

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

128635

Prof. Dr. Aysen Yarot:

POLİ (N-İZOPROPİLAKRİLAMİD)'İN SIĞIR SERUM  
ALBÜMİN VE ŞAP HASTALIĞI VİRÜSÜNÜN PEPTİD  
EPİTOPU İLE SUDA ÇÖZÜNEBİLEN KOVALENT  
KONJUGATLARI: RADYASYON IŞINLAMA YÖNTEMİ

Doc. Dr. Huriye Karıslayan:

Kimyager Pelin VURAL

Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

F.B.E Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Mustafaey Akdeste

128635

İSTANBUL, 2002

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTIMA LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. PROTEİNLERİN POLİMERLERLE MODİFİKASYONU.....	4
2.1 Elektrostatik ve Hidrofobik Etkilerle Oluşmuş Protein-Polimer Kompleksleri.....	5
2.1.1 Doğal Polielektrolit Kompleksleri .....	6
2.1.2 Yapay Polielektrolit Kompleksleri .....	7
2.1.3 Aynı Yüklü Polimer ve Proteinin Geçiş Metalleri Varlığında Kompleks Oluşturması.....	8
2.1.4 Polielektrolit ve Proteinin Van Der Vals ve Hidrofobik Etkileşimlerle Bağlanması.....	9
2.2 Protein-Polimer Kovalent Konjugatı Oluşması.....	9
2.2.1 Amino Gruplarının Çeşitli Fonksiyonel Gruplar ile Reaksiyonları.....	9
2.2.2 Proteinlerin Polimerlerle Kovalent Bağlanmasının İncelenmesi .....	15
2.2.2.1 Aktive Olmuş PEG ile Protein Bağlanması .....	15
2.2.2.2 Aktive Olmuş Dekstranlar ile Protein Bağlanması.....	21
2.3 Radyasyon Etkisi ile Polimer-Protein Bağlanması .....	23
2.3.1 İyonize Edici Radyasyon Tipleri.....	23
2.3.2 Radyasyonun Madde Üzerine Etkisi .....	24
3. PROTEİN-POLİMER SİSTEMLERİNİN İMMÜNOLOJİK AKTİVİTESİ .....	27
3.1 Şap Hastalığı.....	29
3.2 Sentetik Peptid İmmünojenler.....	35
3.3 Peptidlere Karşı İmmün Cevapta Farklılıklar.....	37
3.4 Peptid-Antijen Prezantasyonu .....	38
4. DENEYSEL KISIM.....	40
4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	41
4.2 Farklı Şiddetlerdeki <sup>60</sup> Co Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Konjugatlarının UV-Absorbans, Floresans, Jel Filtrasyon HPLC ve İmmünojenite İncelemesi .....	41
4.2.1 Deneyin Amacı.....	41
4.2.2 Kullanılan Çözeltiler.....	42
4.2.3 Deneyin Yapılışı.....	43
4.2.4 Deneyde Kullanılan Yöntemler.....	43
4.3 500 Gy. <sup>60</sup> Co Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış Şap Hastalığı Virüsü Peptidi 40-60 Dizili Epitopu-pNIPAAm Karışımlarının UV-Absorbans, Jel Filtrasyon	

HPLC İncelemesi .....	45
4.3.1 Deneyin Amacı.....	45
4.3.2 Kullanılan Çözeltiler.....	45
4.3.3 Deneyin Yapılışı.....	46
4.3.4 Deneyde Kullanılan Yöntemler.....	46
5. DENEYSEL SONUÇLAR .....	48
5.1 Farklı Şiddetde Radyoaktif <sup>60</sup> Co Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımlarının, UV-Absorbans, Floresans, Jel Filtrasyon HPLC ve İmmünizasyon Sonuçları .....	48
5.1.1 1200 Gy. <sup>60</sup> Co Gama Işını ile ışınlanmış ve ışınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımları ile Serbest 0.15%BSA Çözeltisi UV-Absorbans Sonuçları .....	48
5.1.2 Farklı Işın Şiddetleri ile Işınlama ile Oluşturulmuş pNIPAAm-BSA Konjugatlarının Floresans Sonuçları .....	50
5.1.3 Farklı Şiddetdeki <sup>60</sup> Co Gama Işınları ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımları ile Serbest BSA 0.15% ve 0.1 % pNIPAAm Çözeltilerinin Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları .....	54
5.1.4 Hazırlanmış pNIPAAm-BSA Konjugatlarının İmmünizasyon Sonuçları .....	58
5.2 500 Gy. <sup>60</sup> Co Radyoaktif Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü Peptidi 40-60 Dizili Epitopu Karışımları UV-Absorbans ve Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları .....	59
5.2.1 Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü Peptidi Epitopu (40-60) UV-Absorbans Sonuçları.....	59
5.2.2 500 Gy. Radyoaktif <sup>60</sup> Co Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Ş.H.V.VP1 Proteini Epitopu (40-60) Karışımları ile serbest BSA'nın Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları.....	62
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR .....	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	72

## KISALTMA LİSTESİ

pNIPAAm	poli(N-izopropilakrilamid)
pNIPAAm-AA	poli(N-izopropilakrilamid-akrilikasit)
PEG	Polietilenglikol
VP	Vinil Prolidon
mPEG	Monohidroksi polietilenglikol
NHS	N-Hidroksi süksinimid
Tst	Trikloro-s-tirazin
Trp	Triptofan
CDI	N-N' karbodiimidazol
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)karbodiimid
RNA	Ribonükleikasit
DNA	Deoksinükleikasit
IgM	İmmünoglobulin M
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MHC	(Major Histocompatibility Kompleks) Major Uyumluluk Kompleksi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CP	Kopolimer
Ş.H.V.	Şap Hastalığı Virüsü
T	Timüs
PEC	Polielektrolit Kompleks ( Polielektrolyte Kompleks)
RT	Alıkonma zamanı (Alıkonma Zamanı)
LCST	Lower Critical Solution Temperature ( Düşük kritik çözünme sıcaklığı)
R	Radikal

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Radyasyonun $\text{Cu}^{2+}$ içeren polielektrolit sistemleri üzerine etkisi.....25
Şekil 2.2	Işınlanmamış ve farklı dozlarda ışınlanmış PAA-BSA karışımları HPLC Sonuçları.....25
Şekil 2.3	PAA- $\text{Cu}^{2+}$ -BSA karışımları HPLC sonuçları.....26
Şekil 3.1	Birincil ve İkincil immün cevabı oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması.....27
Şekil 3.2	Yüksek ve düşük immünojen etkili antijen-PE komplekslerinin yapısı.....29
Şekil 3.3	Tripsin ile muamele edilmiş virüs ile doğal virüsün IgM antikörleri ile Reaksiyonları.....33
Şekil 3.4	Şap Hastalığı virüsü VP1 proteininin tanımlanmış fragmentlerinin İmmünojenitesi.....34
Şekil 3.5	Bağışıklık sistemi.....38
Şekil 3.6	Antikor esaslı immün yanıt elde edilmesinde sentetik peptid immünojenin T ve B hücre epitoplari fonksiyonlarının diyagramik sunumu.....38
Şekil 5.1	Işınlanmamış 0.15 % BSA ile 1200 Gy. ile ışınlanmış 0.15 % BSA UV-Absorbans Sonuçları.....48
Şekil 5.2	Işınlanmamış 0.1 % pNIPAAm ve 0.15 % BSA karışımı ile 1200 Gy. ile ışınlanmış 0.1% pNIPAAm ve 0.15 % BSA karışımı.....49
Şekil 5.3	Işın şiddeti değişimine göre serbest BSA floresans değişimi grafiği.....50
Şekil 5.4	Işın şiddeti değişimine göre pNIPAAm-BSA konjugatı floresans yoğunluğu değişimi grafiği.....51
Şekil 5.5	Işın şiddeti değişimine göre BSA maksimum dalga boyu değişimi grafiği.....52
Şekil 5.6	Işın şiddeti değişimine göre pNIPAAm-BSA konjugatı maksimum dalga boyu değişim grafiği .....53
Şekil 5.7	Işınlanmamış ve 1200 Gy. ile ışınlanmış 0.1 % pNIPAAm çözeltisinin jel filtrasyon HPLC grafiği.....54
Şekil 5.8	Işınlanmamış 0.15 % BSA Çözeltisinin ve 1200 Gy. ile Işınlanmış 0.15 % BSA çözeltisinin jel filtrasyon HPLC grafiği .....55
Şekil 5.9	1200 Gy. ile ışınlanmış ve ışınlanmamış pNIPAAm-BSA karışımı jel filtrasyon HPLC sonuçları.....56
Şekil 5.10	100, 300, 500, 700 Gy. ile ışınlanmış pNIPAAm-BSA konjugatı jel filtrasyon HPLC Sonuçları.....57
Şekil 5.11	Farklı şiddetlerdeki radyoaktif ışınlar ile ışınlanmış pNIPAAm-BSA karışımlarının immünizasyon testi sonuçları grafiği .....58
Şekil 5.12	Işınlanmamış peptid-polimer konjugatları UV-Absorbans Sonuçları.....59
Şekil 5.13	500 Gy. ile Işınlanmış peptid-polimer konjugatlarının UV-Absorbans Sonuçları.....60
Şekil 5.14	Işınlanmamış peptid-polimer konjugatları ile serbest BSA ve pNIPAAm'nin UV-Absorbans Sonuçları .....61
Şekil 5.15	Işınlanmamış 0.5 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>214</sub> ) .....62
Şekil 5.16	Işınlanmamış 0.5 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....62
Şekil 5.17	500 Gy.ile ışınlanmış 0.5 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>214</sub> ).....62
Şekil 5.18	500 Gy. ile ışınlanmış 0.5 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....62
Şekil 5.19	Işınlanmamış 1 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC

sonucu (OD <sub>214</sub> ) .....	63
Şekil 5.20 Işınlanmamış 1mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....	63
Şekil 5.21 500 Gy. ile ışınlanmış 1mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>214</sub> ) .....	63
Şekil 5.22 500 Gy. ile ışınlanmış 1mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....	63
Şekil 5.23 Işınlanmamış 2 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>214</sub> ).....	64
Şekil 5.24 Işınlanmamış 2 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....	64
Şekil 5.25 500 Gy. ile ışınlanmış 2 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>214</sub> ) .....	64
Şekil 5.26 500 Gy. ile ışınlanmış 2 mg. peptid içeren peptid-polimer konjugatı jel filtrasyon HPLC sonucu (OD <sub>280</sub> ).....	64
Şekil 5.27 Işınlanmamış, 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini epitopu (40-60) içeren çözeltinin jel filtrasyon HPLC sonuçları (OD <sub>214</sub> ).....	65
Şekil 5.28 Işınlanmamış, 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini epitopu (40-60) içeren çözeltinin jel filtrasyon HPLC sonuçları (OD <sub>280</sub> ).....	65



## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Hazırlanan BSA örneklerinin immünite testleri sonuçları.....	28
Çizelge 5.1 pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini peptid epitopu(40-60) konjugatlarının UV-Absorbans değerlerinin bir tablo üzerinde gösterilmesi .....	62



## ÖNSÖZ

Öncelikle tez çalışmalarına yön veren, benden yardımlarını, desteklerini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'ye,

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Kimyasal İmmünoloji laboratuvarında bana çalışma olanağı sağlayan, bilgisini, yardımını ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Zeynep Askdeste'ye,

TÜBİTAK MARMARA ARAŞTIRMA MERKEZİNİN Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Kimyasal immünoloji laboratuvarında bana çalışmalarımda yardım eden Msc. Miroslowa Demchenko'ya, Msc. Mesut Karahan'a ve teknisyen Cem Hıdır'a,

ÇEKMECE NÜKLEER ARAŞTIRMA EĞİTİM MERKEZİNDE, bana deneysel çalışmalarımda olanak sağlayan ve destek olan Dr. Seval Bayülgen'e,

Ayrıca bana yüksek lisans öğrenimimde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşime,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Bu çalışmada, radyoaktif  $^{60}\text{Co}$  gama ( $\gamma$ ) ışınlaması metodu ile, (pNIPAAm) poli (N-izopropilakrilamid polimerinin, sığır serum albümin proteini ve Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini peptid epitopu (40-60) ile suda çözünen kovalent konjugatları sentezlenmiş ve incelenmiştir.

Farklı ışınlama dozları işe oluşturulan suda çözünen polimer-protein biyokonjugatlarının bağlanma mekanizması, UV-Visible spektroskopisi, Floresans spektroskopisi ve jel filtrasyon HPLC metodları ile immünojenitesi ise ELİSA testleri ile incelenmiştir. 500 Gy radyoaktif  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  ışınlaması ile oluşturulan polimer-peptid konjugatı bağlanma mekanizması ise UV-Visible spektroskopisi ve jel filtrasyon HPLC metodları ile analiz edilmiştir.

Analizler sonucunda, 100-500 Gy. arasındaki  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  ışınlanması ile BSA proteinin yapısal bozunmaya uğramadan polimer ile kovalent konjugat oluşturduğu gözlenmiş ve oluşan konjugatların immünojenitesinin serbest BSA'dan belirgin bir şekilde fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. pNIPAAm-peptid karışımının da, 500 Gy. ışınlama etkisi ile kovalent konjugat oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan çalışma, proteinin polimer modifikasyonu yöntemleri vasıtası ile yüksek etkili, düşük toksiditeye sahip, polimerik sentetik aşı oluşturma yönünde bir çalışma olması nedeni ile güncel ve önemi olan bir çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Konjugat,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  ışını, immünojen, sentetik aşı, pNIPAAm

## ABSTRACT

In this study, water soluble covalent conjugates of polymer-protein and polymer-peptide which can be prototype of synthetic vaccines, have been synthesized and analyzed. Poli (N-isopropyl acrylamide) (pNIPAAm) has been conjugated to bovine serum albumin (BSA) and Foot-and-Mouth Disease Virus VP1 Protein peptide epitop (40-60) by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation.

The covalent binding mechanism of the radiation induced (0-1200Gy.) pNIPAAm-BSA conjugate is analysed by UV-visible spectrometry, florescence spectrometry and jel filtration HPLC while the immunization property is analysed by the ELISA tests. On the other hand, the binding mechanism of pNIPAAm-peptide conjugate which is synthesized by 500 Gy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation is analysed by UV-visible and HPLC methods.

It is concluded that between the radiation doses 100-500 Gy., BSA, without any degradation in its structure, has successfully conjugated to pNIPAAm. The immunogenity of radiation induced (100-500 Gy.) protein-polymer conjugate has been observed more than free BSA. It is also concluded that pNIPAAm has conjugated to Foot-and-Mouth Disease VP1 Protein peptide conjugate appropriately by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  500 Gy. radiation.

This study is of importance because the protein modification by polymers can be basis for creating highly effective synthetic vaccines, having no toxicity.

**Keywords:** Conjugate,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation, immunogen, synthetic vaccine, pNIPAAm

## 1. GİRİŞ

Proteinlerin canlı organizmalarda yapı taşı olarak çok önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Hemoglobinin proteini kandaki oksijeni dokulara taşımakta, insülin proteini kandaki glukozun konsantrasyonunu düzenleyerek diabet hastalığını önlemekte, dişte bulunan kolojen proteini dişin sağlamlığını sağlamakta, keratin proteini saçın ve kılın yapısını oluşturmakta, trombosit proteini kanın pıhtılaşmasını sağlamakta, immünoglobulinler canlı organizmada bağışıklık sistemini düzenlemekte ve enzimler ise katalitik işlevleri gerçekleştirmektedir.

Proteinler ilaç olarak kullanılabilecekleri gibi, antijenik özelliklerinden dolayı sentetik aşı yapımında da kullanılabilirler. Proteinlerin işlevlerinin verildikleri organizmalarda daha etkili olabilmeleri için, ilaç olarak kullanıldıkları durumda, organizmada kalma sürelerinin uzaması (prolongation), aşı olarak kullanıldıklarında ise immünjenitelerinin yeterli düzeye artırılması gerekmektedir. Bu durumda polimerlerin önemi ortaya çıkmaktadır. Bağlandığı proteinin etrafını bir kabuk gibi sarıp proteini bağışıklık sistemi hücrelerine karşı koruyan polimerler, proteinin organizmada kalma süresini dolayısı ile yarılanma ömrünü uzatırken, maksimum sayıda protein taşıyabilen, taşıdığı proteinlerin solventle etkileşimine engel olmayan polimerler ise proteinlerin immünojenitelerinde önemli artışlara neden olurlar. İmmünjenitelerinin artırılması amacı ile polimer ile modifiye edilmiş proteinlerden güçlü sentetik aşı sistemlerinin oluşturulmasında faydalanılır. Pasteur aşısı olarak bilinen zayıflatılmış virüsün, organizmaya verilmesi sonucunda organizmada oluşan yan etkiler (toksikite vb.), sentetik peptid aşılarında görülmemektedir. İçerisinde fazla miktarda toksiditeye neden olan yabancı madde bulundurmayan, hastalığa neden olan virüs proteini peptid epitopu içeren yeni tipli aşıların etkinlikleri bağlandıkları taşıyıcılara ve adjuvantlara bağlıdır.

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile, bazı sentetik polimerlerin peptidlerin immün cevabına kuvvetli etkisi aydınlatıldı. Bu konuda yapılan çalışmalarda, timüse bağlı olmayan immünojenlerin sentezlenmelerinin prensipleri de oluşturuldu. Sentetik polimerler ile modifiye edilmiş haptenler (zayıf immünojen) klasik Pasteur aşılarının olumsuz yan etkilerini içermediği gibi şimdiye kadar tedavisi mümkün olmayan enfeksiyonlara karşı da (AIDS, malarya, hepatid, grip, paraziter enfeksiyonlar vb.) etkili olarak kullanılabileceklerdir.

Bu çalışmanın 2. bölümünde proteinin polimer ile modifikasyon mekanizması prensiplerine

ayrıntılı olarak değinilmiştir. İyonik , Kovalent ve Radyoaktif Işınlama ile protein polimer bağlanması yöntemleri incelenmiştir. 3. Bölümde ise protein-polimer konjugasyonu yöntemi ile protein antijeninin immünojenliğinin artırılması ve bu yolla Şap Hastalığına karşı sentetik peptid aşı prototipinin geliştirilmesi incelenmiştir.

Bu çalışmanın deneysel kısımları olan 4 ve 5. Bölümlerde, pNIPAAm polimerinin BSA proteini ve Şap Hastalığı Virüsü Epitopu (40-60) ile konjugat oluşturması için, teorik olarak incelenmiş protein-polimer konjugatları oluşturma yöntemlerinden, radyoaktif <sup>60</sup>Co gama( $\gamma$ ) ışınlama yöntemi uygun bulunarak, konjugat oluşumları incelenmiştir. Bu yöntemin seçilmesinde en önemli etken nötral pNIPAAm polimerinin ve BSA proteinin kovalent bağlanma için üzerinde radikal grup bulundurmamalarıdır. Radyoaktif ışının komponentler üzerinde radikal grup oluşturması ile kovalent bağlanmış konjugatların oluşumu sağlanır. pNIPAAm ile BSA'nın bağlanma mekanizması, floresans, UV-Visible Absorbans, jel filtrasyon HPLC ve immünojenitesi ise immünizasyon(ELİSA) analizleri yapılarak ayrıntılı olarak incelendi. Analizler sonucunda, bağlanma ve organizmada maksimum immünizasyon için en uygun şartlar belirlendi. Bu sonuçlardan edinilen bilgiler baz alınarak son yıllarda besin kaynaklarına çok büyük darbe vuran Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini epitopu (40-60), pNIPAAm ile 500 Gy. şiddetindeki <sup>60</sup>Co gama ışını ile ışınlama ile bağlanarak, bağlanma mekanizmaları UV-Absorbans ve jel filtrasyon HPLC ile incelenmiştir.

Polimer-protein ve polimer- peptid oluşturulmasında faydalanılan pNIPAAm polimeri, yüksek derecede ısı duyarlı ve suda çözünebilir bir polimerdir. Sıcalıktaki küçük değişimlere karşı geri dönüşümlü hidrasyon-dehidrasyon değişimleri gösterir. pNIPAAm'nin sulu çözeltisi en düşük kritik çözünme sıcaklığında (LCST) ve üzeri sıcaklıklarda termal çökme özelliği gösterir. Fakat hazırlanan konjugatın çok düşük konsantrasyonları sıcaklık artışından bağımsızdır, dolayısı ile bu konjugatlar, LCST ve altındaki sıcaklıklarda herhangi şekilde çökme göstermezler.

Poli(N-IPAAM-AA), BSA ile suda çözünen karbodiimid vasıtası ile bağlanarak kovalent konjugat oluşması sağlanmıştır.( A. Salman Dilginmen et. al, 2001). Farklı r değerlerinde ( $r = C_{BSA} / C_{CP}$ ), farklı konsantrasyonlara sahip konjugatlar hazırlanmış ve konjugatların immünojeniteleri Elisa testleri ile incelenmiştir. Fare organizması sıcaklığının (yaklaşık 37°C) pNIPAAm-AA'in LCST'ından(24°C) fazla olması nedeni ile konjugatlar, organizmada termal olarak çökmüş ve immünojenitede belirgin bir artış gözlenmiştir. Fakat konsantrasyonu

düşük olan konjugatların (<termal çökme konsantrasyonu) immünojenitelerinin serbest BSA'dan çok farklı olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışma, proteinlerin polimerler ile modifikasyonlarının açıklayıcı yöntemlerini içermesi açısından olduğu kadar, organizma için birçok olumsuz etkileri olabilen virütik aşuların olumsuz etkilerini içermeyen yeni tipli, yüksek etkinliği olan, polimerik sentetik aşuların oluşturulması için bir temel olması bakımından önemlidir.



## 2. PROTEİNLERİN POLİMERLER İLE MODİFİKASYONU

Proteinlerin veya diğerk moleküllerin sentetik polimerlerle modifikasyonlarının hem in vivo hem de in vitro reaksiyonlar için bir çok faydaları vardır. Polimerlerin geniş makromoleküllere kovalent bağlanmaları, makromoleküllerin yüzeylerini ve çözünürlük özelliklerini değiştirir. Bunun yanında, proteinlerin polimer modifikasyonları ile, onların biyoyumluluklarının ve in vivo stabilliklerinin artması, kendilerine karşı oluşan immün cevabın azalması veya artması ve organizmadan atılımlarının geciktirilmesi gibi özellikler edinmesi sağlanır. Enzimlerin polimerlerle modifiye edilmeleri onların çözelti halindeki stabilitelerini belirgin şekilde olarak değiştirir. Donmaya karşı hassas proteinlere polimer bağlanması ise proteinleri donmaya karşı korur.

Farmasetik ve immünolojik aktif kompleksler ve konjugatların üretilmelerinde çeşitli sentetik veya doğal polimerden faydalanılmışlardır. Polisakkaritler, poli-L-lizin ve diğerk poliaminoasitler, polivinilalkoller, polivinil piroidonlar, poliakrilikasit ve türevleri, poli N-izopropilakrilamid, farklı poliüretanlar çeşitli proteinlerle bağlanarak, oluşan kompleks veya konjugatların farmasetik ve immünojenite özellikleri incelenmiştir. (Duncan ve Kopecek, 1984)

Farmasetik aktif aplikasyonlarda çok sık kullanılan 2 polimer, dekstran ve PEG (polietilenglikol)'dir. Dekstran glukoz monomerinden, PEG ise etilenoksit monomerinden oluşmuştur. İmmünolojik aktif konjugat ve kompleksler oluşturmada kullanılan polimerler ise, poliakrilikasit, poli-N-vinil piroidon, poli-N-izopropilakrilamid ve dekstran olarak sayılabilir. Bu polimerlerle oluşturulan kompleks ya da konjugatın immünojenliği polimerin özelliklerine bağlıdır. Polimerlerin bir özelliği de, hidrofilik gruplara sahip polimerlerin proteine hidrofilik yani suda çözünebilir özellik kazandırmalarıdır.

Sonuç olarak proteinlerin polimerlerle modifiye edilmelerinin nedenleri şu şekilde sıralamak mümkündür.

- 1- Polimerler, farmasetik materyallerin isteğe göre yarı ömürlerinin azaltılması veya artırılmasında kullanılırlar.
- 2- Polimer, proteinlere, hidrofilik özelliklerinden dolayı suda çözünebilir özellik kazandırır.
- 3- Polimerler, organizmada protein antijenlere karşı oluşacak immünolojik özelliği artırır.
- 4- Polimerler, yüksek veya düşük sıcaklıklara karşı proteinleri korurlar.
- 5- Polimerler, protein molekülüne yüksek molekül ağırlığı özelliği, geniş yüzey alanı sağlar.

**Protein-Polimer Bağlanma Şekilleri** Her kimyasal modifikasyon veya konjugasyon prosesi bir fonksiyonel grubun diğeri ile reaksiyonunu içerir. Organik kimyasal proseslerden faydalanılarak reaksiyon sistemleri oluşturulur.

Protein ve polimerin birbirine bağlanmaları çeşitli şekillerde gerçekleştirilir. Bunlar kısaca aşağıdaki şekillerde sıralanabilirler.

- 1- Polimer ve proteinin iyonik kuvvetlerle veya hidrofobik etkileşimlerle birbirlerine bağlanarak kompleksler oluşturması. Polimer ve proteinin ikisinde negatif yüklü olduğu durumlarda ise metal aracılığı ile iyon koordinasyon bağları oluşturularak polimer-protein kompleksi oluşturulur.
- 2- Polimer ve protein kovalent olarak bağlanarak polimer-protein konjugatları oluşturur.
- 3- Radyoaktif ışın ile polimer ve protein üzerinde fonksiyonel grup oluşturularak kovalent bağ oluşumu ile polimer-protein kovalent konjugatı sağlanır.

