). "Self-cross-linking polyelectrolyte complexes for therapeutic cell encapsulation", Biomacromolecules, 9: 2292-2300.
- [114] Donath E., S.G.B.C.F., Davis S.A., Mohwald H., , (1998). Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes: Angew. Chem., Int. Ed.
- [115] Tiourina, O.P., A.A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.I., Lvov Y., Mohwald H.,, (2001). Entrapment of alpha-chymotrypsin into hollow polyelectrolyte microcapsules: Macromol. Biosci.
- [116] Petrov R.V., M.M.I., Norimov A.Sh., , (1992). Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes: Harwood Acad. publ. GmbH.
- [117] Gao C.Y., D.E., Mohwald H., Shen J.C.,, (2002). Spontaneous deposition of water-soluble substances into microcapsules: Phenomenon, mechanism, and application: Angew. Chem., Int. Ed.
- [118] Ye, S., Wang, C., Liu, X., Tong, Z. , Ren, B. ve Zeng, F., (2006). "New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly", J Control Release, 112: 79-87.

- [119] Nair, L.S., (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials", Prog. Polym. Sci., 32: 762–798.
- [120] Mustafaev, M.I., (1996). "Biyopolymerler" (Biopolymers), Gebze/Kocaeli, Türkiye: TÜBİTAK.
- [121] Mustafaev, M., Çırakoglu, B., Saraç, S., (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.
- [122] Mustafaev, M.I., Osada, Y., Endo, T., (1998). "Advanced Biopolymer Systems", First Japanese-Turkish Workshop Materials TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, 1-76.
- [123] Mustafaev, M.I., Osada, Y., Başalp, A., (1998). "New Temperature-Responsive Immunogens by Poly(N-isopropyl-acryamide)-modified Bovine Serum Albumin", Recent Advances in Peptide and Protein Delivery: 145-162.
- [124] Güney, O., Saraç, S.A., Mustafaev M.I., (1997). "Fluorescence and Turbidimetry Study of Complexation of Human Serum Albumin with Polycations", Journal of Bioact, 12.
- [125] Deen, C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N.D. ve Boersma, W.J., (1990). "A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses", J Immunol Methods, 129: 119-125.
- [126] Gürhan, S.I., Akdeste, M.M. ve Akdeste, Z.M., (2002). "Preparation of Synthetic Peptide FMDV Vaccine with Newly Developed Antigen-Polymer Conjugates be Used as Immunogen and Vaccine in Veterinary Medicine", In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, 41: 349-357.
- [127] Friedli, G.L., (1996). "Interaction Of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other Food Proteins And Metals", A Thesis Presented For The Award of Doctor of Philosophy to The University Of Surrey.
- [128] Mustafaev, M., Mustafaeva, Z. ve Ergen, E. (2002). "Novel-Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates", Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 17: 251-269.
- [129] Hermanson, T., (1996). Bioconjugate Techniques, California: Elsevier Press.
- [130] Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y. ve Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", Biomaterials, 22: 2383-2392.
- [131] Mayer, G., (2011). "IMMUNOLOGY - CHAPTER ONE INNATE (NON-SPECIFIC) IMMUNITY", The Board of Trustees of the University of South Carolina.
- [132] Mayer, G. ve Nyland, J. (2010). "IMMUNOLOGY - CHAPTER NINE CELLS INVOLVED IN IMMUNE RESPONSES AND ANTIGEN RECOGNITION", Immunology Section of Microbiology and Immunology On-line.