## **2.1 Elektrostatik Etkilerle Oluşmuş Polielektrolit-Protein Kompleksleri**

Yapısında (-) veya (+) yük taşıyan polimerlere polielektrolit adı verilir. Ortamın pH'ına göre(-) veya (+) yük taşıyan polielektrolitler amaca uygun olarak çeşitli protein makromolekülleri ile elektrostatik etki ile bağlanıp suda çözünen veya çözünmeyen polikomplekslerin oluşumuna neden olurlar. Polielektrolit bir antijene bağlandığında, organizmanın antijene karşı immün cevabında artış gözlenir. Polielektrolitin taşıyıcı olarak kullanılması sadece immün cevapta artışa neden olmaz bunun yanında immün korumada da artışa neden olur.

Polimerlerin viskozitesi konsantrasyonun artması ile artarken, polielektrolitlerin viskozitesi konsantrasyon azaldıkça artar. Bunun nedeni azalan konsantrasyon içerisindeki (-) veya (+) yüklerin birbirlerini itmeleri ve şişmeye neden olmalarıdır.

**Protein-Polielektrolit Komplekslerinde Kendiliğinden yapılanma** Lineer ve küresel makromoleküllerin karşılıklı etkileşimlerinde iki tür kooperativite mümkündür. Birinci tür etkileşime göre makromoleküllerin yüzeylerindeki fonksiyonel grupların birbirleri ile etkileşime girme hızları komşularına bağlıdır. Diğer bir deyişle bu tür kooperatiflikte,

bağlanma reaksiyon hız sabiti protein molekülünün ölçüsüne bağlıdır. Bunun nedeni protein molekülünün, polielektrolitten farklı olarak yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar nedeni ile 'çok noktadan' karşılıklı etkileşerek reaksiyona girmeleridir. İkinci tür kooperatiflik ise hepsi yada hiçbiri prensibidir. Bu prensip, ortamda aynı anda birden fazla polimer ve protein bulunduğu geçerlidir. Bu durumda polimerlerin biri kendisine bağlayabileceği maksimum proteini bağlamadan diğer polimerler proteinlerle bağlanamazlar.

**Polimer Molekül Ağırlığının Kompleks Oluşumuna Etkisi** Protein-polielektrolit kompleksinin oluşumuna, polielektrolitin molekül ağırlığının, polimerleşme derecesi ile orantılı olmasından dolayı etkisi vardır. Polimerleşme derecesi arttıkça polimer ile bağlanan proteinin miktarında artış gözlenir. Bunun yanında kompleksin çökmesi de polimerin polimerleşme derecesine yani uzunluğuna bağlıdır. (Mustafaev,1996)

**Polikomplekslerin Çözünürlüğü** Elektrostatik kuvvetlerle oluşmuş komplekslerin çözünürlüğü ortamın iyonik şiddetine ve pH'ına bağlıdır. Ortamın iyonik kuvveti arttıkça kompleksin çözünürlüğü artar. Kompleks içersindeki polielektrolitin polianyon veya polikasyon olmasına göre de kompleksin çözünürlüğü pH değişimlerinde değişir. Polianyon içeren kompleksler pH azaldıkça çözülür, polikasyon içeren kompleksler ise pH arttıkça çözülür.

### 2.1.1 Doğal Polielektrolit Kompleksleri

Doğada kendiliğinden oluşmuş doğal polielektrolit komplekslerinin incelenmesi, yapay polielektrolit kompleksleri oluşturulması bakımından çok önemlidir. Hücre çekirdeğinde bulunan nükleoproteinler şeklinde bulunan nükleik asit kompleksleri veya hücre duvarlarının yapısını oluşturan peptido glikanlar doğal polielektrolit kompleksleri arasında sayılabilirler. Birçok bilim adamı, organizmada, protein ve polielektrolitlerin kooperatif yapı ile oluşturdukları biyosistemlerden esinlenmiş ve amaçları doğrultusunda benzer yapay kompleksler oluşturma çabasına girmişlerdir.

**Nükleik Asit Kompleksleri** Pozitif yüklü protein veya peptidlerle negatif yüklü DNA veya RNA kompleksleri en çok incelenmiş doğal polielektrolit kompleksleridirler. Bu komplekslere deoksiribonükleoproteinler veya ribonükleoproteinler adı verilir. Kompleksler proteinlerin pozitif yüklenmiş amino grupları ile nükleik asitlerin negatif yüklenmiş fosfat gruplarının birbirleri ile elektrostatik etkileşimlerinden meydana gelirler. Oluşan

nükleoproteinler yapılarına göre iki sınıfa ayrılırlar. Birinci sınıfın yapısı, bünyesinde bulundurduğu protein yapısı ile uygundur. Burada yapının ana şeklini ve iskeletini protein verir. Nükleik asit ya proteine sarılmıştır ya da protein iskeleti halinde toplanmıştır. İkinci sınıfın yapısını ise polielektrolitler belirler. Proteinler bu polielektrolitlerin arasına doldurulmuş durumdadırlar. Bu sınıfın en iyi incelenmiş olan yapısı ribozom yapısıdır. Bu sınıflandırmalardan çıkarılabilecek sonuç ise proteinlerin hidrofilik karakter taşıdığına sulu dış yüzeyle temas halinde olduğu ve bu nedenle kompleks yapısının kendisine göre oluşması fakat hidrofobik yapı taşıyıp kompleksin iç yüzeyine toplandığında ise yapının polielektrolit tarafından belirlendiğidir.

Doğal DNP ve RNP partiküllerinin fiziksel kimya yöntemleri ile incelenmeleri onların, kooperativite prensiplerine uygun olarak asimetrik kompleks oluşturduklarını göstermiştir. Ultracentrifüjda DNA-polipeptid sistemi iki fraksiyona bölünür. Birinci fraksiyon çıplak DNA, ikincisi ise kompleksin kendisidir.

### **2.1.2 Yapay Polielektrolit Kompleksleri**

Polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonları ile oluşan yapay komplekslerini ilk Morawetz, Stahmann, Katchalski ve arkadaşları araştırmışlardır. Polielektrolitlerin proteinlerle su ortamında kompleks oluşturması genel olarak karşılıklı reaksiyona giren bileşiklerin zıt yükler taşıması ilkesine dayanır.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, serum albumin (SA), ortamın pH'ının proteinin izoelektronik noktasından daha düşük olduğu durumlarda, anyonik polielektrolitler olan poliakrilik asit veya polimetakrilikasit veya polietilenimin ile suda çözünmeyen kompleksler verirler. Ortamın pH'ının SA'nın izoelektrik noktasından fazla olduğu durumlarda ise, SA negatif yüklenir ve katyonik polielektrolitler olan polilizin veya polivinilamin veya polidimetilaminoetilmetakrilatin ile çökelti verebilir.

Proteinlerin hem polibazlarla hem de poliasitlerle çökmesi çoğunlukla pI noktası ile çeşitli uygunluklarda olan pH'ın dar aralığında görülür.

Proteinlerin, polielektrolitler ile reaksiyonu sırasında oluşan çökeltinin çözülme mekanizması daha geniş şekilde protein-polilizin sistemlerinde incelenmiştir. Bu sistemlerde çözülme,

ortamın pH'ının , iyon gücünün ve ortamdaki polimer komponentlerinden birinin artırılması durumunda kolaylaştığı görülmüştür.

Aynı yüklü protein ve polimerlerin birbirine bağlanması zıt yüklü geçiş metal iyonları ile iyon koordinasyon bağı oluşturarak gerçekleştirilir.

### **2.1.3 Aynı Yüklü Polimer ve Proteinin Geçiş Metalleri varlığında Kompleks Oluşturması**

Metal iyonlarının biyolojik proseslerde çok önemli rolleri vardır. Polimer-metal komplekslerinin benzersiz özellikleri onların fizikokimyasal özelliklerinin tek başına polimer ve metalden daha farklı olmalarına dayanır. Son yıllardaki birçok yayın, metal bağlantılı komplekslerden oluşmuş ilaç yapısı ve doğal polielektrolit ve antijenlerin biyokonjugatları üzerinedir. Bu modellerin kullanılması ile doğal polimerlerin mekanizması ve metal iyonları varlığındaki davranışları ile ilgili daha fazla bilgi edinilmiştir. Polimer metal kompleksleri çok geniş çeşitlilikte biyomedikal preparatların yapılandırılmalarında kullanılmışlardır. Düşük molekül ağırlıklı geçiş metal iyonlarının nötral veya zayıf yüklenmiş suda çözünen polimerleri kendine bağlama özellikleri vardır. Böylece polimer komplementer yüzeylerle kompleks oluşturma özelliğini kazanmış olur. Polianyonlar, proteinlerle metal iyonları ile çapraz bağlama vasıtası ile iyon koordinat kompleksleri oluşturur.

Cu, Zn, Fe gibi metal iyonlarının immünokompetent hücreler üzerinde önemli etkileri vardır. Demir eksikliği, Hemopoiesis ve Lymphopoiesis'in inhibisyonunun engellenmesine ve timüste morfolojik değişikliklere neden olur. Bunun yanında dalaktaki T ve B bağımlı bölgelerde hücre azalmasına neden olur. (Mustafaev, 1996)

Polimer-Metal komplekslerine ait literatür araştırması metal iyonlarının polielektrolitlerin fonksiyonel grupları seviyesinde karşılıklı etkileşimi ile sınırlandırılmıştır. Çözünen ve çözünmeyen komplekslerin oluşumu metalik iyonların yüksek konsantrasyonlarında incelenmiştir. Aynı zamanda bağlama mekanizmasını anlamak ve makromolekül yapısındaki değişimleri izlemek için metal iyonlarının makromoleküller arasında dağılımını incelemek çok önemlidir.

### **2.1.4 Polielektrolit ve Proteinin Hidrofobik ve Van Der Vals Etkileşimleri ile Bağlanması**

Protein-polikasyon kompleksi oluştuğunda, protein grubunun yüzeyindeki negatif yüklü gruplarla polikasyon elektrostatik bağlar oluşur. Her iki makromolekül de  $-OH$  ve  $-CH_2$  fonksiyonel grupları taşıdığında Van Der Vals ve hidrofobik etkiler suda çözünen poliekompleksler oluşumuna neden olurlar. Bu sistemde iyon kuvveti arttığında polikompleks serbest komponentlerine parçalanmamaktadır.

Kobanov, Mustafaeve ve onların araştırmacıları lineer polielektrolitlerin aynı yüklü globular proteinlerle karşılıklı etkilerini incelemiş ve çok miktarda suda çözünebilen polimer-protein kompleksleri oluşturmuşlardır.

## **2.2 Protein-Polimer Kovalent Konjugatı Oluşumu**

Protein polimer konjugatı başlığı altındaki bu bölüm iki alt başlık altında incelenecektir. Bunlar,

- 1- Protein polimer konjugasyonuna baz oluşturacak, protein amin grubunun çeşitli kimyasal gruplar ile verdiği kovalent reaksiyonlar incelenecektir.
- 2- Protein amin gruplarının verdiği reaksiyonlar baz alınarak çeşitli sentetik polimerlerle proteinlerin kovalent reaksiyonları incelenecektir.

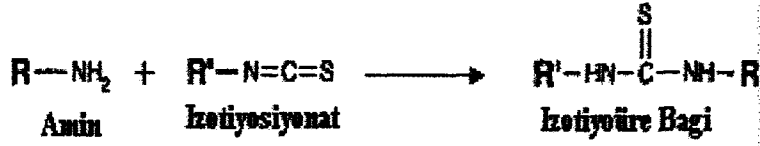
### **2.2.1 Protein Amin Gruplarının Çeşitli Gruplar ile Kimyası**

Bu bölümde, biyokonjugat kimyasının anlaşılması için hazır referans bilgi verildiği söylenebilir. Bu nedenle verilen reaksiyonların teorisi ve mekanizması hakkında derinlemesine bilgi yoktur.

Amin grupları, izosiyanatla, izotiyosiyanatlarla, asilazidlerle, NHS esterleri ile sülfonil kloridlerle, aldehitlerle, epoksit veya oksiranlarla, karbonatlarla, arilleme ajanları ile imidoesterlerle anhidritlerle modifiye edilebilirler.

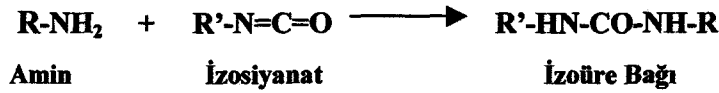
**Amin Grupların İzotiyosiyanat Grubu ile Reaksiyonu** İzotiyosiyanat komponenti, hedef amino gruplarının protonlanmadığı alkali pH değerlerinde en iyi şekilde reaksiyon verir. Bir

çok reaksiyon 0,1 M sodyum karbonat tamponunda pH 9'da gerçekleştirilir.



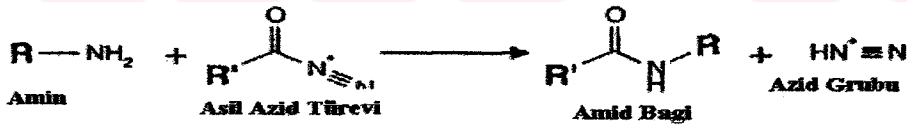
(2.1)

**Amin Gruplarının İzosiyanat Grubu ile Reaksiyonu** Bir izosiyanat, aromatik amin ile fosgen reaksiyonundan oluşur. İzosiyanatların reaktivitesi izotiyosiyanatlarınkinden fazladır. Bu nedenle de stabiliteleri problem telkil edebilir.



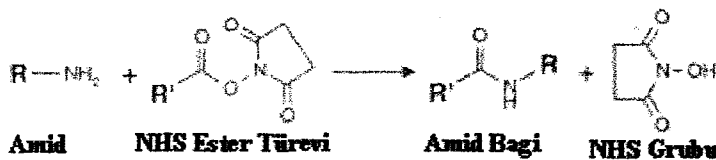
(2.2)

**Amino Gruplarının Asil Azidler ile Reaksiyonu** Asilazidler primer aminlerle amid bağı oluşturan aktive edilmiş karboksilat gruplarıdır. Reaksiyon için optimum şartlar pH 8.5-10 arasındadır. Kullanılan tampon çözeltide yarışmalı durum meydana getirecek amin veya diğer nükleofillerin olmaması gerekir. Asilazid bağlanmasında major yarışmalı reaksiyon hidrolizdir. pH ne kadar yüksekse reaktivite o kadar hızlıdır. Asilazid grubu içeren modifikasyon reaktifleri veya çapraz bağlayıcılar, aktivitelerinin korunmaları için kuru muhafaza edilmelidirler.



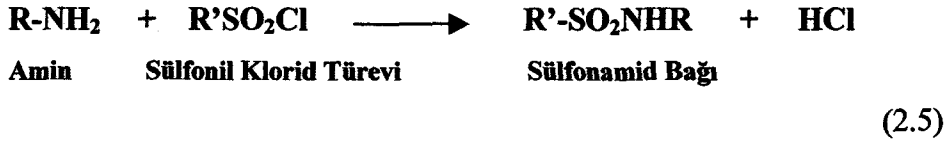
(2.3)

**Amin Gruplarının NHS (N-hidroksisüksinimid) Ester Grupları ile Reaksiyonu** NHS esteri ile modifikasyon reaktif asilleme ajanları oluşturmak için en yaygın aktivasyon kimyasıdır. NHS esterlerinin primer veya sekonder aminlerle reaksiyonu ile stabil amid veya imid bağları oluşur. NHS ester bağlayıcı reaktifler prensip olarak proteinlerin N-terminallerindeki  $\alpha$  aminler ile bağlanır.



(2.4)

**Amin Gruplarının Sülfonil Kloridler ile Reaksiyonu** Sülfonil Kloridler, reaktif sülfonik asit türevleridirler. Sülfonil Klorid, özellik ve reaktivite olarak karboksilatların asit kloritlerine benzerler. Tetradereal konfigirasyonundaki sülfonik aist grubu yüksek derecede engellenmiş bir moleküldür. Sülfonil klorid üzerindeki nükleofile karşı bir atak stabil olmayan geçici pentavalen intermedya oluşmasını sağlar. Bu nedenle sülfonatlarla ancak sülfonil klorid türevleri oluşturulur. Sülfonil klorid kompondunun primer amin içeren molekül ile reaksiyonu klor atomunun ayrılması ve sülfonamid bağının oluşması ile sonuçlanır. Sülfonil kloridin amin ile reaksiyonu alkali pH(9-10)şartlarında ilerler.

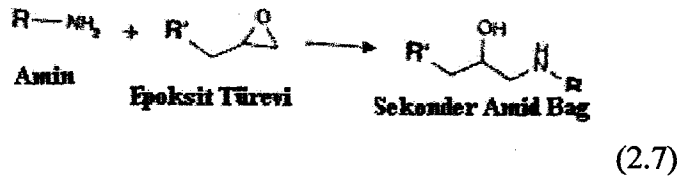


### Amin Gruplarının Aldehit İçeren Bileşiklerle Reaksiyonu



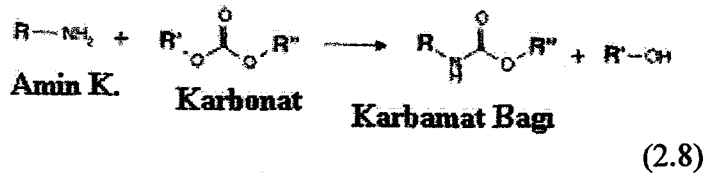
Aldehit ve keton gibi karbonil grubu içeren bileşikler, aminlerle Schiff baz intermedyası oluşturarak reaksiyon verirler. Bu interaksiyon pH bağımlıdır. Reaksiyondan çıkan Schiff bazı kararsız bir bileşiktir. Bu nedenle sodyumborohidrit veya sodyumsiyano borohidrit'in reaksiyon ortamına katılması ile Schiff bazının indirgenmesi sağlanarak, stabil hale getirilmesi sağlanır.

### Amin Gruplarının Epoksitler ile Reaksiyonu



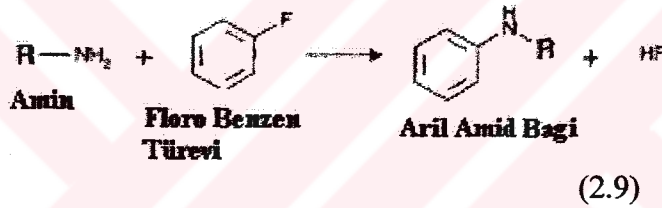
Epoksit grupları, nükleofillerle halka açılması prosesi içinde reaksiyon verirler. Epoksitlerin, primer amin, sülfhidril veya hidroksil grupları ile reaksiyona girmesi sekonder amin, tiyoeter ve eter gruplarının oluşması ile sonuçlanır. Bağlanma esnasında oluşan halka açılması epoksi kompondu üzerinde hidroksi grubu oluşmasını sağlar. Reaksiyon genellikle yüksek pH'da gerçekleşir.

### Amin Gruplarının Karbonatlar ile Reaksiyonu



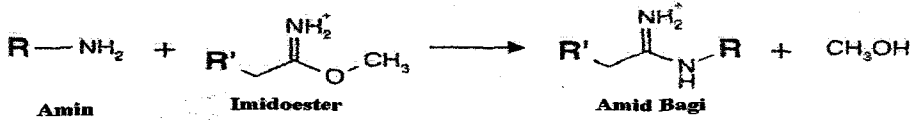
Karbonatlar, karbonik asitlerin diester türevleridirler. Karbonatlar, fosgen veya karbonil diimidazol gibi bifonksiyonel komponentlerin iki alkolle reaksiyonel girmesinden oluşur. Karbonatlar nükleofillerle hızlı reaksiyon vererek son derece stabil olan karbamat bağlarını oluştururlar. Karbonat fonksiyonel gruplarının bir amin ile reaksiyon vermesi en iyi hafif alkali çözeltilerde gerçekleşir.(pH7-9 aralığında). Reaksiyon ortamında yarışma durumu yaratacak başka amin veya sülfidril komponentleri bulunmaması gerekmektedir.

### Amin Gruplarının Arilleme Ajanları ile Reaksiyonu



Florobenzen türevleri, proteinler gibi amin içeren komponentlerle kovalent bağlar oluştururlar. Aril halidlerin reaktivitesi aminler için spesifik değildir. Florobenzen tipli komponentler, homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanların fonksiyonel gruplarıdır.

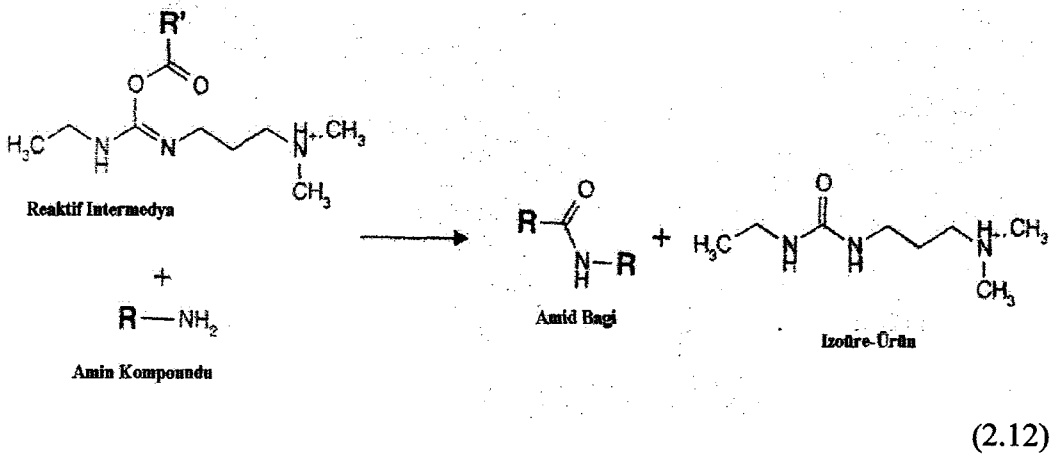
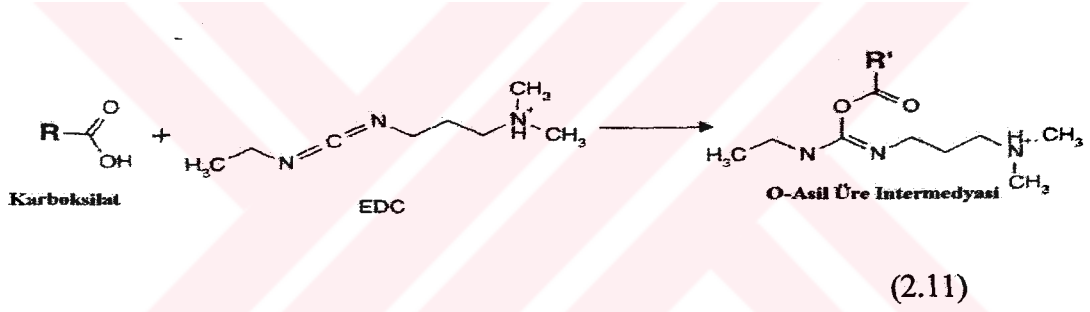
### Amin Gruplarının İmidoesterler ile Reaksiyonu



(2.10)

İmidoesterler, primer aminleri modifiye etmek için kullanılan en spesifik asilleyici fonksiyonel gruplardır. Diğer bağlama kimyalarında olduğu gibi, imidoesterler proteinlerdeki diğer nükleofilik gruplarla minimum çapraz bağlama özellik gösterirler. Proteinlerin  $\alpha$  veya  $\epsilon$  aminleri pH 7-10 arasında homobifonksiyonel imidoesterler tarafından hedeflenir ve çapraz bağlanırlar. Bu reaksiyonun ürünü olan imidoamid fizyolojik pH'da muhafaza edilir.

**Amin Gruplarının Karbodiimid vasıtası ile Karboksilik Asitlerle Reaksiyonu**  
 Karbodiimidler, O-uzunluklu çapraz bağlayıcı ajanlardır. Bu nedenledir ki protein modifiye etmede en yaygın ve etkin bir şekilde kullanılan prosedürdür. Bu ajan karboksilat ve amin veya fosfat ve amin arasında amid veya fosforamid bağı oluşturur. N-süstitue karbodiimidler karboksilik asitlerle yüksek reaktivitede O-asil üre türevleri oluştururlar ve bu türevler çok kısa ömürlü türevlerdir. Karbodiimidler, bu nedenle O-uzunluklu reaktifler olarak adlandırılırlar çünkü konjuge olacak bağlar arasında başka farklı kimyasal bir yapı yoktur. Fosfat tamponu, reaksiyonun gidişatı esnasında, pH'ı stabilize etmek için kullanılabilir. Oligonükleotidlerin 5' fosfatı gibi, fosfat içeren moleküllerde amin içeren moleküllere konjuge edilebilirler. Karbodiimid fosfatı, bir intermedya olan fosfat esterine aktive eder. Amin varlığında, ester, stabil bir fosforamid bağı oluşturur. Karbodiimidden faydalanılarak oluşturulan amid bağı etkili bir şekilde pH 4,5-7,5 arasında oluşur.

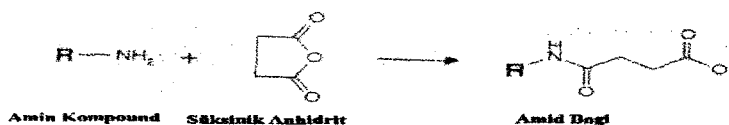


Doğru spesifiklikte antikor üretimi sağlamak için, bir haptin ile taşıyıcısının bağlama kimyası çok önemlidir. Çapraz bağlama metodolojisi, taşıyıcı ve haptin üzerinde varolan fonksiyonel gruplarla belirlenir. Konjugasyonu sağlayan çapraz bağlama reaktifinin

potansiyel olarak antikor üretimi sağlaması istenmeyen bir durumdur. Bu durum haptene karşı arzu edilen spesifik antikor konsantrasyonunu düşürür. 'O uzunluklu' çapraz bağlama prosedürü (suda çözünen karbodimid ile) bu problemi giderir. Bu prosedürde haptene ve taşıyıcı arasında molekül yoktur. Karbodimid önce, taşıyıcı veya haptene üzerindeki karboksilik grup ile yüksek aktivitedeki O-asil türe intermedyasını oluşturur. Aktive olmuş karboksilik grup daha sonra primer amin ile amid bağı oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu arada karbodimid medyası çözünebilir bir izotürevi olarak ortamdan ayrılır. Reaksiyon yaklaşık 2 saatte tamamlanır ve konjuge olmuş immunojen oluşur.

Birçok peptid haptene konjugasyon için amin ve karboksilik asit grupları içerirler. Konjugasyon peptidin N-terminali ile olabileceği gibi yan zincirlerindeki amin grupları ile de olabileceğinden yan zincir amin grupları bloke edilmelidir. Bunun yanında, peptidin taşıyıcı üzerinde polimerize olması veya çapraz bağlanması peptidin immunojenliği için de faydalıdır. Bu daha fazla antikor cevabına neden olur.

**Amin Gruplarının Anhidritler ile Reaksiyonu** Asit anhidritler, 2 karboksilik asit grubunun dehidrasyon reaksiyonundan oluşur. Anhidritler, nükleofiller karşısında yüksek derecede reaktifler ve proteinlerin önemli fonksiyonel gruplarını asilleyebilirler. Her asillenmiş ürün için anhidritler bir karboksilik asit oluştururlar. Eğer anhidrit, bir monokarboksilik asitten oluştuysa, asilasyon bir karboksilat grubunun serbestleşmesi ile sonuçlanır. Fakat anhidrit, dikarboksilik asit ise (süksinik anhidrit gibi) bir nükleofille reaksiyon esnasında anhidritin halka yapısı açılır. Böylece anhidrit reaktifleri, hem fonksiyonel grupları bloke etmede hem de var olan fonksiyonel grupları karboksilik asite çevirmede kullanılabilir. Anhidritlerle reaksiyona giren protein fonksiyonel grupları, N-terminalde  $\alpha$  aminler bulunduran anhidritler, lizin yan zincirlerinin  $\epsilon$  aminleri, sistein sülfhidril grupları, tirozil aminoasitlerinin fenolat iyonları ve histidinlerin imidazol halkalarıdır. Bunlardan, sistein, tirozin ve histidin yan zincirlerinin asilasyonları stabil olmayan komplekslerin oluşumu ile sonuçlanır. Sadece proteinlerin, amin fonksiyonel grupları, anhidrit reaktifleri ile asillendiklerinde stabil amid bağları oluşur. Yan zincirler bloke edilebilir.



(2.13)

## 2.2.2 Proteinlerin Polimerlerle Kovalent Bağlanmalarının İncelenmeleri

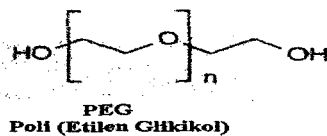
### 2.2.2.1 Aktive Olmuş Polietilen Glikol İle Protein Bağlanması

PEG'in proteinlere bağlanmaya çalışılmasının başlıca sebepleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

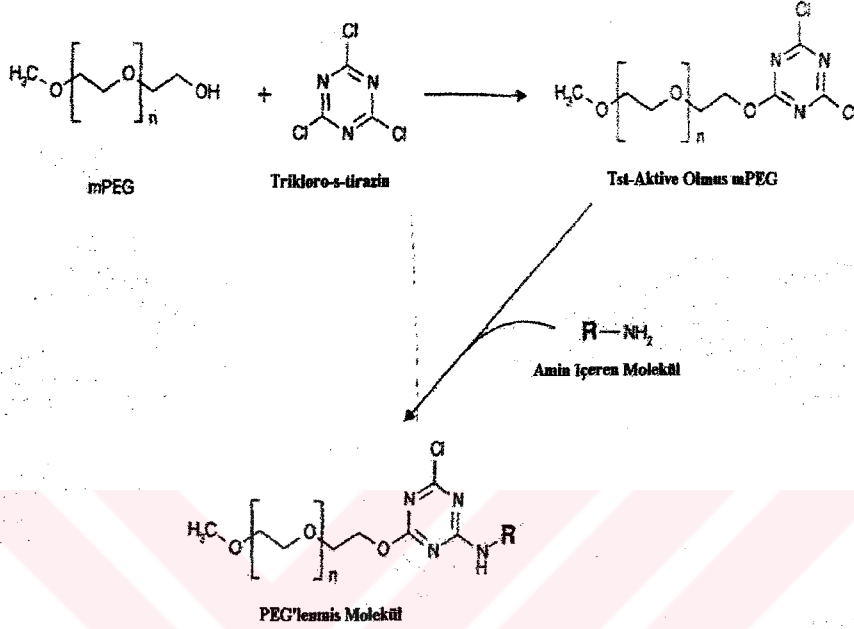
- 1- Sulu ve organik çözeltilerde proteinlerin çözünürlüğünü değiştirmek.
- 2- Proteine karşı immün cevabın modülasyonunu sağlamak.
- 3- Protein çözeltilerinin stabilitesini sağlamak.
- 4- Proteinlerin in vivo yarı ömürlerini arttırmak.
- 5- Proteinlerin hücre membranlarına hedeflemesini yapmak.
- 6- Proteinlerin farmasötik özelliklerini değiştirmek.
- 7- Proteinlerin biyoyumluluklarını arttırmak ve yüzeyleri protein adsorbsiyonundan korumak.

PEG, lineer zincirinin her iki ucunda da hidroksil grupları içeren etilen oksit ünitelerinin tekrar etmesinden oluşur. Etilen oksitin anyonik polimerizasyonundan meydana gelir. Polimerizasyon şartlarına göre farklı molekül ağırlıklarına sahip polimer çeşitleri oluşur. Biyokonjugat uygulamalarında kullanılan birçok çeşit PEG'in molekül ağırlığı 20.000'den azdır.

PEG'in polimer iskeleti biyolojik orijinli olmadığından dolayı, memeli canlıların organizmaları tarafından bozunamazlar. Polimerin bu özelliği PEG ile modifiye edilmiş materyalin in vivo kullanıldığında yarı ömrünün uzamasını sağlar. PEG ile modifiye edilmiş moleküller hızlı bir şekilde bozunmadan korunurlar. PEG'in çözelti halinde veya diğer moleküllere bağlandığında etrafındaki başka polimerleri dışlayan bir özelliği vardır. Bu nedenle PEG'in proteinlere bağlanması için aktive edilmesi gerekmektedir. İstenmeyen çapraz bağlanmalarının önüne geçmek için -OH gruplarından birinin metil grubu ile bloke edildiği monofonksiyonel PEG(mPEG) kullanılır.



## Trikloro-s- tirazin Aktivasyonu



(2.15)

PEG'in aktivasyonu için kullanılan en yaygın ve etkili metodlar, PEG'in proteinlerle veya  $\text{NH}_2$  içeren bileşiklerle sekonder amid bağları oluşturmasını sağlayacak metodlardır. PEG'in aktivasyonu için en eski metod trikloro-s-tirozin metodudur. Tst, üç reaktif asil benzer klor taşıyan simetrik, heterosiklik compoundur. Bu reaktif ve türevleri, boya molekülleri ve fabrikler arasında da kuvvetli kovalent bağ oluşumunu gerektiren endüstriyel aplikasyonlarda kullanılırlar. Tst ile PEG'in reaksiyonu sonucu, polimer hidroksil grubundan eter bağı oluşturarak aktive olur.

Sulu çözelti içersinde. Tst üzerinde 3 reaktif klorun farklı reaktiviteleri vardır. İlk klor, hidroksile karşı pH 9 ve 4 'de reaktiftir. (Mumtaz ve Bachawat 1991, Abuchowski et al. 1977a) İlk klor bağlandıktan sonra ikinci klorun bağlanması için ortamın aynı pH ve fakat bu defa sıcaklığın oda sıcaklığında olması gerekir. 2 klor nükleofilik gruplara bağlandıktan sonra üçüncüsünü bağlamak nisbeten daha zordur. Sıcaklığın en az  $80^\circ\text{C}$  olması gerekir. Primer amin içeren moleküllerin modifikasyonu pH bağımlıdır. Fizyolojik pH değerlerinde, reaksiyon alkali pH ortamında olduğundan daha yavaş hareket edecektir. Optimal türev

etkinliği pH 9 veya üzeri durumlarda gerçekleşir. Tst, reaktivitesi aminler karşısında dışlayıcı değildir.

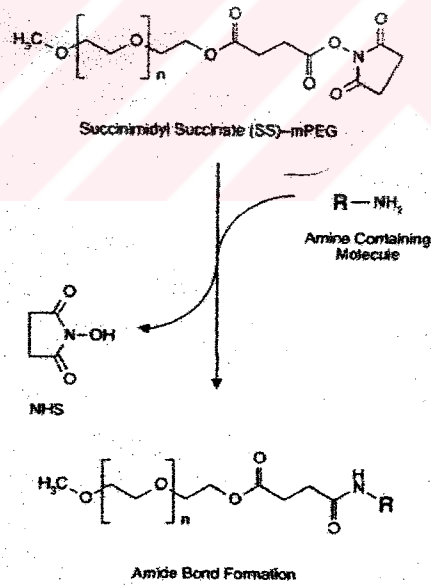
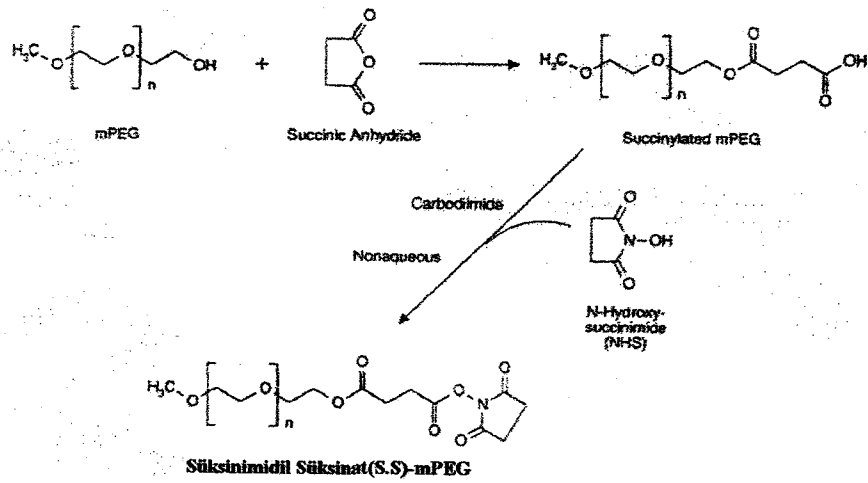
### **NHS Ester ve NHS Karbonat Aktivasyonu ve Bağlanması**

**NHS Ester Aktivasyonu ve Bağlanması** NHS grupları ile aktive olmuş karboksilat grupları amin nükleofilleri karşısında yüksek derecede reaktiftir. (Bragg ve Hou, 1975- Lomant ve Fairbank 1978). PEG'in süksinik anhidritle oluşturduğu süksine olmuş mPEG'in , fizyolojik pH'daki mükemmel reaktiviteleri, NHS ile NHS esterlerinin oluşmasını sağlar. NHS esterleri de biyokonjugat kimyasında major amin bağlama materyalidir.

NHS ester içeren kompondlar, nükleofillerle NHS grubunu ve asillenmiş ürünü açığa çıkaracak şekilde reaksiyon verirler. Karboksilat grupları, sülfidril veya hidroksil grupları ile bu esterlerin reaksiyonu mümkündür. Fakat bu gruplarla oluşan konjugatlardaki, tiyoester veya ester bağları stabil değillerdir. Histidininin imidazol halkasına ait nitrojenler de NHS esteri reaktifi ile asiilenebilirler fakat, onlarda hızlı bir şekilde hidroliz olurlar. (Cuatrecasas and Parikh, 1972) NHS esterlerin primer ve sekonder aminler ile oluşan konjugatları stabildir, bu nedenle oluşan amid veya imid bağlarının kırılması zordur. NHS esterleri, protein moleküllerinin N-terminal uçlarındaki  $\alpha$  aminlerle veya lizin yan zincirine ait  $\epsilon$  amin ile reaksiyona girerler.

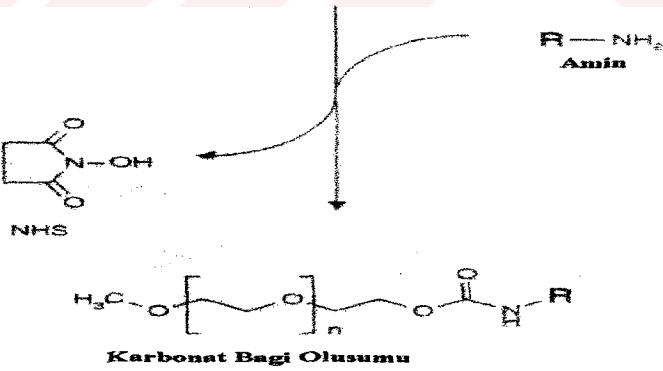
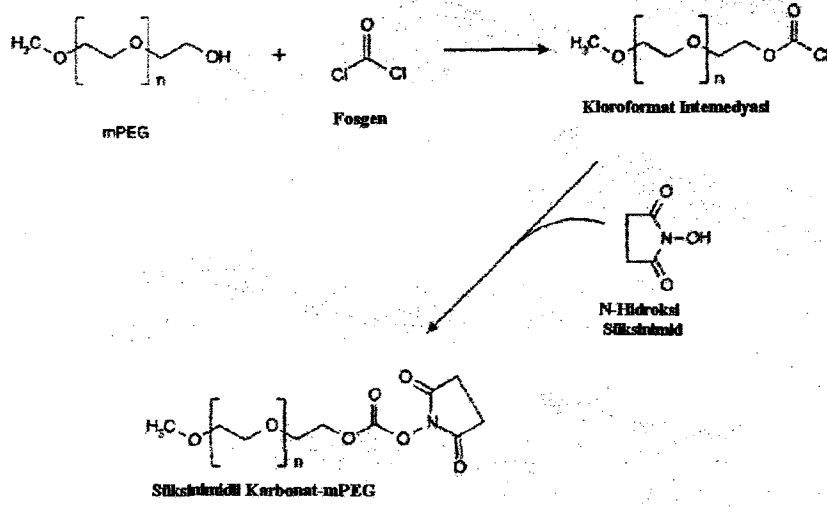
PEG normalde hiç karboksilat grubu içermez fakat anhidrit kompondlarla reaksiyona sokularak karboksilat grubuna sahip olur. Monofonksiyonel PEG'in süksinik anhidritle modifikasyonu ile PEG'e karboksilat grubu bağlanmış olur. Bu asillenmiş kompondunun NHS ester türevi amin içeren moleküllere karşı yüksek derecede reaktiftir.(Abuchowski et al. 1984) Bu prosedür sonucu oluşan konjugat hidroliz olmamasına rağmen hidroliz olabilecek potansiyele sahiptir.

**2- NHS Karbonat Aktivasyonu ve Bağlanması** NHS ester aktivasyonu yönteminde oluşan süksinimidil süksinat intermedyasının hidroliz olabilme potansiyeli NHS Karbonat aktivasyonu yönteminde oluşan süksinimidil karbonat intermedyasında yoktur. Bu metolla oluşan karbonat intermedyası amin içeren bileşiklerle reaksiyon verir ve oluşan konjugatın hidroliz olma özelliği yoktur. Bu nedenle PEG'in süksinimidil karbonat metodu ile aktivasyonu, polimeri amin içeren proteinlere bağlamanın etkili ve güvenli bir yoludur.



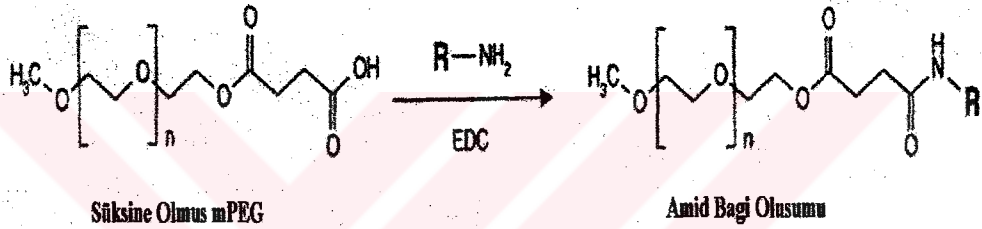
(2.16)

## NHS Karbonat Aktivasyonu ve Bağlanması



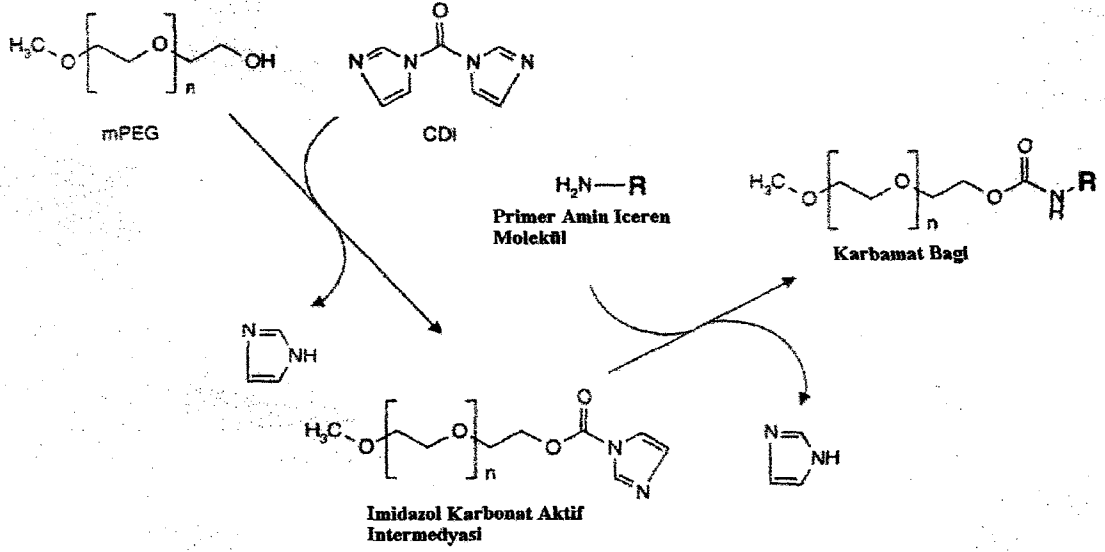
(2.17)

**Karboksilat-PEG türevlerinin karbodiimid ile amin grubu ile bağlanması** PEG'in diğer moleküllere etkili bir şekilde konjugasyonu için, sadece hidroksil grupları vardır. Bu hidroksiller anhidrit compoundları ile karboksilatlarını oluşturmak üzere modifiye edilebilirler. PEG'in süksinik anhidrit ile asillenmesi ile PEG üzerinde karboksilat grubu oluşturulur. Monofonksiyonel PEG'de sadece tek bir uçta karboksil grupları vardır. Karboksilat PEG modifikasyonundan sonra, PEG'in karboksilat grubu 'O uzunluklu' adı verilen karbodiimid ile reaksiyona girer ve oluşan intermedyadan karbodiimid ayrılarak proteinlerin amin grubu ile sağlam bağlar oluşturur.



(2.18)

**CDI (N-N'-Karbodiimidazol) Aktivasyonu ve Bağlanması** CDI peptid sentezinde de kullanılan ilk mükemmel yüksek reaktivitede karbonilleme compoundudur. (Paul ve Anderson 1962) Daha sonra hem karboksilik gruplarını hem de OH gruplarını amin içeren reaksiyonlara için aktive etmede kullanılmışlardır. Karboksilat grubunun CDI ile aktivasyonu sonucu oluşan intermedya primer amin içeren compound varlığında, stabil bir amid bağı oluşmasını sağlar. Hidroksil içeren compoundlar ise, CDI ile imidazol karbomat intermedyası oluşturur ve bu intermedya da amin içeren compoundlarla reaksiyona girer. PEG'in CDI aktivasyonu ve proteine bağlanması sonucu oluşan bağ bir önceki bölümde anlatılan süksinimidil karbonat bağı ile aynıdır. CDI-PEG veya CDI-mPEG reaksiyonu için optimal bağlama alkali pH(8.5) ortamında sağlanır. Bağlanma reaksiyonu hedef molekülün pI değerinin 1 değer üzerindeki pH'da mümkün olur. Eğer hedef molekülün suda çözünürlüğü az ise, reaksiyon direk olarak organik ortamda gerçekleştirilir. Organik bağlama reaksiyonunun avantajı, hidroliz olayına meydan vermemesi ve çok yüksek PEG sübstitüsyon ürünleri elde edilmesidir.



### 2.2.2.2 Aktive Edilmiş Dekstranların Bağlanması

Dekstran, maya ve bakteride enerji stoğu olarak sentez edilen doğal bir polimerdir. D-Glukoz ünitelerinin glikozidik bağları ile birbirlerine bağlanmalarından oluşur.

Dekstran iskeletinin hidrolik içeriği polimere hidrofilik özellik verir ve bu özelliği nedeni ile diğer moleküllere bağlanarak modifiye olabilirler. Dekstran, PEG'de olduğu gibi lineer zincirlerin uçlarında 2 adet -OH grubu içermez, herbir monomerinde en azından 3 -OH grubuna sahiptir. Dekstranın bu çok değerli doğası polimer zinciri boyunca birçok bölgesinden molekül bağlayabileceği anlamına gelir.

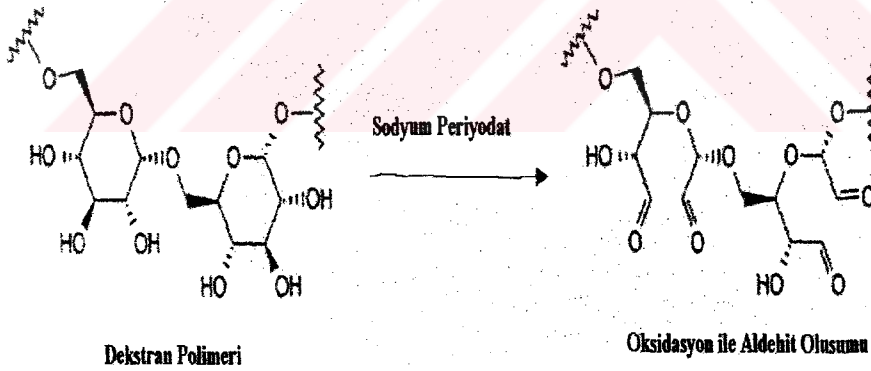
Molekül ağırlığı 10000-500000 arasında olan çözünebilir dekstran, protein veya diğer molekülleri modifiye etme veya çapraz bağlama ajanları olarak kullanılabilirler. Dekstranlardan aşağıdaki şekillerde faydalanılabilir,

- 1- Antineoplastik farmasetiklerin in vivo tümör bölgelerine daha yüksek konsantrasyonlarda taşınabilmesinde taşıyıcı olarak kullanılabilir.(Bernstein at al. 1978-Heindel et al. 1990)
- 2- İmmun cevap oluşturmak için haptent taşıyıcı olarak kullanılabilir. (Brunswick et. Al 1998)

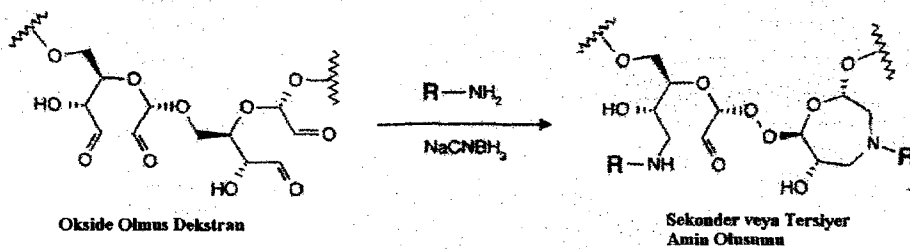
- 3- Kemoterapik ajanlarla monoklonal antikor konjugatlarının çapraz bağlayacak çok fonksiyonlu bağlayıcı olarak kullanılır. (Heindel et. Al. 1991)
- 4- Enzimleri ve proteinleri stabilize etmede kullanılırlar. (Nulcumura et. Al. 1990)
- 5- Makromoleküllerin in vivo yarı ömürlerini arttırmada kullanılırlar.

**Polialdehit Aktivasyonu ve Bağlanması** Dekstran polimeri, her glukoz monomer grubunda yan hidroksil gruplar içerir. Bu dioller sodyum periyodat ile okside edilerek bağlı oldukları C-C bağları kırılır ve aldehit dekstran oluşur. Böylece polimer birçok amin içeren bileşik ile bağlanabilecek yüksek reaktivitede bir hal almış olur. (Bernstein et. al. 1978) Polialdehit dekstran, stabil ikincil bağların oluşmasını sağlayan indirgen aminasyonu takiben amin grupları ile Schiff bazı oluşturarak konjuge olurlar.

Proteinler, okside edilmiş dekstran polimerleri ile normal şartlarda Na-Siyanoborohidrit ajanı kullanarak modifiye edilebilirler. İndirgen aminasyon reaksiyonu için optimal pH 7-10 arasındadır. Reaksiyonun oranı pH 8-9 arasında en yüksektir. (Kobayaski ve Ichishima 1991)



(2.20)



(2.21)

## 2.3 Radyasyon Etkisi İle Polimer-Protein Bağlanması

Radyoaktivite terimi Marie Curie tarafından ağır elementlerden iyonize edici radyasyonun yayılmasını açıklamak için ortaya atılmıştır. İsminden de anlaşılacağı gibi, madde ile iyon meydana getirmek üzere interaksiyona girer. Bu radyasyonun kimyasal bağları kırabileceği anlamına gelir.