- [133] Rich, R., 2008. The human immune response. Clinical Immunology, Principles, (2008). Clinical Immunology, Principles and Practice and Practice, ABD: Mosby Elsevier.
- [134] Abbas, A.K. ve Lichtman, A.H., (2007). Temel immünoloji, immün sistemin işlev ve bozuklukları, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
- [135] Yeğ n, O. (1992). Temel İmmünoloji Ve İmmün Eksiklik Hastalıkları, Antalya: Akdeniz Üniversitesi Yayınları.
- [136] Durandy, A., Kaveri, S.V., Kuijpers, T.W., Basta, M., Miescher, S., Ravetch, J.V. ve Rieben, R., (2009). "Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms", Clin Exp Immunol, 158 Suppl 1: 2-13.
- [137] http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Waters_HPLC_MS_TitlePg.html. HPLC/MS cihazı, 5 Mayıs 2014
- [138] Telefoncu, A., (1996). Protein Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu, İzmir: Ege Üniversitesi.
- [139] http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html, Kromatografi Tekniğı, 5 Mayıs 2014
- [140] Lakowicz, J.R., (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [141] Bell, J.E., (1981). Spectroscopy in Biochemistry: CRC Press.
- [142] Campbell, I.D. ve Dwek, R.A., (1984). Biological spectroscopy, CA: Benjamin/Cummings Menlo Park.
- [143] Greve, J., Puppels, G.J. ve Otto, C., (1999). Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions, Boston: Kluwer.
- [144] Demchenko, A.P., (1986). Ultraviolet Spectroscopy of Proteins: Heidelberg: Springer Verlag.
- [145] Righetti, P.G., (2007). "Biomacromolecules: Introduction to structure, Function and Informatics", PROTEOMICS-Clinical Applications, 1: 1333-1334.
- [146] Skoog, D.A.H. ve Nieman, T., (1992). Principles of Instrumental Analysis, Philadelphia, London: Saunders College of Publishing.
- [147] Sharma, A., (1999). Introduction to Fluorescence Spectroscopy, New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [148] Budama Kılınç, Y., (2013). Influenza A Virüsüne Ait Sentetik Peptidlerin Polielektrolitlerle Konjugasyon Reaksiyonunun Floresans Rezonans Enerji Transferi Ve Diğ r Yöntemlerle İncelenmesi. Biyomühendislik Bölümü. İstanbul Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [149] Scopes, R.K., (1974). "Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm", Anal Biochem, 59: 277-282.

- [150] <http://www.protein.ege.edu.tr/Konular/Protein%20tay.pdf>. Protein Bilgisi, 5 Mayıs 2014
- [151] <http://sciencefair.math.iit.edu/techniques/spectrophotometer/>. Spektrofotometre Tekniği, 5 Mayıs 2014
- [152] Lakowicz, J.R., (2006). Principles of fluorescence spectroscopy: Springer.
- [153] Keçel, S., (2009). "Pro-Tyr, Glu-Asn ve Ala-Gln Dipeptidlerinin Konformasyon Analizi ve Ab-Initio Dft Yöntemleri ile Titreşim Frekans Ve Kiplerinin İncelenmesi", Fizik Anabilim Dalı, Atom ve Molekül Fiziği Programı, İstanbul Üniversitesi.
- [154] Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D. ve Riek, R., (2005). "3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils", Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 17342-17347.
- [155] http://www.princeton.edu/engineering/pdf/Screening_for_Alzheimers_Drugs.pdf. Alzheimerde Kullanılan İlaçlar, 5 Mayıs 2014
- [156] Shabestari, M., Plug, T., Motazacker, M. M., Meeuwenoord, N. J., Filippov, D. V., Meijers, J. C. M. ve Huber M. , (2013). "The Aggregation Potential of the 1–15- and 1–16-Fragments of the Amyloid β Peptide and Their Influence on the Aggregation of A β 40", Applied Magnetic Resonance, 44: 1167-1179.
- [157] Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J. Terenius, L. ve Nordstedt, C., (1996). "Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand", J Biol Chem, 271: 8545-8548.
- [158] Petrushina, I., Ghochikyan, A., Mktrichyan, M., Mamikonyan, G., Movsesyan, N. Davtyan, H., Patel, A., Head, E., Cribbs, D.H. ve Agadjanyan, M.G., (2007). "Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric Abeta species in amyloid precursor protein transgenic mice", J Neurosci, 27: 12721-12731.
- [159] Jung, B. ve Theato, P., (2013). "Chemical Strategies for Synthesis of Protein-Polymer Conjugates", Advance Polym. Sci, 253: 37-70.
- [160] Deliloğlu, S.I., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., Aynagoz, G., Unver, G., Unal, N. ve Celik, N., (2002). "Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine", In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of theEuropean Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix41: 349-357.
- [161] El Kadi, N., Taulier, N., Le Huerou, J.Y., Gindre, M., Urbach, W., Nwigwe, I., Kahn, P.C. ve Waks, M., (2006). "Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies", Biophys J, 91: 3397-3404.
- [162] Friedli, G., (1996). "Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals", University of Surrey.