### 2.3.1 İyonize Edici Radyasyon Tipleri

**Alfa ( $\alpha$ ) Işınları** Bu tip radyasyon  $\alpha$  partikülleri akımından oluşur. Bu partiküller Helyum-4 atomu çekirdeği ile aynıdır.  $\alpha$  ışınları madde içersine yayıldıkça, maddeye nüfus etme özelliği düşük olmasına rağmen iyon meydana getirir.  $\alpha$  partikülleri pozitif yüklü olduklarından dolayı , elektrik ve manyetik alan tarafından çevrilir.  $\alpha$  partiküllerinin radyoaktif çekirdek tarafından üretilmesi nükleer eşitlik tarafından açıklanabilir. Bu nükleer eşitlikte, eşitliğin her iki tarafındaki kütle numaraları ile atom numaralarının toplamı birbirine eşittir.  $\alpha$  ışınları yayılımı esnasında radyoaktif elementin kütle numarasında 4, atom numarasında ise 2 azalma olur.

**Beta ( $\beta^-$ ) Işınları** Bu tip ışınlar  $\beta$  partiküllerinden oluşurlar,  $\beta$  partikülleri elektronlarla birbirlerinin aynıdır. Beta ışınının maddeye nüfus etme özeliği  $\alpha$  partikülünden fazla olmasına rağmen iyon meydana getirme gücü daha azdır. Alüminyum folio içersine 2-3 mm. nüfuz edebilir. Negatif yüklü olduklarından dolayı, beta partikülleri elektrik ve manyetik alanda  $\alpha$  patiküllerinin zıt istikametine çevrilirler. <sup>234</sup> Th çekirdeği beta emisyonu vererek bozunmaya uğrar. Bir çekirdek beta partikülü kaybettiğinde, çekirdeğin atomik numarası bir ünite artıyor, kütle numarası ise aynı kalıyor.

**$\gamma$  (Gamma Işınları)** Bazı durumlarda,  $\alpha$  veya  $\beta$  partikülleri yayan radyoaktif bozunma prosesleri sonucunda çekirdek halen enerjetik ve kararsız durumda olduğundan, stabil hale gelmek için enerjisini gama ışını şeklinde kaybeder. Gama ışınları yüksek nüfuz etme özelliğine sahip bir radyasyondur. Elektrik ve manyetik alan tarafından çevrilmezler.

### 2.3.2 Radyasyonun Madde Üzerine Etkisi

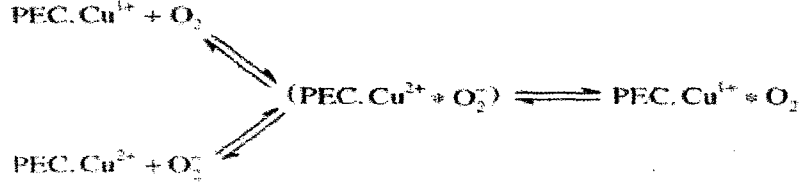
$\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  ışınlarının madde ile interaksiyonlarında farklılıklar bulunmasına rağmen atomları ve molekülleri iyonlaştırmaları ortak özellikleridir. Radyasyonun, iyonlaştırma gücü, oluşturduğu iyon çifti sayısı ile açıklanabilir. Bir iyon çifti, iyonize olmuş elektron ve oluşturduğu pozitif iyondan oluşur.  $\alpha$  partiküllerinin yüksek iyonize edici güçleri vardır. Radyasyon partiküllerinin atomlarla çarpışmasından direk olarak üretilen iyonize olmuş elektronlar primer elektron adını alırlar.

Bütün interaksiyonlarda, radyasyon, madde ve iyon çifti meydana getirmez. Bazı durumlarda, elektronlar, basit olarak daha yüksek atomik veya moleküler enerji seviyelerine yükselirler. Bu elektronların normal durumlarına dönme sıralarında ise radyasyon yayılması meydana gelir. Bu durumda, çekirdeğin içerdiği enerjiye bağlı olarak x ışını, uv ışın veya görünür ışın meydana gelir. Bu ışınlardan, çeşitli analiz cihazlarında olduğu gibi günlük hayatta faydalanılabilir.

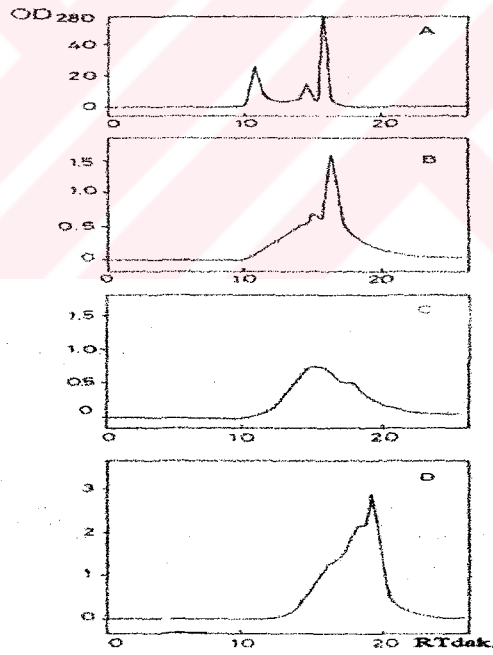
Daha öncede bahsedildiği gibi sentetik polielektrolitlerin biyomoleküllerle suda çözünebilen biyokonjugatları çeşitli alanlarda faydalı compoundlardır. (Petrov et al., 1992; Voychec ve Tan, 1992), Bu gibi sistemler çok noktadan elektrostatik ve hidrofobik intreaksiyonlarla stabilize olmuş ve fonksiyonel grupları vasıtası ile kovalent olarak bağlanmış kompleksleri içerir. Fakat polielektrolitler veya makromoleküller bağlanma için gerekli fonksiyonel grupları içermediklerinde polimeri veya makromolekülü modifiye etmek gerekmektedir ki bu durum polimerin ve makromolekülün birbiri ile bağlanıp biyolojik sistemlerdeki etkilerini değiştirebilir.

Mustafaev ve arkadaşları anyonik polielektrolit poliakrilik asit ile sığır serum albümini  $^{60}\text{Co}$  gama ışını ile farklı şiddetlerdeki radyasyona tabi tutup bağlamışlar ve sonuçları yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile incelemişlerdir. Radyasyon etkisi ile PAA ve BSA'nın fonksiyonel grupları olduğundan birbirleri ile kovalent bağ yapmışlardır. Bunun yanında suda çözünen üçlü polielektrolit- $\text{Cu}^{2+}$ -BSA kompleksleri oluşturularak, bu komplekslerin üzerinde farklı şiddetlerdeki radyasyonun etkisi yüksek basınçlı sıvı kromatografi ile ölçülmüştür.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun polimer protein karışımına eklenmesi polimer ve proteini radyasyon hasarından korumuştur. Bunun nedeni kompleks içerisindeki  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun su

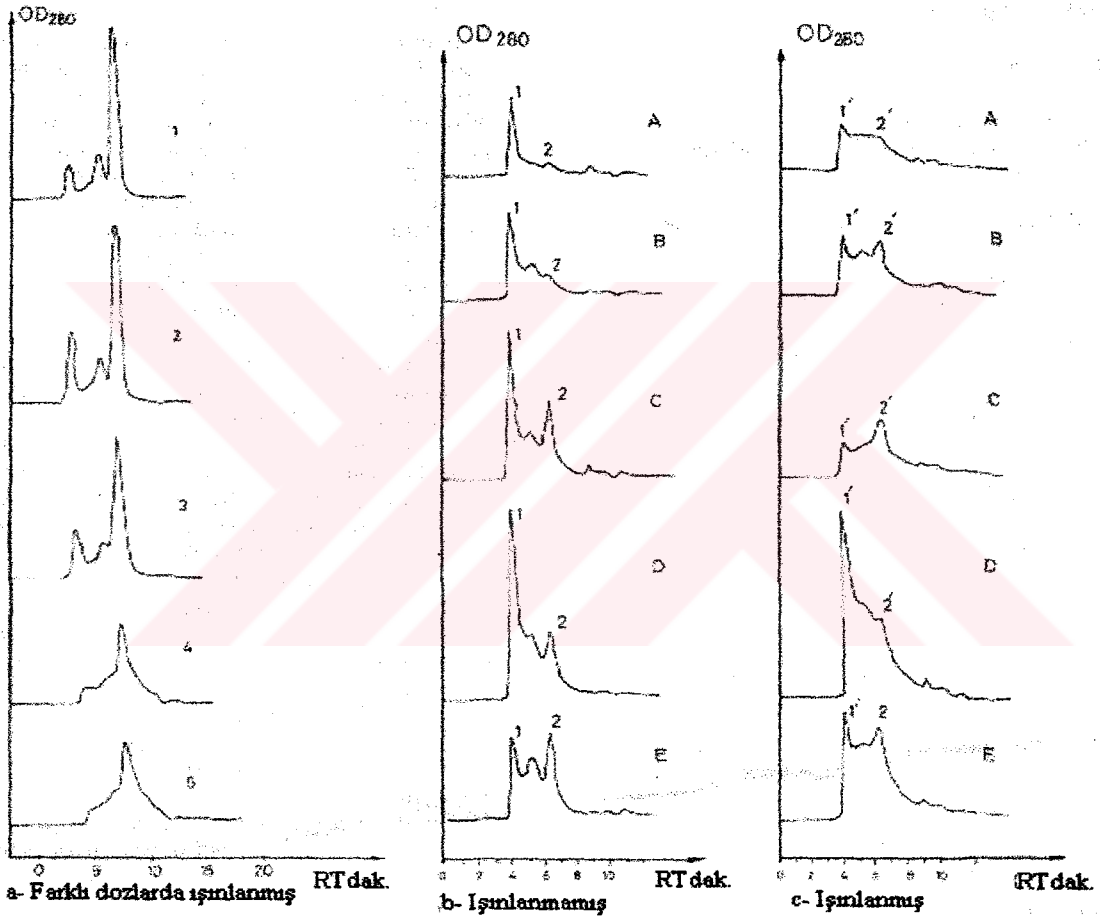
ortamında radyasyon etkisi ile oluşmuş süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) ile kompleksleşmesi ve süperoksit anyonun makromoleküler  $O_2^-$ 'e dönüşmesidir.



Şekil 2.1 Radyasyonun  $Cu^{2+}$  içeren polielekrolit sistemleri üzerine etkisi (Mustafaev vd.2000)



Şekil 2.2 Işınlanmamış (A) ve farklı dozlarda ışınlanmış (B-D) PAA-BSA karışımları (B=100 Gy; C=300 Gy; D=1200 Gy;  $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$  g/lt.) HPLC sonuçları (Mustafaev et al, 2000)



(A) Farklı dozlarla ışınlanmış (2-5 2=300 Gy. ; 3= 1200 Gy. ; 4=2500 Gy.; 5= 3000 Gy. ) ve ışınlanmamış (1) PAA-Cu<sup>2+</sup>-BSA karışımları HPLC sonuçları  $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$  gr./lt.

$$Cu=1.4 \cdot 10^{-3} \text{ gr.mol/lt.}$$

(B) ışınlanmamış (C) ışınlanmış farklı oranlardaki BSA ve PAA karışımları ile hazırlanmış PAA- Cu<sup>2+</sup>-BSA karışımları,  $n_{BSA}/n_{PAA} = A:0.1; B:0.2; C:0.5; D:1; E:3$  HPLC sonuçları

$$Cu=1.4 \cdot 10^{-3} \text{ gr.mol/lt. Işınlama dozu 1200 Gy.}$$

(Mustafaev et al., 2000)

### 3. POLİMER-PROTEİN SİSTEMLERİNİN İMMÜNOLojİK AKTİVİTESİ

Yüklü olamayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerler (polivinilpirolidon, polietilen glikol) eritrositlerin immün cevabını pratik olarak değiştirmezler. Bu nedenle adjuvant etkisine sahip değillerdir. Bazı kopolimerlerin adjuvant olarak kullanılması ise immünolojik aktiviteyi azaltacak şekilde etki gösterir. Örneğin akril asidin metil vinil piridinle kopolimeri homopolimerden farklı olarak immün cevabı kesin bir şekilde azaltmaktadır. Bu polimerlerde immün yatıştırıcı etkisi gösterir ve bu amaçla faydalanılabirler. Çalışmalar sonucunda adjuvant olarak kullanılan polimerin etki mekanizmasının polimerin kimyasal yapısına bağlı olmadığı görölmüştür (Kobanov vd., 1984). Yapılan çalışmalar sonucunda Poliakrilikasit, polivinilpiridin, polikanidin ve bunların dörtlü tuzları ile yapılan çalışmalar sonucunda immüniteyi uyarıcı aktifliğin polimer zincirinin uzunluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir.

İmmünolojik aktifliği arttırmak için sentezlenmiş ilk suni antijen, poli-2-metil-5-vinil piridin trifenol ile elektrostatik kompleksidir. Bu suni antijen kullanıldığında immün cevabı arttırmak için ilave yardımcıları kullanılmasına gerek kalmaz. Bunun nedeni, antijenin T (timüs) hücrelerinden bağımsız olarak antikor oluşumunu uyarmasıdır. Doğal olmayan ikinci tip yapay antijen kooperatif elektrostatik ve hidrofob bağlarla kararlı hale gelen protein antijenlerinin polielektrolit kompleksleridir. (Kobanov vd., 1978) Bu kompleksler de, ilave yardımcıları olmadan bir defa enjekte edildikten sonra, T(timüs) hücrelerine bağlı olmadan antikor oluşumunu uyarırlar. Aşağıdaki şekilde göröldüğü gibi T'ye bağlı olmayan immün cevapta antijen, B-lemfosit reseptörü ile yapı spesifik kontak oluşturur bu kontak B hücresinde birinci sinyali oluşturur. İkinci sinyal ise B lemfositin yüzeyinde absorbe olmuş polimerden ileri gelir.



Şekil 3.1 Birincil ve ikincil immün cevabı oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması (Mustafaev M.I, 1996)

PE ve antijen moleküllerinin kooperatif olarak, elektrostatik, hidrofob ile kovalent etkileşimlerle bağlanmış, stabilleşmiş kompleksleri ve konjugatlarının en yüksek immünojenik aktiviteye sahip olduklarını söylemek mümkündür.

Son zamanlarda çeşitli protein antijenlerinin sentetik polielektrolitlere geçiş metal iyonu katılması ile oluşan üçlü komplekslerin yüksek etkili immün cevaba neden oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Mustafaev ve Norimov, 1990). Aşağıdaki tablodan görüldüğü gibi üçlü kompleksler hem birincil hem de ikincil immün cevabı çok fazla miktarda arttırmaktadır.

Çizelge 3.1 Hazırlanan BSA örneklerinin immünite testleri sonuçları (Mustafaev ve Norimov, 1990)

Hazırlanan Örnek	Farelerin Sayısı	İkinci cevap IgM	Anti SA miktarı IgG
BSA	11	20±4,2	6±2,1
BSA-Cu <sup>2+</sup>	10	20±4,0	5,5±2,3
BSA-CP	10	10±4,0	5±2,0
BSA-Cu <sup>2+</sup> -CP	15	22400±1570	14720±1200

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermek için optimal şekilde yapılmalıdırlar. İmmünolojik aktif polielektrolit komplekslerinin olması gereken en uygun modeli aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Yüksek immünolojik etkili polielektrolit kompleks modelinin önemli fizikokimyasal özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

1. Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktali elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlanma) birleşmelidir.
2. Yapısında 'ilmik' olan polielektrolit komplekslerin (polimerin bükülebilir serbest bölümlerinin olması) yapısında bulunan polielektrolitler protein yüzeyine yapışmıştır ve 'ilmik' üzerinde bulunan hidrofob gruplar kompleksin çözeltide kalmasına yardımcı olur.
3. Birden fazla yüksek epitop yoğunluklu antijenin bir polimer makromolekülü ile bağlanması ile yüksek immünolojik etkili polielektrolit kompleksleri oluşur.

4. Antijen moleküllerinin polimer taşıyıcısı ile stabilleşmiş sert stabil yapısı hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de geniş yüzey alanı oluşmasını sağlar.
5. PE'in biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler) çok noktalı kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyetleri vardır. PE'in bu kabiliyeti yapısında olan 'ilmik'lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili polielektrolitler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşturma kabiliyetine sahiptir.



Şekil 3.2 Yüksek (I) ve düşük(II) immünojen etkili antijen-PE komplekslerinin yapısı (M.I. Mustafaev, Biyopolimerler,1996)

### 3.1 Şap Hastalığı

Şap Hastalığı insanların en önemli gıda stokları olan sığır, keçi, koyun ve domuzların başına gelebilecek en büyük felakettir. Bu hastalıktan ilk defa 1546 yılında Fracastorius bahsetmiştir. (Fracastorius, 1546)

Şap virüsü, ayakta, dilde, vücudun diğer bölgelerinde yaralar oluşmasına ve vücutta birçok organı da içeren sistemik bir enfeksiyona neden olmaktadır. Genellikle kontamine olmuş yiyeceklerin tüketilmesinden bulaşır. Hastalık semptomlarının şiddeti, virüs cinsine ve enfekte olmuş hayvanın cinsine göre değişmektedir. Bu virüsten en çok domestik sığır etkilenir. Hastalıktan ölüm oranı korunmamış sürülerde %100'e yaklaşabilir. Ölüm oranı bireylerin enfeksiyona hassasiyeti ve virüsün yayılım hızı ile etkinliği ile ilgilidir. Enfekte olmuş hayvanlarda ölüm oranı çok büyük olmamakla birlikte hayvanların tüketilebilecek etinde %25'lik bir kayıp vardır. Hastalıktan dolayı önemli ekonomik zararlardan dolayı Şap hastalığı halen

dünyada yaşamsal stoklara karşı varolan en büyük tehdittir. Aşı kullanımı ile veya hastalığa maruz bırakılmış sürülerin yok edilmesi ile hastalığın önüne geçilebilmesine rağmen halen Şap Hastalığı günümüzde tehdit edici bir hastalıktır ve dünyanın bazı bölgelerinde enfekte olmuş sürülere rastlanmaktadır. En son 2000 Kasım ayında İngiltere’de başlayan, bizim ülkemizde ve diğer Avrupa ülkelerinde de rastlanan Şap Hastalığına tutulmuş sığır vb. sürüler hastalıkta kurtulmanın son çaresi olarak yok edilmiş ve başta çiftçiler olmak üzere ülkeler büyük zarara uğramışlardır.

**Şap Hastalığı Aşısının Tarihçesi** Şap Hastalığına karşı oluşturulan ve başarılı bir şekilde kullanılan ilk aşı, enfekte olmuş sığır dilindeki yaradan alınan parçanın formaldehit ile inaktive edilmesinden oluşturulmuştur. Bu prosedürün yüksek koruma etkisi görülmesine rağmen, virüsün elde edildiği kaynak hastalığın kontrol edilebileceği kadar büyük miktarlarda üretim yapılabilmesini engellemektedir. Yukarıda bahsedilen problem Frenkel aşısının oluşturulması ile çözülmüştür. Frenkel aşısı, sığır dilinden alınan epitelyum iplikcikleri üzerinde in vitro kültürü yapılan formaldehit ile inaktive edilmiş virüstür.(Frenkel, 1947) Frenkel aşısı yüksek derecede etkilidir ve halen Hollanda gibi bazı bölgelerde kullanılır.

Aşı geliştirilmesinin ilk yıllarında itibaren, aşılamanın her zaman hayvanları hastalığa yakalanmaktan korumadığı görülmüştür. Bu problem üzerinde araştırma yapıldığında bunun nedeninin virüste önemli antijenik çeşitliliğin olduğu anlaşılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda 7 serotipi saptanmıştır. (Brooksby, 1982) Virüsün bir serotipine karşı korunan hayvanlar diğer serotiplerine karşı hassas olabilirler. Serotiplerin dünyada dağılım oranları birbirlerinin aynı değildir. En önemli serotipler olan O, A ve C serotiplerine dünyanın bütün endemik bölgelerinde rastlandığı halde diğer 3 serotip SAT1, SAT2 ve SAT 3’e sadece Afrika bölgesinde rastlanmaktadır. Asia virüsü ise Asya kıtasında görülmektedir. Bu serotiplerin her birinde de kendi içersinde farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılıklar o kadar büyük olabilir ki bir tip virüsle aşılama aynı serotipin diğer tipine karşı çok az bir koruma sağlayabilir. Bu problem aşılama aşısı tipinin seçiminde büyük komplikasyonlara neden olur.

İdeal tip aşı en yüksek seviyede reaktif nötralize eden antikor oluşumunu sağlayan tiptir. Şap Hastalığına karşı koruma, virüse maruz kalma anındaki serumda oluşan virüs nötralize eden antikor titri ile bağlantılıdır. İmmunolojik hafızanın korumaya çok az bir etkisi olduğundan hayvanlar yılda en az 2-3 kez aşılama gerekmektedir.

Günümüzde kullanılan Şap aşısının büyük çoğunluğu doku kültüründe üretilmiş kimyasal olarak inaktive olmuş ve alimunyum hidroksit veya mineral yağ emulsiyonu ile zenginleştirilmiş virüslerdir. Daha önceki kullanılmış ve halen kullanılan bazı aşılar formaldehit ile inaktive olmuş aşılardır. Fakat bu tip aşılara inaktivasyon kinetiği lineer değildir. Bu nedenle hastalığa dahi neden olabilmektedirler. Zayıflatılmış virüsler de kullanılmıştır fakat bu tip aşılarda kullanımlarının da hastalığın yayılması açısından risk teşkil ettiği kanıtlanmıştır. (King, 1981)

**Şap Hastalığı Aşısının Arzu Edilen Özellikleri** Şuanda kullanılan Şap Aşılarının etkili olduğu bilinmesine rağmen bu aşılarda geliştirilebilecek bazı yönleri vardır. Bunlar aşağıda sıralandığı gibidir.

1-) Şu anda kullanılan klasik aşılarda çok fazla miktarlarda enfeksiyonel virüsten üretilmektedir. Bu nedenle, çevrenin kontaminasyonunu ve hastalığın yayılmasını engellemek gibi virüsün vereceği zararlardan kaçınmak için sofistike metodlar geliştirilmesi gerekmektedir. Virütik virüs kültürü üretmeye dayanmayan bir aşı üretimi yöntemine ihtiyaç vardır. Kimyasal olarak sentezlenmiş bir aşı virüs aşılarının yaratacağı olumsuzlukları içermeyebilir.

2-) Birçok biyolojik ürünlerde olduğu gibi, şuan ki Şap aşılarda stabil değildir ve saklanmaları ile dağıtımları soğuk zincir şartları içerisinde yapılmalıdır. Uygun ortam şartlarında dahi aşının raf ömrü limitlidir. Kimyasal olarak sentezlenmiş aşılarda doğal stabilite bu problemi elimine edecektir.

3-) Peptid aşılarının stabilite taşınamaya(delivery) müsait olacaktır. Bu durumda koruyucu immunitenin süresini arttıracak ve tekrar tekrar aşılamaya gerek kalmayacaktır.

4-) Şuanda kullanılan aşılarda saf değildir ve kontamine edici materyale karşı hassasiyeti takiben anafilaktik cevaplara sebep olmaktadır. Sentetik aşı saf ve kimyasal olarak tanımlanmış aşıdır.

5-) Virüs kültüründen oluşan aşılarda kullanımında karşılaşılan biyolojik sınırlamalar ve komplikasyonlar sentetik aşılarda kullanımı ile elimine olacaktır. Şap virüsünün önemli özelliği, izole virüslerde karşılaşılan antijenik farklılıklardır. Bu nedenle virüs tipi seçimi çok önemlidir. Ne var ki virüsler arasındaki farklılıklar günümüzde çok az bilinmektedir. Sentetik aşılarda bu gibi durumlarla karşılaşılacaktır.

6-) Klasik aşılar, T-hücresi bağımlı aşılardır. Fakat sentetik olarak üretilmiş polimerik aşılar T hücre bağımlı değildir. Bu tip aşılar antikor oluşumu T hücresinin interferon etkisi ile B hücrelerini uyarması ile değil, direkt B hücrelerinin uyarılması ile meydana gelir. Bu da organizmada T hücresinin çalışmadığı durumlarda da (aids hastalığında olduğu gibi) antikor oluşumunu sağlar.

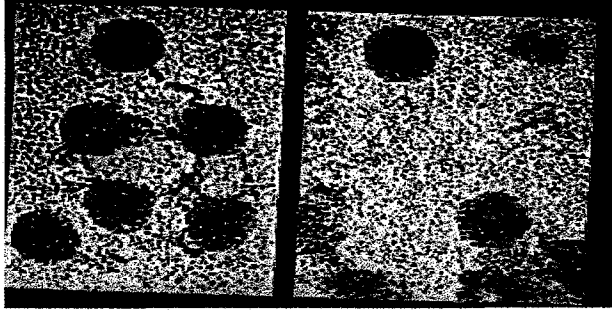
**Şap Virüsünün Genel Özellikleri** Şap Virüsü Picarnovirüs ailesinin aftovirüs cinsindedir. Bu ailedeki virüslerin protein kılıfları, VP1, VP2, VP3, VP4 adlı 4 çeşit protein içermektedir. Bu proteinleri yaklaşık 8000 nükleotid uzunluğundaki tek iplikçikli RNA kodlar. Herbir virüste, her proteinden 60'ar adet mevcuttur. VP1-VP3 ve VP3 dış yüzeyde yer alırken, VP4 ise iç yüzeyde uzanır.

Şap Virüsünün infektivitesi kolayca çevresel şartlar tarafından zarar görebilir. Virüs asidik şartlarda ve düşük iyonik kuvvetli solusyonlarda çok kararsızdır. Yüksek sıcaklıklarda ve asidik ortamlarda, dış kabuktaki VP1, VP2 ve VP3'ün 5'er tanesi yan ünite üreterek çözünürler. VP4 çözünmeyen agregat olarak ayrılır ve RNA serbest kalır.(7,85) Bunun yanında, endonükleaz aktivitesi göstererek genomik RNA parçalanır. Bu şekilde virüs kimyasal inaktivasyona uğrar. Bu durumdan yola çıkarak kimyasal aşıların inaktivasyonu gerçekleştirilir.

RNA direkt olarak mRNA olarak davranabilir ve virüs proteinlerinin translasyonunu gerçekleştirir. Bu nedenlere virüsün diğer üyeleri olmadan da enfeksiyonel özelliği vardır.

**Şap Virüsünün Antijenik Özellikleri** Şap virüsüne karşı korunma, organizmada ona karşı oluşan uygun nötralize edici antikor oluşumu ile mümkündür. (Van Bakkum, 1969) İmmünizasyonu takiben antikor seviyesi azaldıkça organizmada hassasiyet artar ve aşılamanın, koruyucu seviyeye ulaşıncaya kadar tekrar edilmesi gerekmektedir. 1-10 µg. kadar virüs partikülünün sığırdaki yüksek koruyucu etkisinin bilinmesine rağmen kapsidin yan üniteye bölünmesi immunojenikliğin 2 kat azalmasına neden olur. Virüs partiküllerinin ve yan ünitelerinin kalitatif ve kantitatif farklılıkları vardır. Bu sebeplerden dolayı virüs partikülünün, bütünlüğü bozulmayacak şekilde korunması gerekmektedir.

Bazı virüs cinslerinin, özellikle O serotipindekilerin immunojenitesi tripsin gibi proteolitik enzimlerle azaltılmıştır. Yapılan inceleme ve çalışmaların sonucunda, tripsin tarafından parçalanmış bölgede önemli antijenik bölgelerin olduğu gözlenmiştir. (Brown, 1970) Tripsin ile muamele edilmiş virüsün nötralize eden IgM antikoru reaksiyon vermediğinin de gözlenmesi bu çalışmayı desteklemiştir.



Şekil 3.3 Tripsin ile muamele edilmiş virüs (sağ) ile doğal virüsün(sol) IgM antikoru ile reaksiyonları (Brown, 1970)

Tripsinin Şap virüsü serotipleri ile reaksiyona sokulması ile serotiplerin gerekli hücrelere bağlanmalarına engel olunmuş olur. Bu çalışmalardan elde edilen sonuç, tripsin enziminin hücrenin reseptör bağlama bölgesine ve virüs üzerindeki major antijenik determinantına hasar verdiğidir.

Tripsine maruz bırakılmış proteinlerin analizi, sadece VP1 proteininin 2 bölüme parçalandığını göstermiştir. (Burroughs; Rowlands 1971) Bundan çıkacak sonuç, VP1 proteininin antikor oluşumunu sağlayan major antijenik determinantına ve hücre reseptörüne sahip olduğudur.

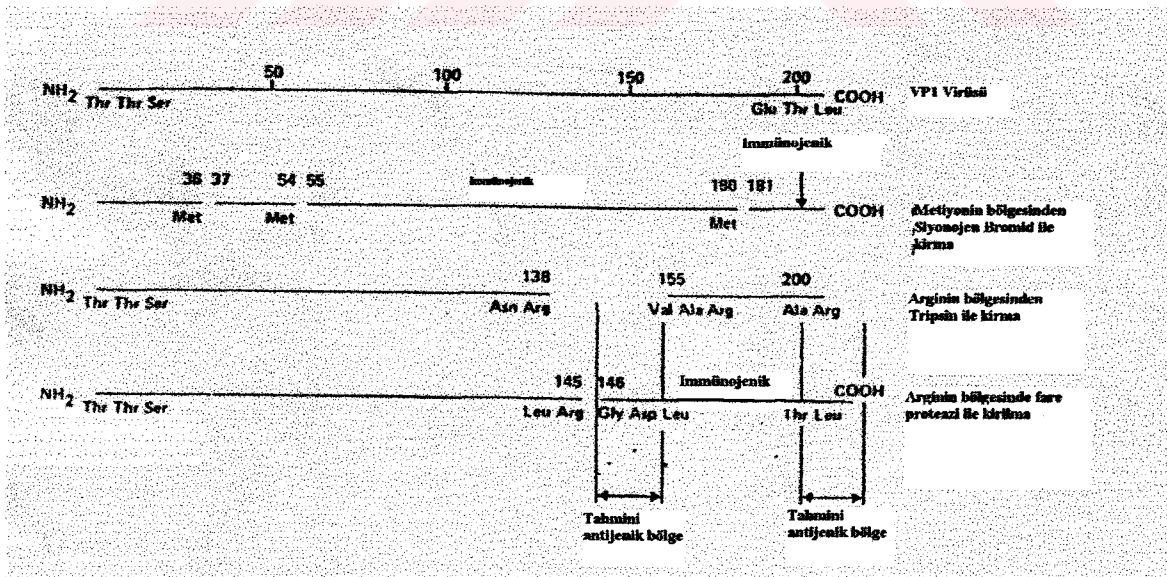
**Şap Hastahğı Virüsü İmmünodominant Bölgenin İdentifikasyonu** Yukarıda bahsedildiği gibi, koruyucu ve virüs nötralize eden antikoru oluşumuna neden olan önemli antijenik determinant VP1 proteini üzerinde bulunmaktadır. Bu determinantın lokasyonu 1980'li yılların başında tesbit edilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar arttıkça, VP1 proteini üzerindeki aminoasit dağılımının rastgele olmadığı, 2 bölgede yoğunlaşma gösterdiği bulunmuştur . Yoğunlaşmanın 40-60 ve 132-160 bölgeleri arasında olduğu tesbit edilmiştir. (12-52) (aminoasit sıraları virüsün O1 serotipinin VP1 proteini baz alınarak belirtilmiştir.)40-

60 bölgesinin farklı serotiplerde farklı dağılımlar göstermesine rağmen 132-160 bölgesi hem serotip içersinde hem de serotipler arasında farklılıklar göstermektedir.

132-160 dizisi sıra olarak farklılıklar gösterdiği gibi uzunluk olarak da farklılıklar göstermektedir. C1 serotipindeki uzunluğu 24 amino asitken SAT3 serotipinde 34 aminoastır. (Polmenberg, 1989) Proteinin bu bölgesinin yüksek derecede değişiklik gösterdiği bilmesine rağmen 145-147 pozisyonundaki ARG-GLY-ASP üçlüsü hemen hemen değişmez. (14,63) 132-160 bölgesinin hiperaktiflik göstermesinin 2 sonucu olabilir. 1-) Virüs yüzeyinde bulunur ve proteinin katlanmasında herhangi bir rolü yoktur. 2-) Virüsün antijen karakteristiğinin belirlenmesinde önemlidir.

VP1 üzerindeki lineer antijenik determinant bölgesi için en direk delil Strohmaier tarafından verilmiştir. (Strohmaier, 1982) Bu araştırmacı, VP1 bölgesini enzimatik veya kimyasal kırma ile saflaştırmış ve VP1 parçalarının protein üzerindeki pozisyonu belirlemiş ayrıca bunların yanında protein amino asit dizisini moleküler kolonların nükleotid dizisinden saptamıştır.

Strohmaier, elde ettiği protein fragmentlerini farelere enjekte etmiş ve virüs serumunun nötralize edici antikörlerin varlığı için analizini yapmıştır. Araştırmacı, iki lineer antijenik bölge saptamıştır. Bunlar C terminal 146-154 ve 201-213 aminoasit dizileridir.



Şekil 3.4 Şap Virüsü VP1 proteininin tanımlanmış fragmentlerinin immünojenliği (Strohmaier,1982)

### 3.2.Sentetik Peptid İmmunojenler

Şap Virüsünün immunodominant bölgelerinin belirlenmesi, sentetik peptid immunojenlerin sentezi ile bu gibi materyallerin deney hayvanlarında virüs nötralize edici ve koruyucu cevaplar alınması için temel oluşturmuştur. VP1 proteininin C terminalinden başlayarak 141-160, 200-213 dizilerinin her ikisinde virüs nötralize edici etkilerinin olduğu görülmesine rağmen 141-160 amino asit dizisi bölgesinin spesifik aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İlk sentetik peptid dizisi serotip O1 virüsünden alınmıştır. Daha sonra yapılmış diğer çalışmalarda diğer serotiplere ait 141-160 dizilerinin de nötralize edici antikor oluşturduğu gözlenmiştir.

Sentetik peptid immunojenlerin ilk çalışmaları sentetik peptidlerin kimyasal olarak taşıyıcı protein moleküllerine bağlanmaları ile yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda peptid, KLH ( Keyhole limpet hemocyanin) gibi taşıyıcı proteinlere bağlanmıştır. Bunun nedeni 15-20 aminoasit uzunluğundaki peptid dizisinin tek başına immunojenliğinin yeterli olmamasıdır. Taşıyıcı protein ile bağlanma, peptid ve protein üzerindeki grupların birbirleri ile kovalent, iyonik ya da hidrofobik etkileşimlerle bağlanmasından oluşur. İmmunojen peptidin C ucuna doğal olmayan sistein grubu bağlanarak sisteinin taşıyıcı protein üzerindeki amino grupları ile N-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid esteri ajanı yardımıyla bağlanması gerçekleştirilebilir. (Francis, Fry, Rowlands, 1987) Daha sonra yapılmış çalışmalar, proteine bağlanmış peptidlerin artan enjeksiyonları sonucu amnestik cevaplar oluştuğundan dolayı klasik haptenler gibi davranmasıkları görülmüştür. Bunun yanında, KHL' e bağlanmış peptidin ön enjeksiyonunu takiben serbest peptidlerin enjeksiyonu ile daha iyi anamnestik sonuçlar elde edilebilir. Bu çalışmalardan çıkan sonuç serbest peptidin immün sistemi harekete geçirdiği ve taşıyıcı proteinin gerekli olmadığıdır. Bağlanmamış sentetik peptid Freund's Adjuvantı ile birlikte sığira enjekte edilmiş ve sonuçlar rapor edilmiştir. (Di Marchi; Brooke; Gale, 1986) Kullanılan sentetik peptid 141-158 ve 200-213 aminoasit dizilerini içermekte ve bu diziler Pro-Pro-Ser spacerı ile birbirine bağlanmış ve N ile C terminallerinde Sistein aminoasidi içermektedir. Böyle bir yapı disülfid bağ oluşumuyla geniş polimerizasyona uygun bir yapıdır.

Kobaylarda, inaktive olmuş virüs ve 141-160 aminoasit dizisini içeren sentetik peptid ile yapılmış immunizasyon sonuçları arasında kalitatif farklılıklar görülmüştür.(Francis; Fry;

Rowlands, 1988) İnaktive olmuş virüs ile immunizasyonu yapılmış hayvanlarda oluşan virüs nötralize edici antikorlarla hayvanların korunma yüzdesi arasındaki bağın mükemmellikten çok uzak olduğu görülmüştür. Diğer yandan, peptid ile immunizasyonu yapılmış hayvanlarda ise nötralize eden antikor seviyesinin düşük seviyenin biraz üzerinde olmasına rağmen bütün hayvanların korunduğu gözlenmiştir. İnaktive virüse karşı oluşan antikorların bazılarının in vitro etkisinin in vivo etkisinden daha fazla olduğu, bu şaşırtıcı durum için uygun bir açıklamadır. Peptidler daha dar spesifik spektrumda antikor oluşumuna neden oldukları halde, onlara karşı oluşan antikorların in vivo olarak in vitro'da daha etkili oldukları gözlenmiştir.

Daha öncede bahsedildiği gibi, antijenik çeşitlilik Şap Hastalığı için aşılama da major bir problemdir ve bu nedenle, aday aşı virüs cinsinin oluşturacağı antikorun mümkün olduğu kadar fazla virüs tipini nötralize etmesi gerekmektedir. Bu konuda, yapılan çalışmalarda nötralizasyon titrinin, başlangıçtaki heterelog virüs titrine oranı olan r değeri gündeme gelmiştir. (Rossmann, Arnold, Erickson, 1985) r değeri dikkara alınarak, serotip O ve A'nın VP1 141-160 aminoasit dizisi bölgesinin diğerlerine oranla daha geniş bir şekilde çapraz reaktif cevaplar verdiği görülmüştür. (Parry, Quldrige, Barnet, 1989)

VP1 fragmenti ile hazırlanmış sentetik immunojen peptid antijeni, protein epitopunun bütün yüzey özelliklerini içermez. 20 aminoasit içeren antijen-antikor komplekslerinin kapladığı alan yaklaşık  $700 \text{ \AA}^2$  'dir. Geniş bir alan içeren epitop-paratop kontağı içersinde can alıcı rol oynayan çok küçük bir kısımdır. (Getzoff, Tainer, Lerner, Geysen, 1989). Buna rağmen, epitopun diğer bölgelerinin de antikora bağlanması için teorik olarak antijen epitopunun antikorla uyumlu olması gerekmektedir. Sentetik peptidin oluşturduğu antikor cinsleri spektrumu, bağlanma için kritik aminoasit bölgelerini tanıır. Fakat bu antikorların bağlandığı peptidleri birbirlerinden ayıran özellik yan bölgelerinin stereouyumluluklarının birbirlerinden farklı olmalarıdır. Buna rağmen antijen-antikor kompleksinin oluşmasının nedeni, peptide karşı immün cevapta, peptidin yan bölgelere karşı yapısal bir sınırlama olmamasıdır. Sonuç olarak poliklonal antipeptid cevabı içersinde oluşan antikor cinsleri, aynı kritik bağlama determinantı içeren fakat yüzeylerinde farklı topografikal bölgeleri içeren virüsleri tanımaktadır.

### 3.3 Peptidlere Karşı İmmün Cevapta Farklılıklar

Sentetik Şap Virüsü peptidlerinin koruyucu seviyelerde antikor oluşturduğu ispatlanmasına rağmen, bu materyalin immunojenliği düşüktür. Örneğin 1 µg. inaktive edilmiş virüs partikülü, iyi nötralize eden antikor cevabı oluştururken, yaklaşık aynı değerde immün cevaba ulaşılabilmesi için inaktive virüs miktarlarının 100 kat daha fazla 141-160 Cys peptidinin kullanılması gerekmektedir.

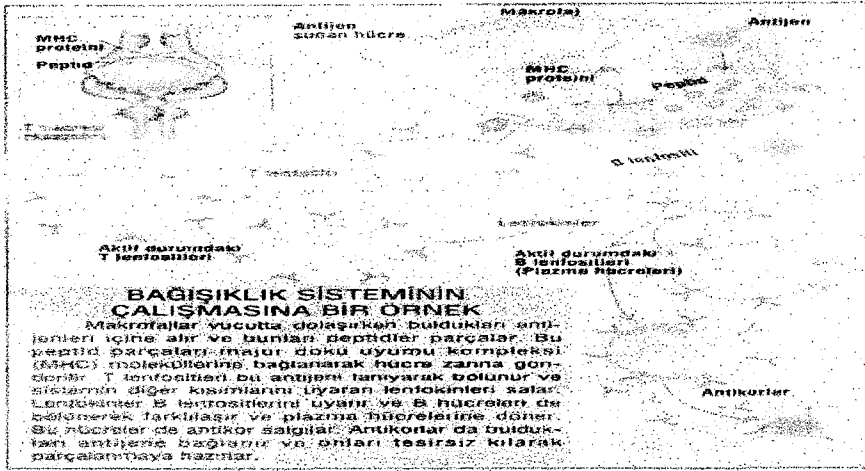
Kobaylarda, sentetik peptid immunojenlerine karşı iyi cevap alınmasına rağmen, domuzlarda ve sığırlarda koruyucu cevabın çok daha az olduğu görülmüştür. (M.J. Francis, Personal communication) Sığırlarda ve domuzlarda anti-peptid antikorların spesifikliğinin hemen hemen aynı olmasına rağmen, virüs nötralize edici aktivitenin düşük olduğu görülmüştür. Bunun için yapılan açıklama VP1 141-160 dizisindeki yardımcı T hücre epitoplarının sığırda ve domuzda kobaylardakinden daha az etkili olduğudur.

T hücresi yardımı, antijen reaktif B hücrelerinin uyarılması ve onların antikor plazma hücreleri oluşturmaları için sinyaller sağlanması için gereklidir. Yardımcı T hücreleri, MHC-antijen kompleksindeki T cell epitoplarını tanıır.

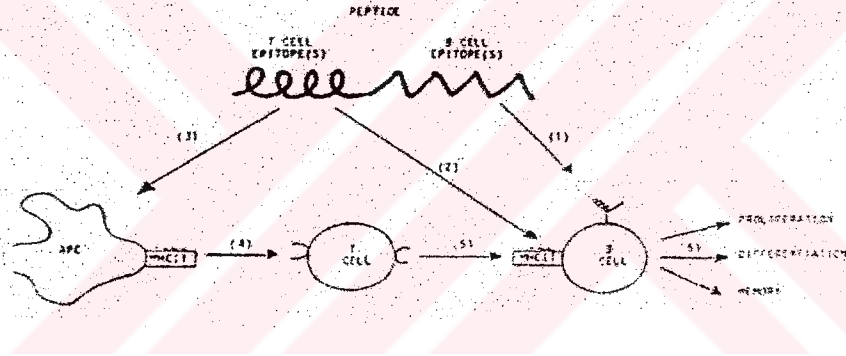
Şap Virüsüne karşı sınırlandırmaları incelemek ve bunların üstesinden gelebilmek için fareler, immunizasyon deneylerine tabi tutulmuşlardır. Farenin 141-160 dizisi ile immunizasyonu sonucu bazı farelerde antikor oluşumu gözlenirken bazı farelerde ise hiç antikor oluşmamış. Bu farelerdeki immün sınırlama probleminin, spesifik T hücre epitoplarının peptid immunojenlerle kooperatif şekilde birleştirilerek aşılması hedeflenmiştir. (Francis, Hastins, Sured, 1987) Böylece MHC sınırlamasının, kolinear olarak sentez edilmiş Şap Virüs peptidinin yabancı T hücre epitopu ile birleştirilmesi sonucu önüne geçilmiştir.

Steward ve arkadaşları tarafından, birçok sistemde antikor affinitesinin virüs nötralize edilmesinin etkinliğinde çok önemli olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, peptid konformasyonu, adjuvant formülasyonu ve peptid presentasyonu, antikorların affinite ve izotip dağılımını etkilediği görülmüş ve bu faktörlerin araştırmaya değer faktörler olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 3.5 Bağışıklık sistemi(Aylık İlim Kül. Der. Sızıntı, 12.200)



Şekil 3.6 Antikor esaslı immün yanıt elde edilmesinde sentetik peptid immünojenin T ve B hücre epitoplari fonksiyonlarının diyagramik sunumu (Francis, Hastins, Sured, 1987)

### 3.4 Peptid Antijen Prezantasyonu

C terminal fonksiyonel bölgesinde Sistein içermeyen doğal Şap Virüsü VP1 dizisini temsil eden peptidin hiç immunolojik cevap vermediği görülmektedir. Sistein içeren peptidlerin geliştirilmiş immünojenikliği, zincirlerin disülfit bağlantıları ile dimerizasyonuna bağlıdır. Peptid dimerleri, başın kuyruğa bağlanması ile veya sistein sistein köprüsünden başka terminal bağlanma metodları ile de üretilerek zenginleştirilmiş immünojenikliğe sebep olmuştur. (Francis, Fry, Rowlands, 1987) Bu şekilde sunulan peptidler monomerik

preperatlardan çok daha etkilidir. Bu sistemin avantajı, B veya T hücre epitoplarını içeren değişik peptidlerin bu yapısal üniteye kullanılmalardır.

Ayrıca son yıllarda T hücresinden bağımsız polimerik aşı modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu tip aşılarda adjuvant etkisi gösteren polielektrolitler, T hücresi uyarılması olmadan B hücresinde sinyaller oluşturur ve antikor oluşumunu sağlar. (Mustafaev, vd, 1996)

Bütün bu çalışmalardan çıkan sonuca göre Şap Virüsü VP1 proteininin en çok antenik bölgesinin 141-160 hipervariable bölgesinin olduğu bu bölgenin birçok virüs serotipine karşı antikor geliştirdiği saptanmıştır. Peptidin tek başına organizmada her zaman yeterli immün cevap oluşturamaması nedeni ile peptid presentasyonu önem kazanmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar peptidin bir taşıyıcı ile bağlanarak T hücresi tarafından daha etkili bir şekilde tanınması üzerine olurken, son yıllardaki çalışmalar ise tamamen T- hücresinden bağımsız çalışabilen yeni tipli modeller üzerinedir. Daha sonraki bölümde bu konu ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

## 4. DENEYSEL KISIM

### 4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

#### Kullanılan Cihazlar

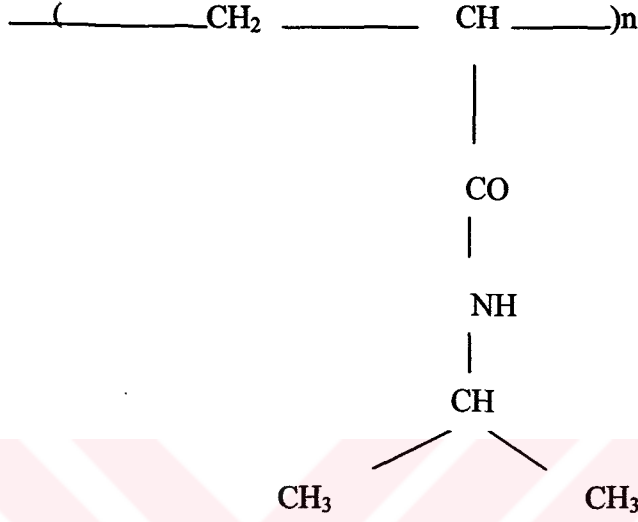
- ✓ 'Quanta Master' PT1 Model Spektroflore metre
- ✓ Shimadzu UV-2401 PC uv-visible recording spektrofotometre
- ✓ Jencons Julabo Vorteks
- ✓ Costar Pipet Seti
- ✓ Waters Model 501 HPLC
- ✓ NUNC-Immunoplates
- ✓ NUNC-Immunowash 12

#### Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sığır Serum Albumin (BSA)
Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 Dizili Epitopu
Poli-N-İzopropilakrilamid

Poli-N-İzopropilakrilamid: 60000 molekül ağırlığında sentezlenmiş pNIPAAm, Prof. Osada ve arkadaşları tarafından Japonya, Hokkaido Üniversitesinde sentezlenmiştir. Poli(N-izopropilakrilamid), iyi bilinen ufak sıcaklık değişimlerine karşı geri dönüşümlü hidrasyon-dehidrasyon değişimleri gösteren su bazlı bir polimerdir. pNIPAAm'nin sulu çözeltisi faz ayırımı gösterir ve polimer düşük kritik çözelti sıcaklığında çökme gösterir.

pNIPAAm, mikrobiyal ve viral antijenler için taşıyıcı olarak kullanılmaları hem onlara karşı oluşan immün cevabı birkaç kat artırır hem de etkili immün koruma sağlar. Bunun yanında pNIPAAm T hücresinden bağımsız immün cevap oluşumunda da etkilidir.



Poli (N-izopropilakrilamid)

BSA: BSA(Sığır Serum Albümin), Sigma Chemical Company (St. Louis)'den satın alınmış ve alındığı halde kullanılmıştır.

Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 dizili epitopu: Sigma(St. Luis)'den satın alınmış ve alındığı gibi kullanılmıştır. (Dizi için bakınız sayfa 68)

#### 4.2 Farklı Şiddetlerdeki <sup>60</sup>Co γ Radyoaktif Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımlarının , UV Absorbans, Floresans, Jel Filtrasyon HPLC ve İmmünojenite İncelemesi

##### 4.2.1 Deneyi Amacı

pNIPAAm ile BSA'nın, nötral pH'da birbirleri ile bağ yapacak radikal gruplarının bulunmaması nedeni ile birbirleri ile bağlanabilmelerin mümkün olmaması, bizi bu makromoleküllerin, radyoaktif <sup>60</sup>Co γ ışınlaması ile fonksiyonel grup oluşturma düşüncesine ulaştırdı. Radyasyon ışınlarının makromeoleküllerde fonksiyonel grup

oluşturması konusuna bir önceki bölümde değinilmişti. Radyoaktif ışınlama ile elde edilen konjugatın bağlanma mekanizması UV-Absorbans, Floresans, jel filtrasyon HPLC ve immünizasyon testleri (Elisa) ile incelenmiştir. Floresans cihazında oluşan konjugatın floresans yoğunluğu sıcaklık değişimli olarak ölçülmüştür.

#### 4.2.2 Kullanılan Çözeltiler

##### A-) PBS Tampon Çözeltisi (pH:7.2)

52.2gr.  $K_2HPO_4$  600 ml. suda çözündürülerek üzerine 600 ml. suda çözülmüş 27.2 gr.  $KH_2PO_4$ , karışımın pH'ı 7.2 olana dek karıştırılarak eklendi. Bu şekilde fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 20 ml. fosfat tamponu içersinde çözündürülmüş NaCl üzerine, 980 ml. distile su eklenmesi ile PBS tampon çözeltisi hazırlanmış oldu.

##### B-) BSA Çözeltisi

0.15 %'lik BSA çözeltisi hazırlandı.

##### C-) pNIPAA Çözeltisi

0.1 %'lik pNIPAAm çözeltisi hazırlandı.

##### D-) Sodyum Sitrat Çözeltisi (Elisa Testi)

0.22 gr. Glikoz, 0.23 gr. Sodyum Sitrat ve 0.08 Sitrik Asit 10 ml. distile su içersinde çözündürdü.

##### E-) Yıkama Tamponu (Eliza Testi)

0.5 ml. Tween 20 1 lt. distile su içersinde çözündürülür.

##### F-) Substrat Tamponu (Eliza Testi)

0.02 gr.  $ZnCl_2$ , 0.04 gr.  $MgCl_2$  ve 1.5 gr. glisin tartılır. 1.5 gr. Glisin 200 ml. distile su içersinde pH 10.4'e (NaOH, KOH) ayarlanarak çözündürüldükten sonra çözelti üzerine  $MgCl_2$  ve  $ZnCl_2$  eklenir.