- [163] 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.
- [164] Taylor, R., (1991). *Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*, New York: Marcel Dekker Inc.
- [165] 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 Res*, 48: 589-601.
- [166] 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.
- [167] Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M. Fernandez-Lafuente, R. ve Guisan, J.M., (2004). "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", *J Biotechnol*, 110: 201-207.
- [168] 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.
- [169] Eroglu Iscani B., K.B., Y. ve Mustafaeva, Z., (2011). "Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry", *Turkish Journal of Biochemistry*, 36: 222-229.
- [170] Gavalas, V. ve Chaniotakis, N., (2000). "Polyelectrolyte stabilized oxidase based biosensors: effect of diethylaminoethyl-dextran on the stabilization of glucose and lactate oxidases into porous conductive carbon", *Analytica Chimica Acta*, 404: 67-73.
- [171] Sacco, D., Bonneaux, F. ve Dellacherie, E., (1988). "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *Int. J. Biol. Macromol*, 10: 305.
- [172] Dellacherie, E., (1991). "Polym. Prepr.", *Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem*, 32: 602.
- [173] Kokufuta, E., Shimizu, H. ve Nakamura, I., (1981). "Salt linkage formation of poly(diallyldimethylammonium chloride) with acidic groups in the polyion complex between human carboxyhemoglobin and potassium poly(vinyl alcohol) sulfate", *Macromolecules*, 14: 1178.
- [174] Kirstein, S.L., Atienza, J.M., Xi, B., Zhu, J., Yu, N., Wang, X., Xu, X. ve Abassi, Y.A., (2006). "Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development", *Assay Drug Dev Technol*, 4: 545-553.
- [175] Kola, I., (2008). "The state of innovation in drug development", *Clin Pharmacol Ther*, 83: 227-230.

- [176] Cooper, M.A., (2006). "Non-optical screening platforms: the next wave in label-free screening?", *Drug Discov Today*, 11: 1068-1074.
- [177] Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C. Wang, X. ve Xu, X., (2009). "Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects", *Chem Biol*, 16: 712-723.
- [178] Houck, K.A. ve Kavlock, R.J., (2008). "Understanding mechanisms of toxicity: insights from drug discovery research", *Toxicol Appl Pharmacol*, 227: 163-178.
- [179] Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B. ve Zheng, W., (2004). "Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays", *Assay Drug Dev Technol*, 2: 363-372.
- [180] Giaever, I. ve Keese, C.R., (1993). "A morphological biosensor for mammalian cells", *Nature*, 366: 591-592.
- [181] Keogh, R.J., (2010). "New technology for investigating trophoblast function", *Placenta*, 31: 347-350.
- [182] Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. ve Reichl, F.X., (2010). "Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts", *Dent Mater*, 26: 51-58.
- [183] Ehlers, A., Stempin, S., Al-Hamwi, R. ve Lampen, A., (2010). "Embryotoxic effects of the marine biotoxin okadaic acid on murine embryonic stem cells", *Toxicol*, 55: 855-863.
- [184] Huang, L., Xie, L., Boyd, J.M. ve Li, X.F., (2008). "Cell-electronic sensing of particle-induced cellular responses", *Analyst*, 133: 643-648.
- [185] Vistejnova, L., Dvorakova, J., Hasova, M., Muthny, T., Velebny, V., Soucek, K. ve Kubala, L., (2009). "The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques", *Neuro Endocrinol Lett*, 30 Suppl 1: 121-127.
- [186] Anthony, D.F., Sin, Y.Y., Vadrevu, S., Advant, N., Day, J.P., Byrne, A.M., Lynch, M.J., Milligan, G., Houslay, M.D. ve Baillie, G.S., (2011). "beta-Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation", *Mol Cell Biol*, 31: 1066-1075.
- [187] Atienzar, F.A., Tilmant, K., Gerets, H.H., Toussaint, G., Speeckaert, S., Hanon, E., Depelchin, O. ve Dhalluin, S., (2011). "The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models", *J Biomol Screen*, 16: 575-587.
- [188] Park, H.J., Zhang, Y., Georgescu, S.P., Johnson, K.L., Kong, D. ve Galper, J.B., (2006). "Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis", *Stem Cell Rev*, 2: 93-102.