### 4.2.3 Deneyin Yapılışı

Hazırlanan pNIPAAm-BSA karışımları ve serbest 0.1% pNIPAAm ve 0.15% BSA çözeltileri  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  ışını kaynağından 5,10,25,50,100,500, 700, 1200 Gy. şiddetinde ışınlarla tabi tutuldu. Işınlama öncesi ve sonrası elde edilen karışımlar Jel Filtrasyon HPLC, UV Absorbans, Flouresans Spektroskopisi ve farelerde İmmünizasyon (Elisa testleri) yöntemleri ile incelendi.

### 4.2.4 Deneyde Kullanılan Yöntemler

**Gama ( $\gamma$ ) Işınlaması** Hazırlanmış peptid-pNIPAAm karışımı gama( $\gamma$ ) ışını kaynağından (Picker 9V) 500 Gy. şiddetinde  $^{60}\text{Co}$ ,  $\gamma$  ışınlamasına tabi tutulmuştur. Örnekler kaynaktan 10 cm. uzaklıkta iken ışınlanmışlardır. Işın dozu oranı Fricke dozimetesi ile 28.61 Gy./saat olarak belirlenmiştir.

Işınlama sonucunda kovalent bağlanma için radikal grupları bulunmayan pNIPAAm ve BSA birer H iyonu vererek radikal gruplar oluştururlar ve kovalent bağlanırlar. PNIPAAm, NH veya CH gruplarından, BSA ise asit fonksiyonel grubundan birer hidrojen verirler.

**Jel Filtrasyon HPLC** Hazırladığımız suda çözünen BSA-pNIPAAm karışımının ışınlama öncesi ve ışınlama sonrası kompozisyonları Bio-Sil Sec 250 kolon (7.8\*30 cm.) kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile incelenmiştir. Waters Model 501 HPLC, pH 6.8'de 10mM potasyum fosfat tamponu ve 100mM NaCl ile oda sıcaklığında 1.0 ml./dak. akış hızında çalıştırılır. Elusyon absorpsiyon detektörü ile 214 nm. Dalga boyunda ölçülür. Kolonu kalibre etmek için kullanılan standartlar triglobulin (670 kDa), immünoglobulin (155 kDa), ovalbümin (44 kDa), miyoglobin (16.9 kDa) ve Vitamin B<sub>12</sub> (1.35 kDa). UV-Absorbans detektör BSA'nın en yüksek piki verdiği 280 nm. de ölçüm yapar.

**UV-Absorbans Spektroskopisi** UV-2401 PC model Shimadzu marka UV visible spektrofotometre ile hazırlanan karışımları ışınlama öncesi ve sonrası absorbansları ölçülmüştür. BSA'nın en yüksek piki verdiği 280 nm'de ölçüm yapılır.

**Flouresans Spektroskopisi** Hazırlanmış olan ışınlanmış ve ışınlanmamış karışımların flouresans emisyon spektrumları Quanta Master Spektroflorometre ile ölçülmüştür. Uyarılma

ve emisyon yarığı aralığı 2 veya 3 nm.'ye ayarlanmıştır. Uyarılma dalga boyu 280 nm.'dir. Her bir karışımda bulunan BSA'da bulunan Triptofan'ın flouresans özelliğinden faydalanılır.

**İmmünizasyon** 8 haftalık Balb/c fareler, 500'er ng. olacak şekilde farklı şekillerde hazırlanmış pNIPAAm- BSA konjugatları ve serbest BSA ile immünize edilmişlerdir. İmmünojen olarak kullanılan konjugatlar aşağıdaki gibidir;

#### Farelere İmmünizasyonu Yapılmış Konjugatlar

	İmmünizasyon
1-	100 Gy. ışın ışınlanmış 0.1% pNIPAAm+ 0.15% BSA
2-	300 Gy. ışın ışınlanmış 0.1% pNIPAAm+ 0.15 %BSA
3-	500 Gy. ışın ile ışınlanmış 0.1% pNIPAAm+ 0.15% BSA
4-	700 Gy. ışın ile ışınlanmış 0.1 % pNIPAAm + 0.15%BSA
5-	1200 Gy. ışın ile ışınlanmış 0.1% pNIPAAm + 0.15% BSA
6-	Serbest 0.15% BSA

İmmünizasyonu yapılmış farelerden immünizasyon oluşup oluşmadığını araştırmak için ilk 7. günde ve daha sonra da belirli aralıklarla Eliza testi yapmak üzere farelerin kuyruk damarından 15'er µl. kan alınmıştır. Kanlar, içersinde sodyum sitrat bulunan mikrofüj tübler içersinde toplanmıp 6000 rpm.'de sentürlüj edilerek kırmızı kan hücreleri ayrılmıştır. Serum örnekleri toplanarak Eliza testine tabi tutulmuştur.

Elisa:

- 1- BSA spesifik antikor oluşumunun incelenmesi için NUNC-İmmünoplate kuyuları 500 ng.
- 2- BSA ile kaplandı. Kaplanmış plate 4° C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 3- Ertesi gün yıkama tamponu (PBS'de çözülmüş 0.005 % Tween-20) ile 2 kez yıkandı. Daha sonra 0.2%'lik PBS içersindeki kazein çözeltisi antijen boşluklarını doldurmak üzere kuyulara kaplandı ve plate bu kez 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 4- Birinci antikor hazırlanması:  
Sodyum Sitrat içersindeki farelerden alınmış serum örneklerinden alınan 10'ar µl. olan örneklerden herbiri PBS ile 1/50 dilüsyonu olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen

dilüsyonlar antijen kaplı kuyulara 100'er µl. olacak şekilde eklendi. Daha sonra plate 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

#### 5- Enzim İşaretli İkinci Antikor Eklenmesi:

Plate yıkama solusyonu ile 2 kez daha önceki gibi yıkandı. Alkelen fosfataza bağlı oluşmuş polivalen fare antikorunu (Sigma)'nin 1/750'lik dilüsyonu her bir kuyuya eklendi ve plate 1 saat boyunca 37° C'de tekrar inkübasyona bırakıldı.

- 5- Plate 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyulara özel bir substrat tamponu ( 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M Glisin, pH 10.4) içerisinde hazırlanmış 1 mg./ml. p-nitrofeinilfosfat eklendi. Bu karışım tam kullanılacağı zamanın öncesinde ışık almayan bir yerde hazırlandı. Plate 45 dakika karanlıkta bekletildikten sonra plate kuyularının 405 nm.'de absorbansları ölçüldü.

### 4.3 500 Gy. Işın Şiddetinde Radyoaktif <sup>60</sup>Co γ Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 dizili Peptidi-pNIPAA Karışımlarının UV Absorbans ve Jel Filtrasyon HPLC İncelemesi

#### 4.3.1 Deneyin Amacı

Deneysel çalışmamın bu bölümünde bir önceki bölümde oluşturulan pNIPAAm-BSA konjugatı temel alınarak, sentetik aşı olarak kullanılabilen pNIPAAm-Ş.H.V. VP1 proteini 40-60 dizili epitopu aynı yöntemle birbirlerine bağlandı.

Radyoaktif ışınlama ile elde edilen konjugatın bağlanma mekanizması UV-Absorbans, ve jel filtrasyon HPLC ile incelenmiştir.

#### 4.3.2 Kullanılan Çözeltiler

##### A-) PBS Tampon Çözeltisi (pH:7.2)

52.2gr. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 600 ml. suda çözündürülerek üzerine 600 ml. suda çözülmüş 27.2 gr. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, karışımın pH'ı 7.2 olana dek karıştırılarak eklendi. Bu şekilde fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 20 ml. fosfat tamponu içerisinde çözündürülmüş NaCl üzerine, 980 ml. destile su eklenmesi ile PBS tampon çözeltisi hazırlanmış oldu.

### **B-) Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 Dizili Epitopu Çözeltisinin Hazırlanması**

Farklı konsantrasyonlara sahip 3 ayrı peptid çözeltisi hazırlandı. Birinci çözeltide 1.5 ml. PBS içersinde 2 mg., ikinci çözeltide 1 mg., üçüncü çözeltide 0.5 mg. peptid çözüldürülmüştür.

### **C-) pNIPAAm Çözeltisinin Hazırlanması**

Aynı konsantrasyona sahip 3 ayrı çözelti hazırlandı. Herbir çözelti 1.5 ml. içersinde 2 mg. polimer çözüldürülerek hazırlanmıştır.

### **4.3.3 Deneyin Yapılışı**

Hazırlanmış olan 3 ayrı polimer ve 3 ayrı peptid çözeltileri ile 3 ayrı karışım oluşturulur.

- I- 1.5 ml. PBS/2 mg. pNIPAAm ve 1.5 ml. PBS/2 mg. peptid karışımı
- II- 1.5 ml. PBS/2 mg. pNIPAAm ve 1.5 ml. PBS/1 mg. peptid karışımı
- III- 1.5 ml. PBS/2 mg. pNIPAAm ve 1.5 ml. PBS/0.5 mg. peptid karışımı

Her üç karışımından ayrılan 2'şer ml. lik çözeltiler 17 saat boyunca 500 Gy'lik <sup>60</sup>Co  $\gamma$  kaynağından (Picker 9V) ışınlamaya tabi tutulmuşlardır. Işınlanmış ve ışınlanmamış çözeltilerin ayrı ayrı jel filtrasyon HPLC analizleri ile UV analizleri yapılmıştır.

### **4.3.4 Deneyde Kullanılan Yöntemler**

**Gama ( $\gamma$ ) Işınlaması** Hazırlanmış peptid-pNIPAAm karışımı  $\delta$  ışını kaynağından ( Picker 9V) 500 Gy. şiddetinde <sup>60</sup>Co, gama ışınlamasına tabi tutulmuştur. Örnekler kaynaktan 10 cm. uzaklıkta iken ışınlanmışlardır. Işın dozu oranı Fricke dozimetesi ile 28.61 Gy./saat olarak belirlenmiştir.

Işınlama sonucunda kovalent bağlanma için radikal grupları bulunmayan pNIPAAm ve BSA birer H iyonu vererek radikal gruplar oluştururlar ve kovalent bağlanırlar. PNIPAAm, NH veya CH gruplarından , Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini 40-60 dizili epitopu ise asit fonksiyonel grubundan birer hidrojen verirler.

**Jel Filtrasyon HPLC** Hazırladığımız suda çözünen peptid-pNIPAAm karışımının ışınlama öncesi ve ışınlama sonrası kompozisyonları Bio-Sil Sec 250 kolon (7.8\*30 cm.) kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile incelenmiştir. Waters Model 501 HPLC, pH 6.8'de 10mM potasyum fosfat tamponu ve 100mM NaCl ile oda sıcaklığında 1.0 ml./dak. akış hızında çalıştırıldı. Elusyon absorpsiyon detektörü ile 214 ve 280 nm. dalga boylarında ölçüldü. Kolonu kalibre etmek için kullanılan standartlar triglobilin (670 kDa), immünoglobulin (155 kDa), ovalbümin (44 kDa), miyoglobin (16.9 kDa) ve Vitamin B<sub>12</sub> (1.35 kDa). UV-Absorbans detektörü peptidin en yüksek absorpsiyon verdiği 214 nm. dalga boyunda ve BSA'nın en yüksek absorpsiyon verdiği 280 nm. dalga boyunda ölçüm yapar.

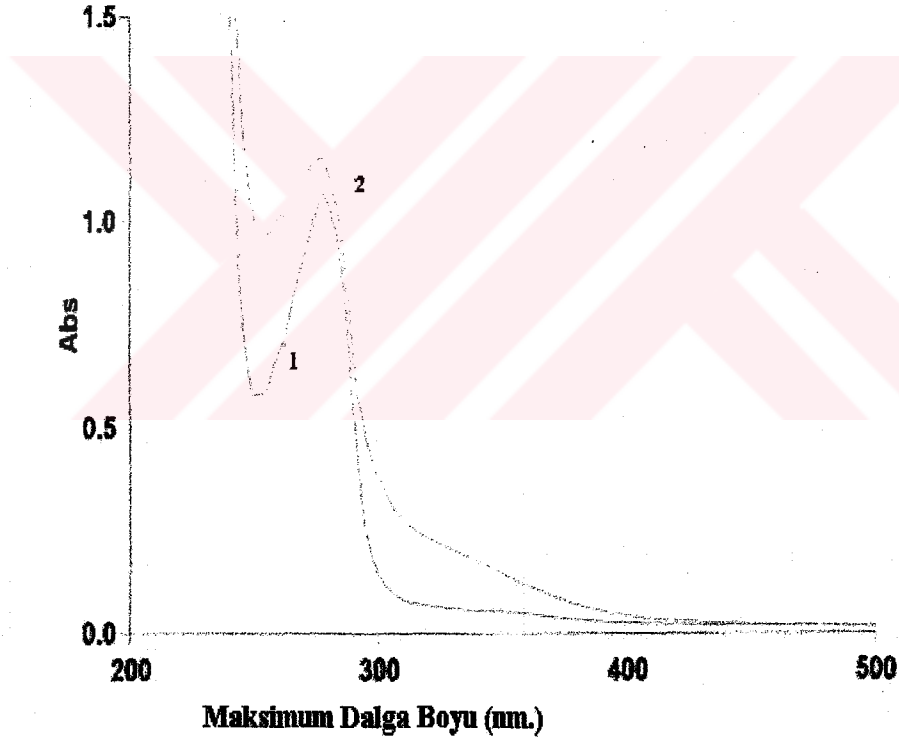
**Absorbans Spektroskopisi** UV-2401 PC model Shimadzu marka UV visible spektrofotometre ile hazırlanan karışımları ışınlama öncesi ve sonrası 214 nm. dalga boyunda absorpsiyonları ölçülmüştür.

## 5. DENEYSEL SONUÇLAR

### 5.1 Farklı Şiddetlerdeki $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ Radyoaktif Işınları ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımlarının UV-Visible Absorbans, Flouresans, Jel Filtrasyon HPLC ve İmmünizasyon Sonuçları

#### 5.1.1 1200 Gy ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA karışımları ile serbest 0.15 % BSA'nın UV-Absorbans Sonuçları

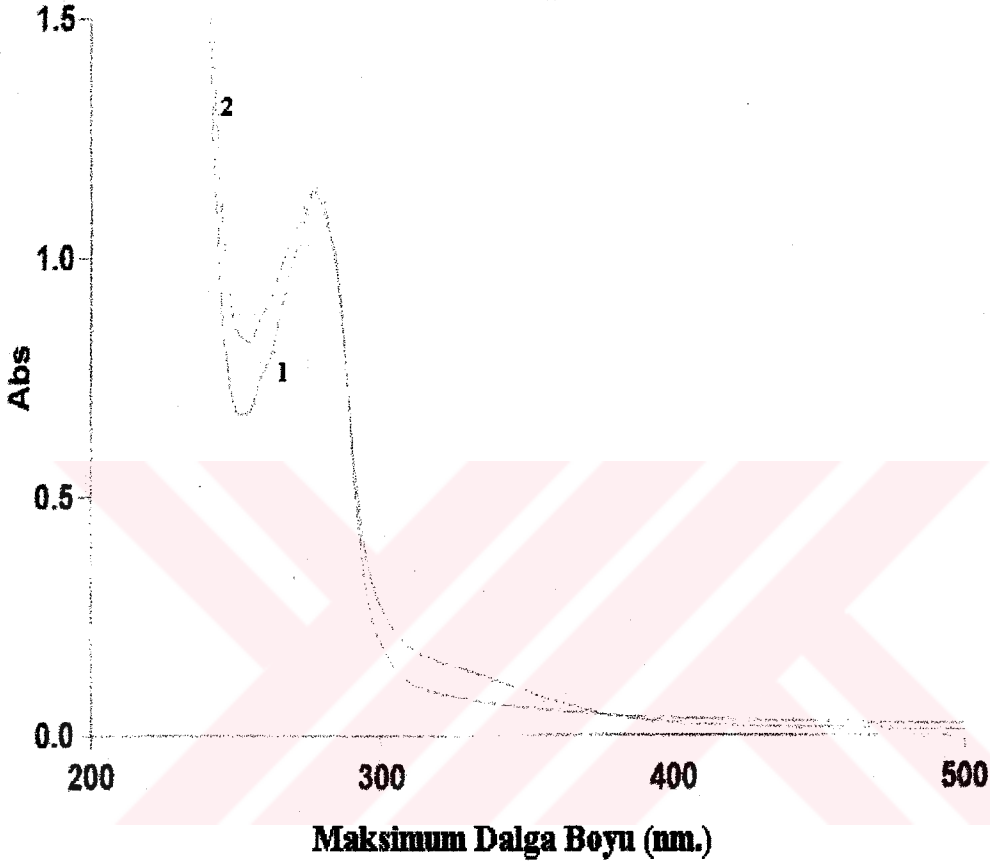
##### 1200 Gy ile Işınlanmış ve Işınlanmamış 0.15 % BSA UV-Absorbans Sonuçları;



Şekil 5.1 Işınlanmamış(1) 0.15% BSA'nın UV absorbansı ile 1200 Gy. ile ışınlanmış 0.15% BSA'nın UV absorbansı

Grafikten görüldüğü gibi BSA'nın UV- Absorbansı ışınlama sonucu artış göstermektedir. Bunun nedeni ışınlama etkisi ile protein yapısında meydana gelen değişikliklerdir. (agregasyon, yapıda kısmi denaturasyon)

**1200 Gy ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm -BSA karışımlarının UV-Absorbans Sonucu;**



Şekil 5.2 Işınlanmamış(1) 0.1% pNIPAAm ve 0.15% BSA karışımı ile 1200 Gy. ile ışınlanmış(2) 0.1% pNIPAAm ve 0.15 BSA karışımı

Gördüğü gibi 1200 Gy. ile ışınlanmış ve ışınlanmamış polimer-protein konjugatının UV-Absorbans grafiği, 1200 Gy. ile ışınlanmış ve ışınlanmamış BSA'nın UV-Absorbans grafiğinden farklıdır. Işınlanmamış ve ışınlanmış BSA'nın UV-Absorbans grafikleri birbirlerinden farklı iken, ışınlanmış ve ışınlanmamış polimer-protein konjugatları UV-Absorbansları arasında fark görülmemektedir. Bunun nedeni polimerin protein yapısını ışınlamaya karşı daha kararlı bir hale getirmesidir.

### 5.1.2 Farklı Şiddetdeki $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ Işınları ile Oluşturulmuş pNIPAA-BSA Konjugatları ile serbest 0.15 % BSA Floresans Sonuçları

Serbest BSA, serbest pNIPAAm ve BSA-pNIPAAm konjugatının ışınlama şiddetine göre floresans yoğunlukları ve maksimum dalga boyu değişimleri 2 düzeyde incelenmişlerdir;

1-) Sıcaklık sabit tutularak ışınlama şiddeti artırılarak

2-) Işınlama sabit tutularak sıcaklık artırılarak.

Oluşturulan grafikler ışın şiddetinin logaritması ile kurulmuştur. Karışımlar üzerine uygulanan radyoaktif ışınlamanın şiddeti sırası ile 0,5,10, 25,50,100, 500, 1200 'dür.

$$\text{Log}5= 0.698$$

$$\text{log}100=2$$

$$\text{Log}10= 1$$

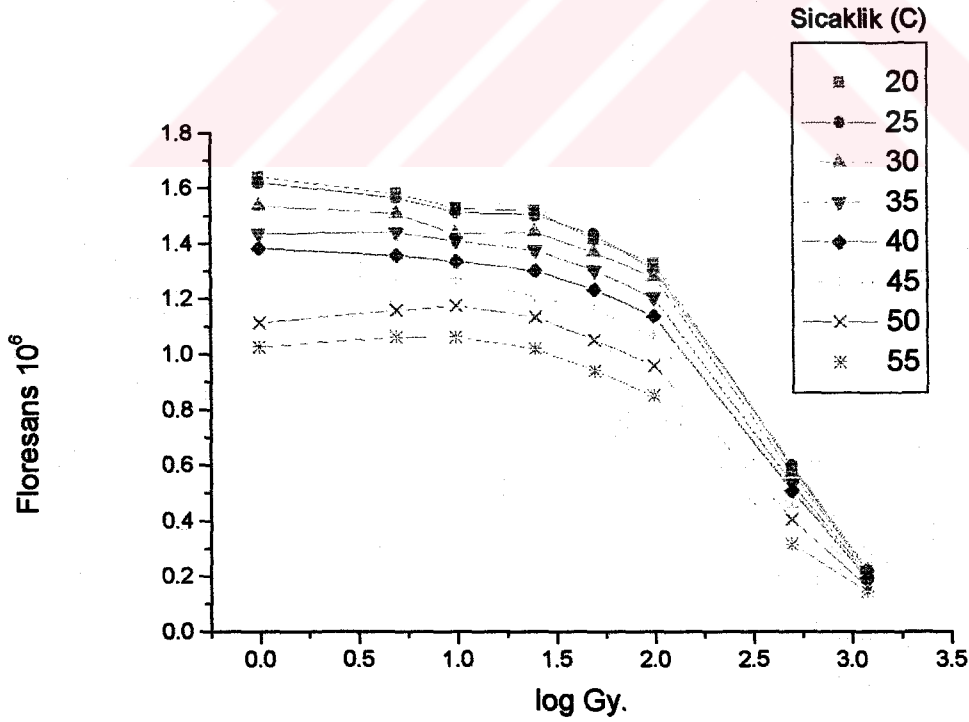
$$\text{log}500=2.698$$

$$\text{Log}25=1.4$$

$$\text{log}1200=3.079$$

$$\text{Log}50=1.698$$

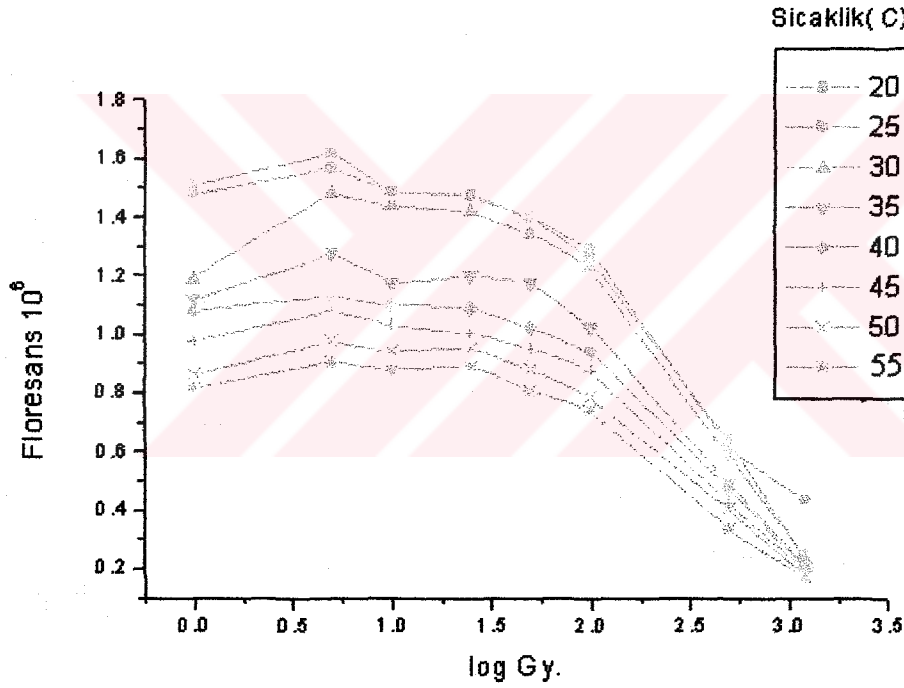
#### Işın Şiddeti Değişimine Göre Serbest BSA Floresans Yoğunluğu Değişimi;



Şekil 5.3 Işın Şiddedi değişimine göre serbest BSA floresans yoğunluğu değişimi grafiği değerleri çizelgesi

Yukarıda, ışınlama şiddeti arttıkça serbest BSA'nın floresans yoğunluğu değişimi grafiği sunulmuştur. Yukarıdaki grafikten, BSA çözeltisinin floresans yoğunluğunun, ışınlama şiddeti 0-100 Gy. arasında iken, çok az miktarda azalmakla birlikte yaklaşık olarak sabit kaldığı, ancak 100 Gy.'den fazla iken keskin bir şekilde azaldığı gözlenir. Işınlama şiddeti arttıkça floresans yoğunluğu azalması da artar. Floresans yoğunluğunun değişimi, incelenen her sıcaklıkta bu şekilde gerçekleşmektedir. Bunun yanında, sabit radyasyon ışın şiddetinde sıcaklık artışı ile floresans yoğunluğunun azaldığı gözlenmektedir.

### Işın Şiddeti Değişimine Göre BSA-pNIPAAm Konjugatları Floresans Yoğunluğu Değişimi;

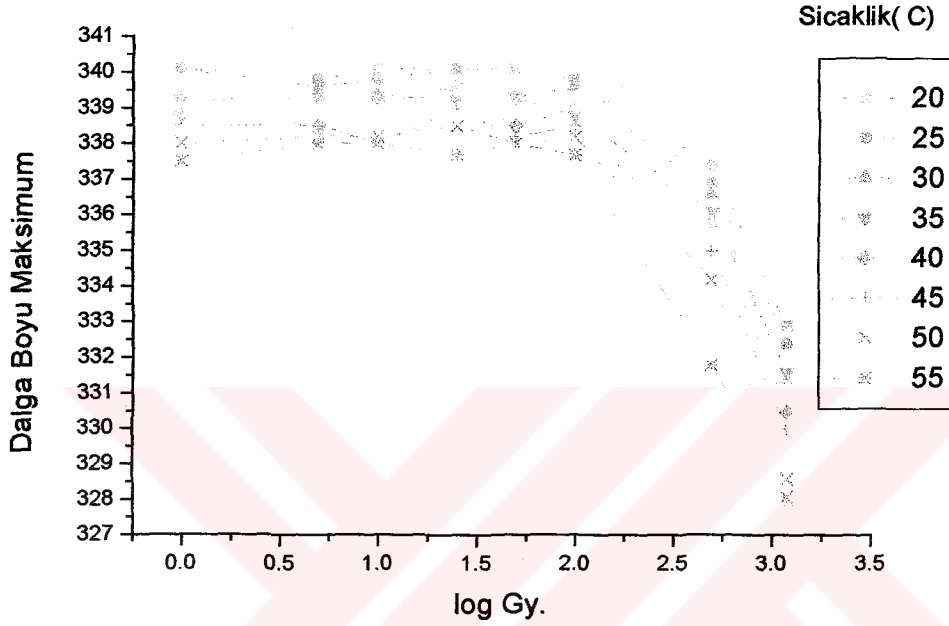


Şekil 5.4 Işın şiddeti değişimine göre pNIPAAm-BSA karışımı floresans yoğunluğu değişimi grafiği

Yukarıda polimer-protein konjugatının ışın şiddeti artması ile floresans yoğunluğu değişimi grafiği sunulmuştur. Serbest BSA floresans yoğunluğu incelemesinde olduğu gibi, polimer-protein konjugatınının da floresans yoğunluğu ışın şiddeti arttıkça azalma göstermektedir. Işın şiddeti 0-100 Gy arasında iken floresans yoğunluğu çok az bir azalma gösterip yaklaşık olarak sabit kalırken, ışın şiddeti 100 Gy.'den fazla olduğunda floresans yoğunluğu belirgin bir şekilde azalma göstermektedir.. Yapı hakkında daha kesin bir sonuç elde etmek için

konjugatın ışın şiddeti artması ile floresans verdiği maksimum dalga boyu değişimi incelenmelidir.

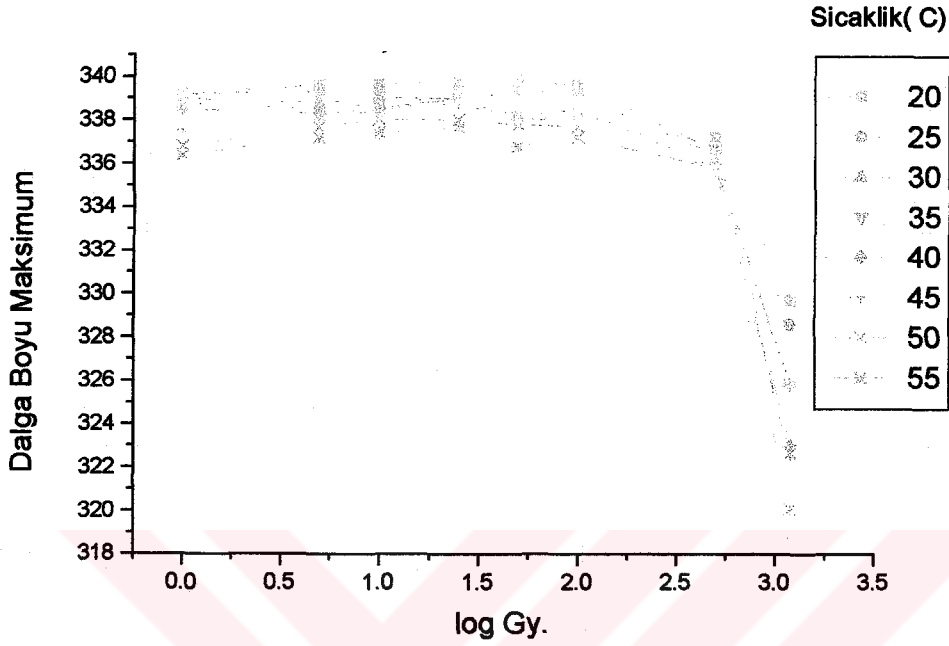
### Işın Şiddetine Göre BSA Maksimum Dalga Boyu Değişimi;



Şekil 5.5 Işın şiddeti değişimine göre BSA maksimum dalga boyu değişimi grafiği

Yukarıda serbest BSA'nın ışın şiddetine göre floresansının maksimum dalga boyu değişimi grafiği sunulmuştur. Bu grafiğe göre, BSA'nın floresans verdiği maksimum dalga boyu, ışın şiddeti 0-100 Gy. arasında iken 338-340 nm., 100 Gy.'den yukarıda iken ise 323-328 nm. arasındadır. BSA floresansının maksimum dalga boyu değişiminin ışın şiddeti 0-100 Gy arasında yaklaşık olarak sabit kaldığı, ışın şiddeti 100 Gy'den fazla olduğunda ise çok keskin bir azalma gösterdiği gözlenmektedir. 100 Gy'den fazla ışın şiddetlerinde, dalga boyu maksimumun keskin bir şekilde azalma göstermesinin nedeni, BSA'nın yapısında farklılıkların oluşması ile bünyesindeki Trp'nin su ortamından uzaklaştığı söylenilebilir.

## Işın Şiddeti Değişimine Göre pNIPAAm-BSA Konjugatlarının Maksimum Dalga Boyu Değişimi;

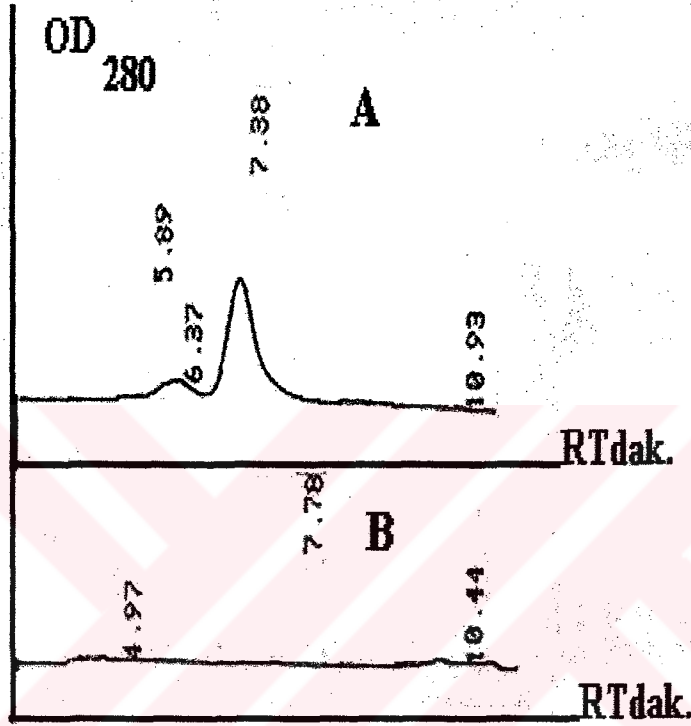


Şekil 5.6 Işın şiddeti değişimine göre pNIPAAm-BSA karışımı maksimum dalga boyu değişimi grafiği

Yukarıda BSA-pNIPAAm karışımının, ışın şiddetine göre floresansının maksimum dalga boyu değişimi grafiği sunulmuştur. BSA-pNIPAAm karışımının ışınlama şiddetine göre floresans maksimum dalga boyu değişimi serbest BSA'ninkinden oldukça farklıdır. Serbest BSA'da 100 Gy'den fazla ışın şiddeti, maksimum dalga boyunda keskin bir azalışa neden olurken, BSA-pNIPAAm karışımında 500 Gy'e kadar maksimum dalga boyunda keskin bir azalış gözlenmemektedir. PNIPAAm-BSA karışımı maksimum floresans dalga boyu değişimi ışınlama şiddeti artması ile 'blue shift' verir. PNIPAAm-BSA karışımının, maksimum floresans dalga boyunun 500 Gy ışın şiddetine kadar sabit kalması, oluşan konjugatın yapısındaki BSA'nın maksimum bu dalga boyundaki ışınlamaya karşı korunduğu anlaşılır.

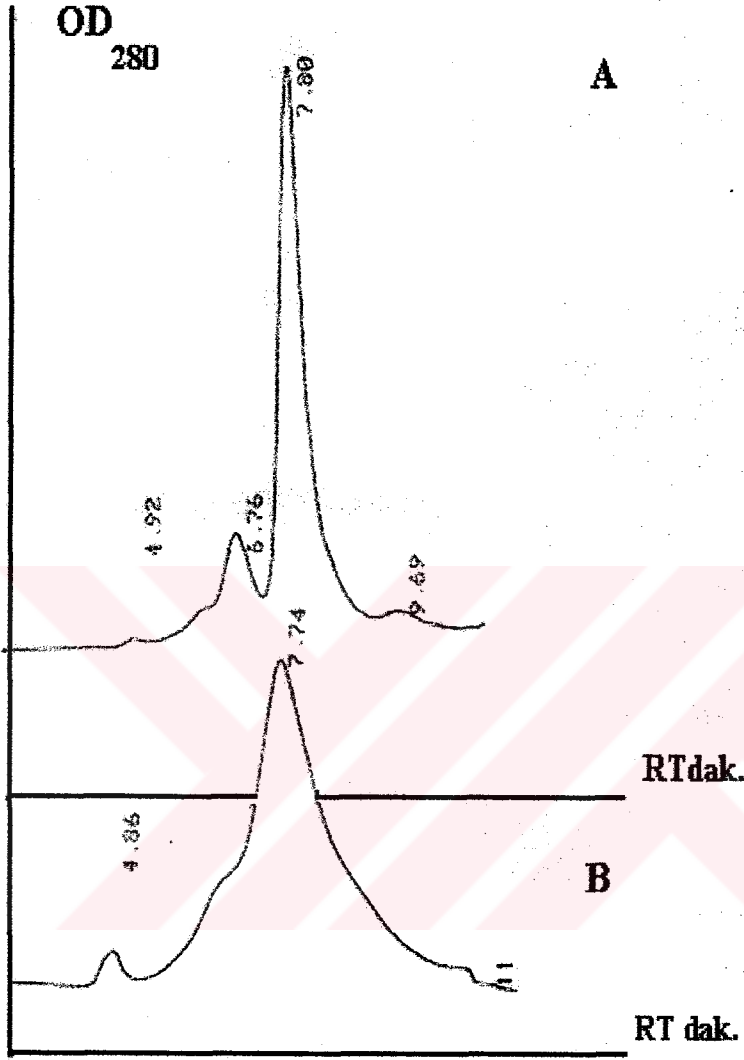
### 5.1.3 Işınlanmış ve ışınlanmamış pNIPAAm-BSA Konjugatının ve Serbest BSA ile pNIPAAm Çözeltilerinin Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları

Işınlanmış ve Işınlanmamış Serbest 0.1 % pNIPAAm Çözeltisi Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;



Şekil 5.7 1200 Gy ile Işınlanmış(B) ve ışınlanmamış(A) 0.1 % pNIPAAm çözeltisi HPLC sonuçları

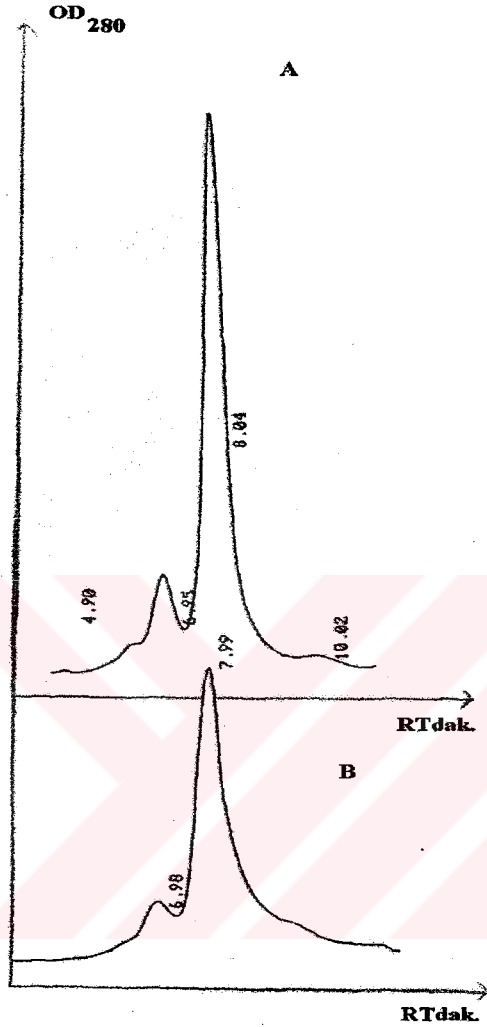
Şekilde serbest polimerin 1200 Gy ışınlamadan önce ve sonra jel filtrasyon HPLC sonuçları sunulmuştur. Işınlanmamış serbest polimer 7.38. dakikada bir pik gösterirken, 1200 Gy ile ışınlanmış polimer çözeltisi hiçbir pik göstermemektedir. Polimerin bu ışınlama dozunda kendi içinde çapraz bağlar oluşturarak suda çözünmeyen agregatlar oluşturduğunu söyleyebiliriz.

**1200 Gy. ile Işınlanmış ve Işınlanmamış 0.15 % BSA Çözeltilisinin Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;**

Şekil 5.8 Işınlanmamış(A) ve 1200 Gy. ile ışınlanmış(B) 0.15 % BSA çözeltisinin Jel Filtrasyon HPLC Sonucu

Şekilde serbest BSA'nın 1200 Gy ışınlama öncesi ve ışınlama sonrası jel filtrasyon HPLC sonuçları verilmiştir. Görüldüğü gibi 1200 Gy ışınlanmış proteinin RT değeri azalmış ve oluşan pikin formu kuvvetli deformasyona uğramıştır. Bundan, BSA'nın 1200 Gy ışın şiddetinden dolayı denature olduğu ve molekül ağırlığının arttığı sonucuna varılır. .

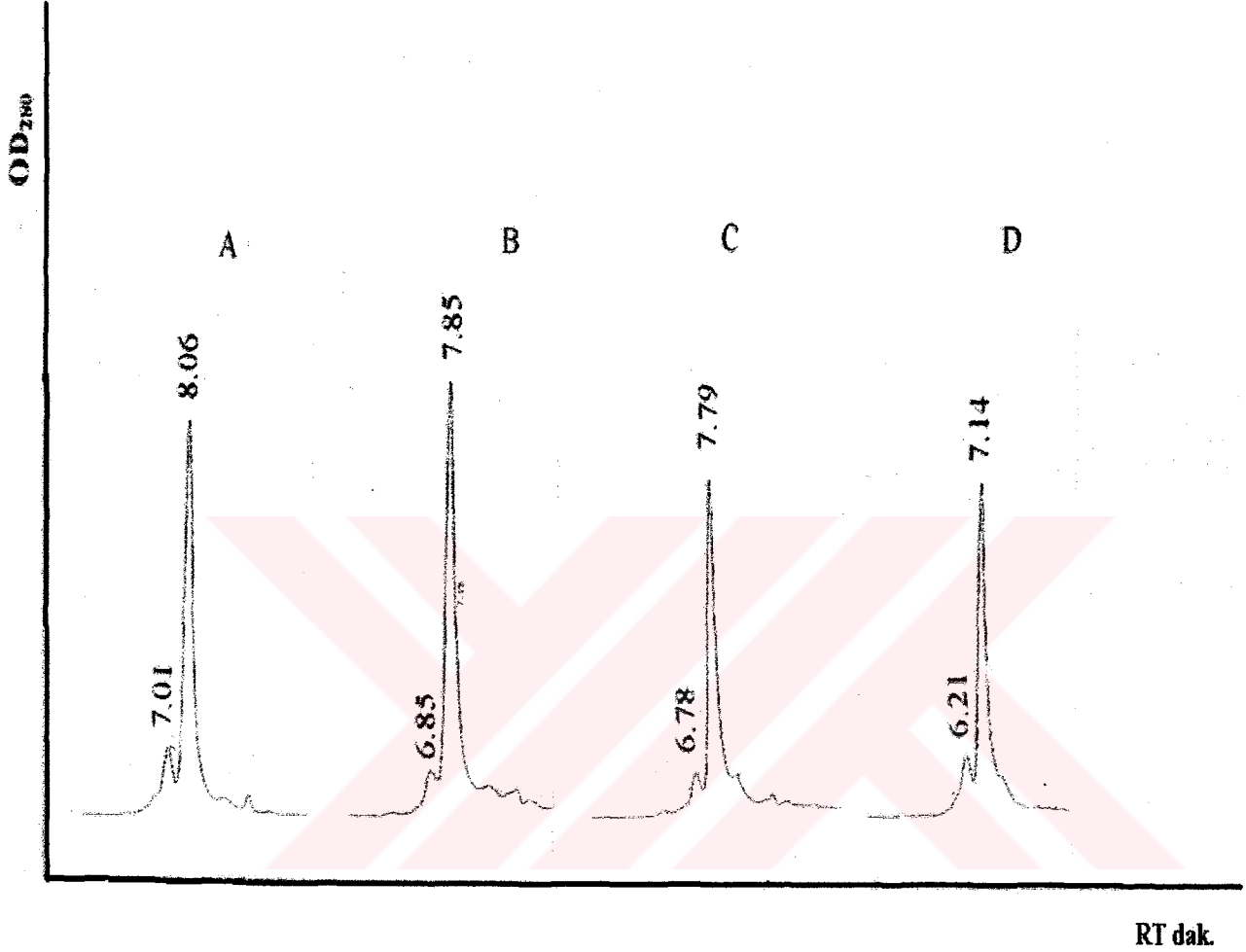
## 1200 Gy. ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-BSA Karışımı Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;



Şekil 5.9 1200 Gy. ile Işınlanmış(B) ve ışınlanmamış (A) pNIPAAm-BSA karışımının jel filtrasyon HPLC Sonuçları

Şekilde 1200 Gy. ışın şiddeti ile ışınlanmış ve ışınlanmamış polimer-protein karışımı jel filtrasyon HPLC sonuçları gösterilmektedir. Grafikten 1200 Gy. ışınlama sonrası polimer ve proteinin bağlanarak bir konjugat oluşturduğu ve konjugatın yapısındaki protein molekülünün ışınlamaya karşı korunduğu anlaşılmaktadır.

**100, 300, 500, 700 Gy. Şiddetli Işımlar ile Işınlanmış pNIPAAm-BSA Konjugatlarının Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;**

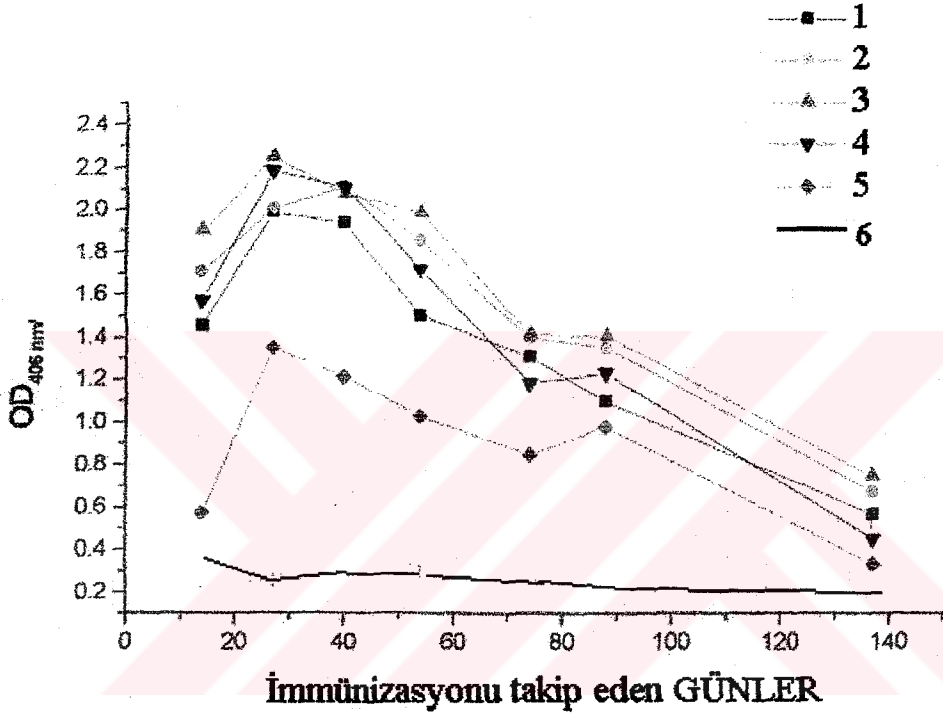


Şekil 5-10 Farklı ışın dozları ile ışınlanmış pNIPAAm-BSA konjugatı jel filtrasyon HPLC sonuçları. Işınlama dozları A-100 Gy B- 300 Gy C-500 Gy D-700 Gy

Grafikten polimer-protein üzerine 100-700 Gy. arasında radyoaktif ışın uygulandığında, homojen yapılu konjugatların oluştuğu anlaşılır. Radyasyon şiddetleri arttıkça oluşan konjugatlara ait piklerin RT değerlerinin azalması, karışımdaki komponentlerden daha yüksek molekül ağırlığa sahip bir biyokonjugat oluşumuna göstergedir. Bu da polimer ile proteinin bağlandığının bir göstergesidir

### 5.1.4 Işınlanmış pNIPAAm-BSA Konjugatlarının İmmünizasyon Sonuçları

#### Farklı Şiddetli $^{60}\text{Co}$ Gama Işını ile Işınlanmış pNIPAAm-BSA Konjugatları İmmünizasyon Testi (Eliza Testi) Sonuçları



Şekil 5.11 Farklı şiddetli radyasyon ile ışınlanmış pNIPAAm-BSA karışımlarının immünizasyon testi sonuçları grafiği

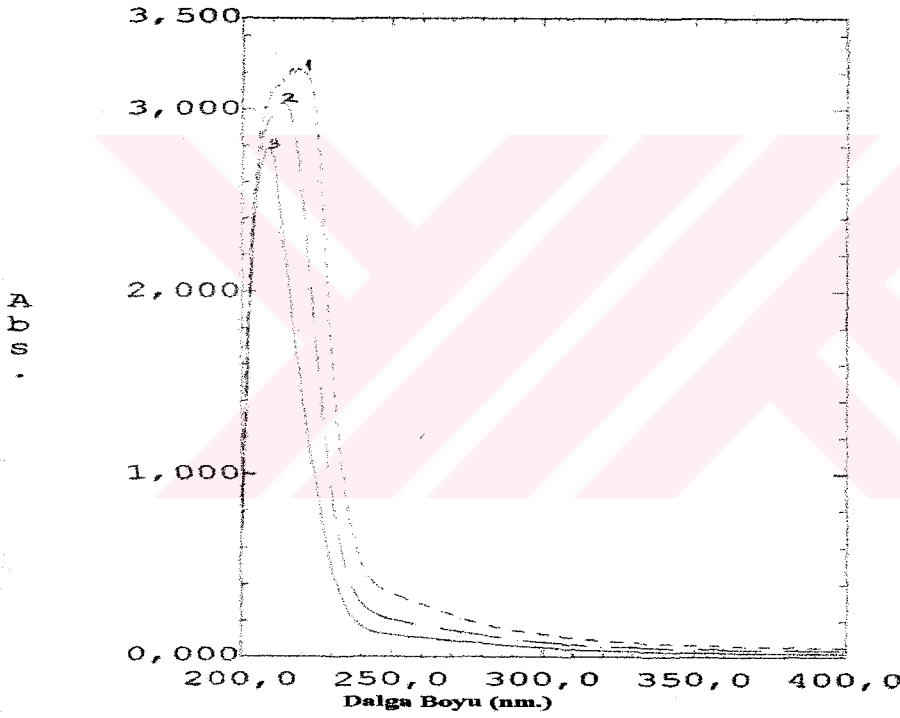
- 1- 0.1 % pNIPAAm+ 0.15% BSA, 100 Gy. Işınlama
- 2- 0.1 % pNIPAAm+ 0.15% BSA, 300 Gy. Işınlama
- 3- 0.1 % pNIPAAm+ 0.15% BSA, 500 Gy. Işınlama
- 4- 0.1 % pNIPAAm+ 0.15% BSA, 700 Gy. Işınlama
- 5- 0.1 % pNIPAAm+ 0.15% BSA, 1200 Gy. Işınlama
- 6- Serbest BSA ile İmmünizasyon

Eliza Testleri sonucunda elde edilen grafiklerden çıkan sonuca göre 100,300,500, 700 Gy'lik ışın şiddeti ile ışınlanmış konjugatların immünizasyon sonuçları birbirlerine çok yakın olup 1200 Gy ile ışınlanmış konjugat ve serbest BSA'nın immünizasyon sonuçları bunlardan belirgin şekilde düşüktür. En iyi immünizasyon veren konjugatlar ise 500,300, 700,100 Gy. ile ışınlanmış konjugatlardır.