- [189] Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sanger, M., Schmidberger, H. ve Langguth, P., (2012). "Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study", *Radiat Oncol*, 7: 1.
- [190] Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
- [191] <http://picsbox.biz/key/%20mtt%20assay>. MTT Testi Tekniği, 5 Mayıs 2014
- [192] Çakır Koç, R., (2012). "Leishmania parazitlerinden lipofosfoglikan (lpg) saflaştırılması ve aşı modeli olarak lpg-polimer konjugatının antileishmanial etkinliğinin in vitro ve in vivo incelenmesi", Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Başak İŞCANI EROĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 26.05.1981/İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : basakiscani@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2007
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2004
Lise	Fen Bilimleri	Şehit Ersoy Yorulmaz Lisesi	1998

İŞ TECRÜBESİ YILI	Firma/Kurum	Görevi
2008- ...	Antis Kozmetik A.Ş.	Eğitim ve İş Geliştirme Sorumlusu
2003	Yıldız Teknik Üniversitesi	Öğrenci Asistanlık
2002	Yıldız Teknik Üniversitesi	Öğrenci Asistanlık

YAYINLARI

- **Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**

1. **Basak Iscani Eroglu**, Yasemin Budama Kilinc, Zeynep Mustafaeva, Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry, Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 36, Issue 3, pp. 222-229, (2011).
2. Mustafaeva Zeynep; **Iscani Basak**; Ozdemir Zafer Omer; et al., Synthesis of hepatitis B surface antigen peptide bioconjugates with polyelectrolytes by microwave energy , JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE , Vol. 14, Issue 8, pp. 158-159, (2008).

- **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. **Başak İŞCANI EROĞLU**, Rabia ÇAKIR KOÇ, Melahat BAĞIROVA, Adil ALLAHVERDİYEV, Zeynep MUSTAFAEVA, Amiloid Beta Peptidine ait 1-21 Dizisinin Poliakrilik Asit ile Sentezlenen Biyokonjugatlarının MTT Yöntemi ile Meme Kanseri Hücresindeki Etkilerinin İncelenmesi (SÖZLÜ SUNUM), 24. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ, Vol. 24, Issue 1, pp. 24-24, (2012).
2. **Eroğlu İşcanı, B.**, Budama Kılınç, Y., Mustafaeva Akdeste, Z., Amiloid Beta Peptid Dizilerinin Biyopolimerler ile Suda Çözünen Biyokonjugatlarının Sentezi ve Spektroskopik Yöntemlerle Analizi, XXV. Ulusal Kimya Kongresi, (2011).
3. **İşcanı, B.**, Özdemir, Z. Ö., Topuzoğulları M., Budama Battal Y., Sarıçay Y., Akkılıç N., Mustafaeva Z., Mustafaev, M. , Hepatit B Yüzey Antijeni 95-109 Peptid Dizisinin Sentezi ve Polielektrolitler ile Suda Çözünebilen Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi, 21. Ulusal Kimya Kongresi, (2007).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

1. **(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).

2. **(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).
3. **(SCI)** Mustafaeva Z., **İşcanı B.**, Özdemir Z., Battal Y.B., Synthesis of Bioconjugates of Hepatitis B Surface Antigen Peptide with Polyelectrolytes by Microwave Energy, 30th European Peptide Symposium (30EPS), (2008).
4. **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).
5. **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)
6. **İşcanı 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).

PROJELER

1. Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular, Görevi: Yardımcı Araştırmacı, Destekleyen Kurum: DPT, Başlangıç - Bitiş : 2005.08.01 – 2008.03.01.

ÖDÜLLERİ

1. Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular Projesi Araştırmacı Bursu, 2006-2008.