## 5.2 Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 Dizili Epitopu Karışımı UV Absorbans ve Jel Fitrasyon HPLC Sonuçları

### 5.2.1 Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü Peptid Epitopu (40-60) Karışımları UV-Absorbans Sonuçları

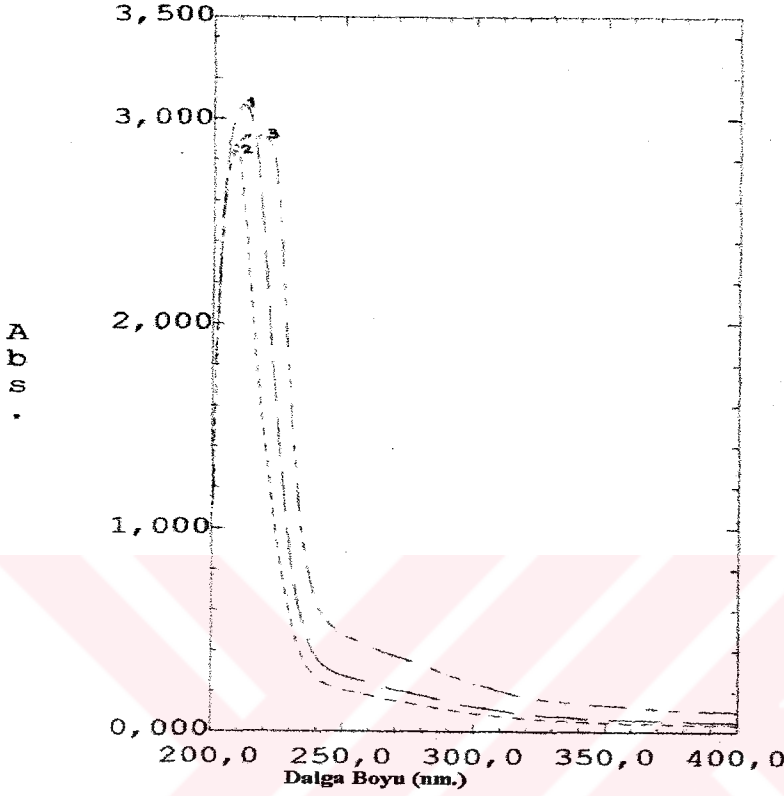
#### Işınlanmamış farklı konsantrasyonlardaki pNIPAAm-Ş. H. V. Peptid Epitopu Konjugatları UV-Absorbans Sonuçları;



Şekil 5.12 Işınlanmamış peptid konjugatları UV-absorbans sonuçları  
 1- 2 mg. peptid epitopu/1.5 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS, Işınlanmamış  
 2- 1 mg. peptid epitopu/3 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS, Işınlanmamış  
 3- 0.5 mg. peptid epitopu/3 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/ 1.5 ml. PBS, Işınlanmamış

Farklı oranda peptid içeren ışınlanmamış pNIPAAm-peptid konjugatlarının UV-absorbans sonuçları birbirlerinden pek önemli derecede farklılık göstermez. Işınlanmamış peptid konjugatları yaklaşık 214 nm.'de maksimum absorbans vermektedirler.

### 500 Gy ile Işınlanmış pNIPAAm-Ş.H.V.P Epitopu Konjugatı UV-Absorbans Sonuçları;

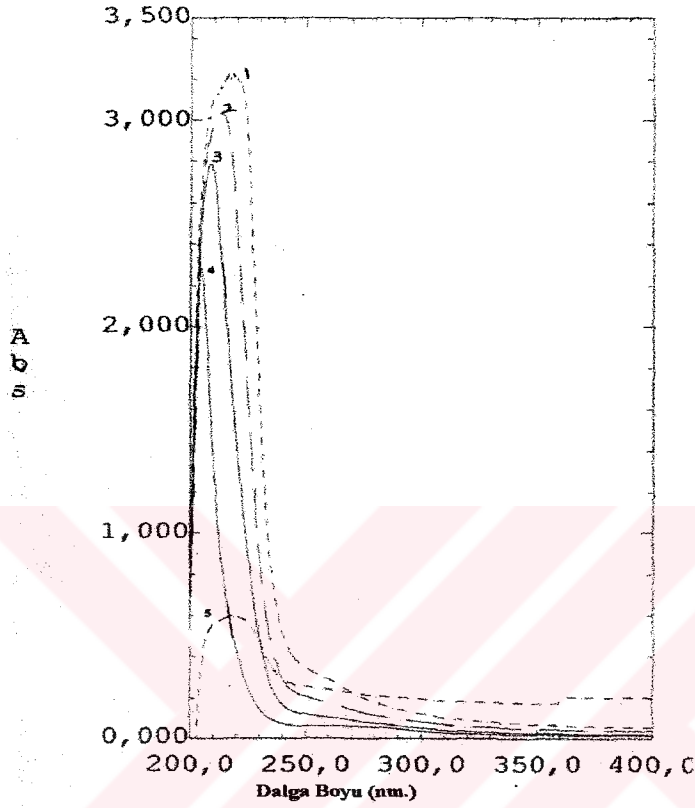


#### 5.13 500 Gy. ile ışınlanmış peptid konjugatlarının UV-Absorbans sonuçları

- 1-1 mg. peptid epitopu/1.5 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS, 500 Gy. Işınlama
- 2- 0.5 mg. peptid epitopu/3 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS, 500 Gy. Işınlama
- 3- 2 mg. peptid epitopu/3 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/ 1.5 ml. PBS, 500 Gy. Işınlama

Yukarıda, 500 Gy. ile ışınlanmış peptid konjugatlarının UV-Absorbans değerleri sunulmuştur. Işınlanmış peptid konjugatları da yaklaşık 214 nm.'de maksimum absorbans vermektedirler. Işınlanmış peptid konjugatları UV-Absorbans grafiğinin, ışınlanmamış peptid konjugatları UV-Absorbans grafiğinden belirgin bir farkı görülmemektedir.

**Işınlanmamış pNIPAAm-Şap H. V. P. Epitopu (40-60) Karışımlarının ve Serbest Şap Has. V. Peptid Epitopu ile pNIPAAm Çözeltilerinin UV-Absorbans Sonuçları;**



Şekil 5.14 Işınlanmamış peptid-polimer konjugatları ile serbest BSA ile pNIPAAm'nın UV-absorbans sonuçları

- 1- Işınlanmamış 2 mg. peptid/1.5 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS
- 2- Işınlanmamış 1 mg. peptid/1.5 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS
- 3- Işınlanmamış 0.5 mg. peptid/1.5 ml. PBS + 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS
- 4- 0.5 mg. serbest Şap Has. V. Peptidi
- 5- 2 mg. pNIPAAm/1.5 ml. PBS

Grafikten de anlaşılacağı gibi karışımların UV-Absorbans değerleri serbest peptid ve polimerden çok daha farklıdır. Bu da ışınlama olmamasına rağmen peptid ve polimer arasında bir etkileşim meydana geldiğini gösterir.

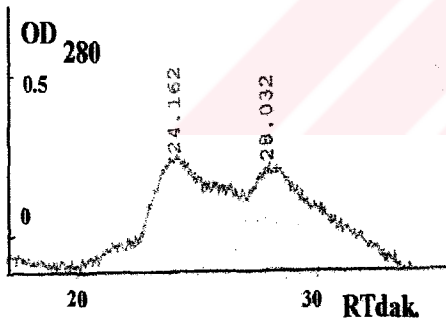
## UV-Absorbans Sonuçlarının Bir Tablo Üzerinde Gösterilmesi;

Çizelge 5.5 UV-Absorbans değerlerinin bir tablo üzerinde gösterilmesi

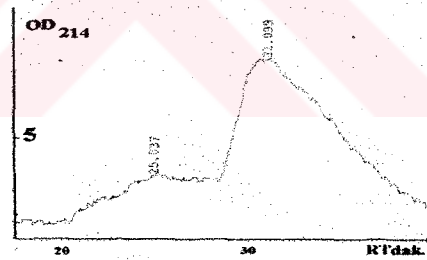
	<i>pNIPAAm-0.5 mg. peptid</i>		<i>PNIPAAm- 1 mg.peptid</i>		<i>PNIPAAm-2 mg. peptid</i>	
	<i>Işınlanmış</i>	<i>Işınlanmamış</i>	<i>Işınlanmış</i>	<i>Işınlanmamış</i>	<i>Işınlanmış</i>	<i>Işınlanmamış</i>
<b>OD<sub>214</sub></b>	<b>2.131</b>	<b>2.255</b>	<b>3.021</b>	<b>3.046</b>	<b>2.920</b>	<b>3.174</b>
<b>OD<sub>280</sub></b>	<b>0.131</b>	<b>0.074</b>	<b>0.117</b>	<b>0.179</b>	<b>0.332</b>	<b>0.181</b>

### 5.2.2 Radyoaktif <sup>60</sup>Co Gama Işını ile Işınlanmış ve Işınlanmamış pNIPAAm-Ş. H. V. Peptid Epitopu Karışımlarının Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları

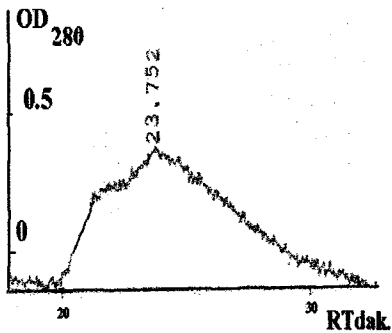
#### 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsü Protein Epitopu (40-60) İçeren Işınlanmış ve Işınlanmamış Karışımların Jel Filtrasyon HPLC İncelemesi;



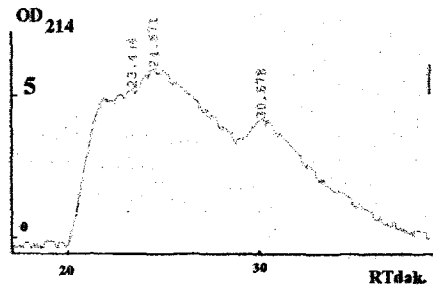
Şekil 5.15 Işınlanmamış konjugat



Şekil 5.16 Işınlanmamış konjugat

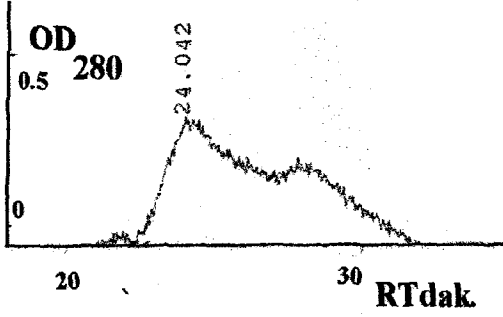


5.17 500 Gy. Işınlanmış konjugat

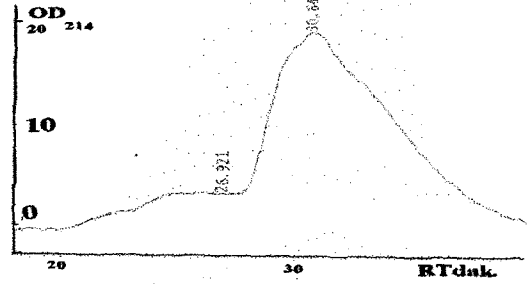


Şekil 5.18 500 Gy. Işınlanmış konjugat

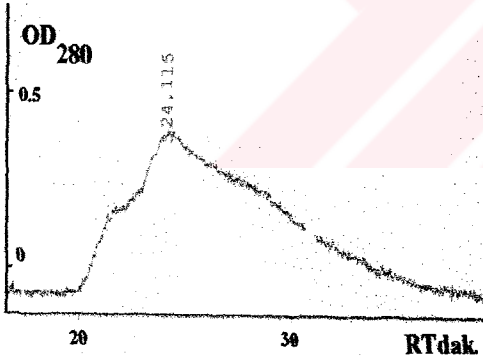
**1 mg. Şap Hastahğı Virüsü Protein Epitopu(40-60) İÇeren İŞınlanmıŞ ve İŞınlanmamıŞ KarıŞımların Jel Filtrasyon HPLC SonuÇları;**



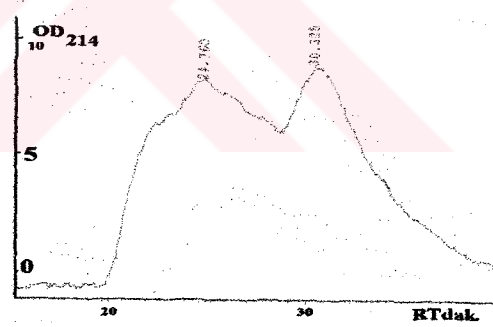
Şekil 5.19 İŞınlanmamıŞ Konjugat



Şekil 5.20 İŞınlanmamıŞ Konjugat

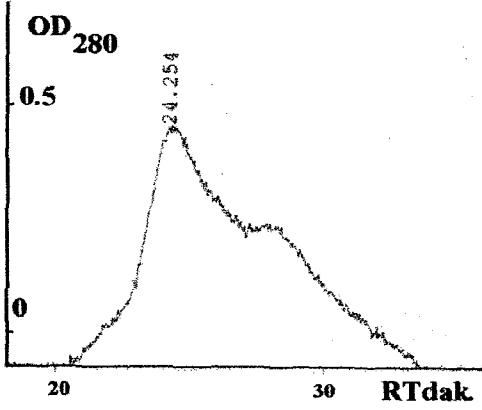


Şekil 5.21 500 Gy. ile İŞınlanmıŞ konjugat

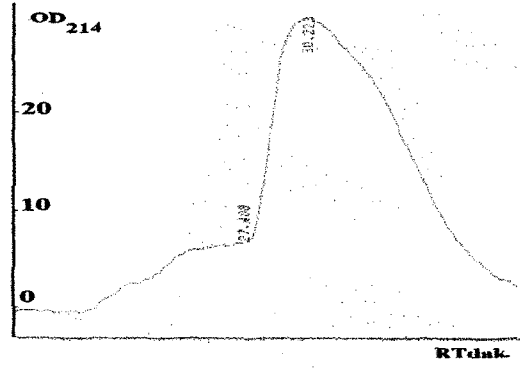


Şekil 5.22 500 Gy. ile İŞınlanmıŞ Konjugat

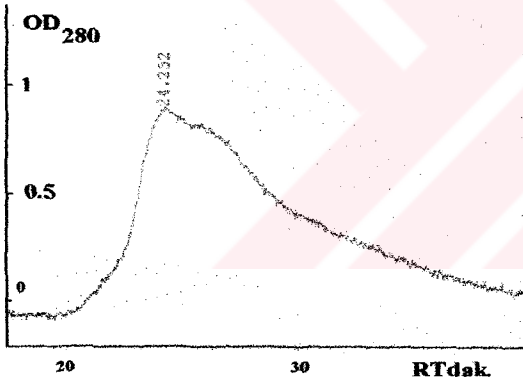
**2 mg. Şap Hastalığı Virüsü Proteini Eritopu (40-60) İÇeren Işınlanmış ve Işınlanmamış Karışımların Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;**



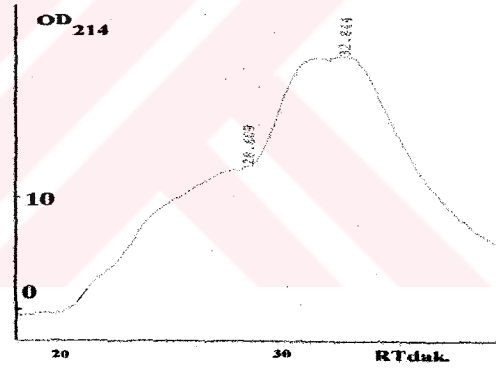
5.23 Işınlanmamış Konjugat



5.24 Işınlanmamış Konjugat



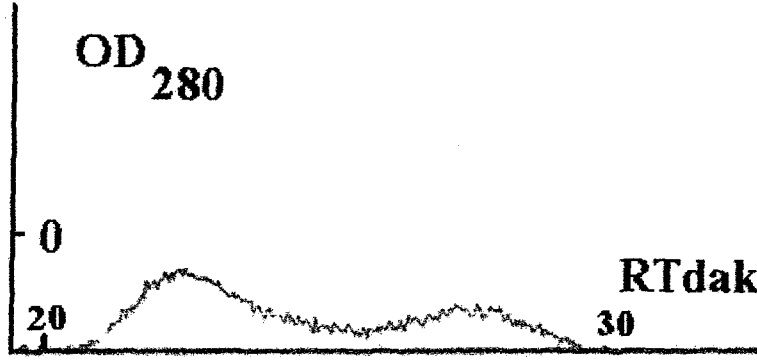
5.25 500 Gy. ile Işınlanmış Konjugat



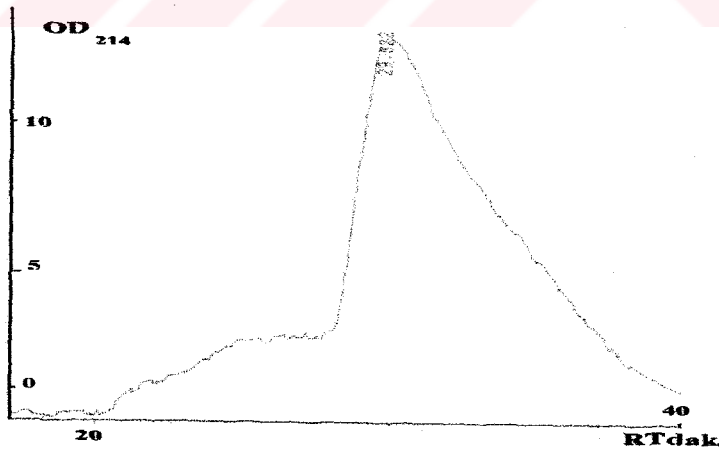
5.26 500 Gy. ile Işınlanmış Konjugat

Hem 280nm. dalga boyunda hemde 214 nm. dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda, ışınlama ile, karışımların içerdiği komponentlerin molekül ağırlıklarından daha fazla molekül ağırlığına sahip yeni bir maddenin oluşumu gözlenmiştir. Bu durum farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış her 3 konjugat için de geçerlidir.

**Işınlanmamış Serbest 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsü VP1Proteini 40-60 Dizili Epitopunun  
Jel Filtrasyon HPLC Sonuçları;**



**Şekil 5.27 Işınlanmamış 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsünün Peptid Epitopu(40-60) Jel Filtrasyon  
HPLC Sonuçları  
(OD<sub>280</sub>)**

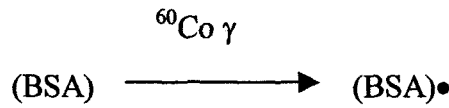
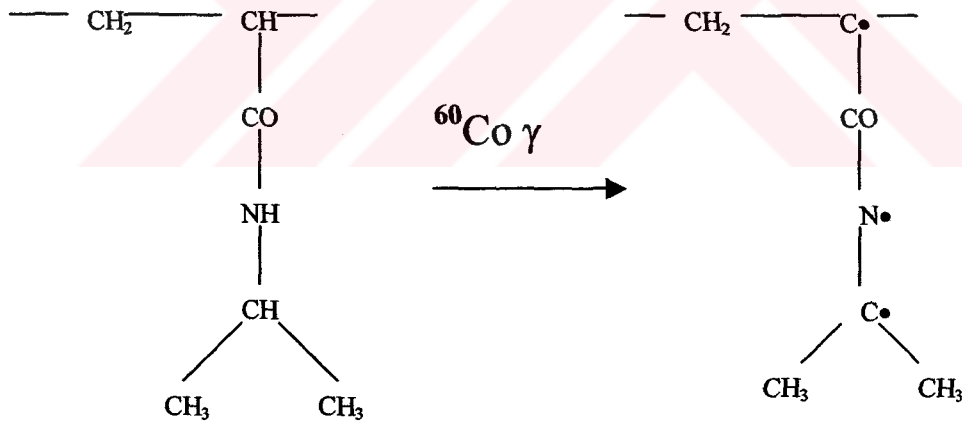


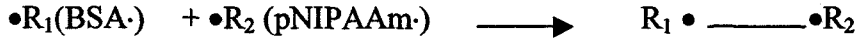
**Şekil 5.28 Işınlanmamış 0.5 mg. Şap Hastalığı Virüsünün Peptid Epitopu(40-60) Jel Filtrasyon  
HPLC Sonuçları  
(OD<sub>214</sub>)**

## 6. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Polimer-protein ve polimer-peptid karışımlarının  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  ışınlaması ile elde edilen kovalent konjugatlarının UV-visible spektroskopisi, floresans spektroskopisi, jel filtrasyon HPLC ve immünizasyon analizlerinin sonuçları ayrı ayrı deneysel sonuçlar kısmında verilmiştir. Bu deneysel sonuçların incelenmesi ile varılan sonuçlar ise aşağıdaki gibidir;

1. Radyasyon etkisi ile, yapısında fonksiyonel grupları olmayan pNIPAAm polimeri ile BSA'nın su ortamında suda çözünebilir biyokonjugatlar oluşturduğu gözlenmiştir. Işınlama sonrası elde edilen konjugatların HPLC analizleri kromatogramları, daha yüksek molekül ağırlığına bir biyokonjugat oluşumunu gösterirken, UV absorbans grafikleri de ışınlama ile karışımın absorbansının artış göstermesi nedeni ile suda çözünebilir biyokonjugatlar oluştuğunu göstermektedir. En düşük 100 Gy. ışınlanma şiddeti ile biyokonjugatın oluştuğu, ışınlanma şiddetinin artması ile ise komponentler arasındaki kovalent bağların sayısının arttığı düşünülebilir. Şematik olarak oluşan konjugasyon reaksiyonunu aşağıdaki gibi gösterebiliriz.

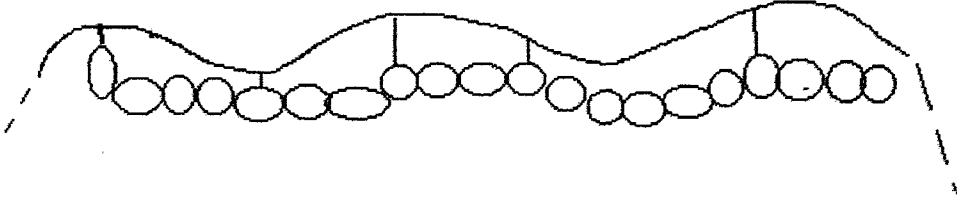




Burada, polimerin ve proteinin yapısındaki en zayıf bağlanmış hidrojen atomlarının ayrılması ile polimer ve proteinde serbest radikallerin oluşması ve oluşmuş radikallerin rekombinasyon ile birbirleri ile bağlanması gösterilmektedir. Bağlanma sonucunda oluşan biyokonjugatların molekül ağırlıkları ayrı ayrı komponentlerden fazla olduğu için bu konjugatlar kolondan daha hızlı çıkmaktadırlar.

2-) Oluşmuş konugatların yapısı hakkında fikir edinmek için karışımlar, daha sık aralıklı şiddetlerde ışınlanmış ve sıcaklık değişimli olarak floresans tekniği ile araştırılmıştır. 0-100 Gy ışınlama şiddeti aralığında, saf BSA'nın yapısındaki Trp.'dan kaynaklanan floresans yoğunluğunun değişmediği gözlenmiştir. Ancak 100 Gy. üzerindeki ışınlamalarda floresans yoğunluğunun şiddetli bir şekilde azaldığı (quenching) görülmüştür. Bunun yanında sıcaklık arttıkça floresans yoğunluğunun ve floresans maksimum dalga boyunun yaklaşık 1.5-2 kat azaldığı gözlenmektedir. Floresans analizlerinden elde edilen en önemli sonuç, ışın şiddetine göre maksimum dalga boyu değişiminden elde edilmektedir. Serbest BSA'nın maksimum dalga boyunun keskin bir şekilde değişimi, ışın şiddetinin 100 Gy. değerinden hemen sonra başlamaktadır. BSA'nın pNIPAAm ile konjugatının maksimum dalga boyu ise pratik olarak 500 Gy. ışınlama şiddetine kadar değişmemektedir. Bu sonuçlar, polimerin protein ile konjugasyon oluşumunu ve bu oluşum sonucu proteinin radyostabilitesinin arttığını gösterir. Polimer-protein radyostabilitesinin artmasında en önemli etkenin polimer makromolekülleri yumağının protein üzerinde bir örtü oluşması ve böylece protein molekülünün korunması olduğu sonucuna varılabilir. 100,300,500,700 Gy ile ışınlanmış konjugatların farelere immünizasyon sonuçları da serbest BSA'nın immünizasyon sonuçlarından belirgin şekilde farklıdır.

3-) Oluşturulan polimer-protein konjugatları analiz sonuçları baz alınarak farklı oranlarda hazırlanmış pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü VP1 proteini peptid epitopu(40-60) konjugatları oluşturulmuştur. Konjugat oluşumu UV-spektroskopisi ve jel filtrasyon HPLC metodları ile kanıtlanmıştır. Bu konjugatların şematik yapısı aşağıdaki gibi gösterilebilir



Sekil 5.29 pNIPAAm-Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini Peptid Epitopu (40-60) Konjugatının Açık Gösterilmesi

**Şap Hastalığı Virüsü VP1 Proteini 40-60 Dizili Peptid Epitopu:**

Valin-Lizin-Isolözin-Asparagin-Asparagin-Treonin-Serin-Prolin-Treonin-Histidin-Valin-Isolözin-Asparagin-Lözin-Metiyonin-Glutamin-Thr-Histidin-Glutamin-Histidin-Glisin

**KAYNAKLAR**

- Abuchowski, A., McCoy, J.R., Polczuk, N.C., van Es, T., and Davis F.F (1977a) "Effect of covalent attachment of PEG on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase." *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 379-384
- Babbitt, J. M. (1956) "Periodate oxidation of carbohydrates." *Adv. Carbohydr. Chem.* 11-41
- Bernstein, A., Hurwitz., Maron, R., Arnon, R., Sela, M., and Wilcheck, M. (1978) "Higher antitumor efficiency of daunomycin when linked to dextran; in vivo and in vitro studies." *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 379-384
- Brinkley, R. W (1998) "Modern Carbohydrate Chemistry".Dekker, San Diego
- Browne, D.T and Kent, S.B. H. (1975) "Formation of nonamide products in the reaction of primary amines with imidoesters" *Biochem Biophys. Res. Commun.* 67-126
- Brooksby, J.T., "Portraits of virüses: Foot and Mouth disease virus. *Intervirology.*"1982: 18:1-23
- Burroughs J.N., Rowlands D.J Sangar D.V et al "Further evidence for multiple proteins in the Foot-and-Mouth disease virus particle." *J Gen Virol* 1971;13:-84
- Hermanson P. Greg, *Bioconjugate Techniques*, 1995
- Di Marchi, R., Brooke. G., Gale, C., et al "Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide" *Science* 1986:232:639-641
- Francis, M.J, Fry C.M, Rowlands, D.J. et al "Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virüs" *J. Gen Virol* 1985: 66:2437-2354
- Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J, Brown, F. "Qualitative and quantitative differences in the immune response to foot-and-mouth disease virüs antigens and synthetic peptides" *J. Gen. Virol.* 1988,178-659
- Heindel, N. D., Zhao, H., Leiby, J., VanDangen, J. M., Locey, C.J., Lima., D.A., Shabsoug, B., and Buzby, J. H. (1990) "Hydrozide pharmaceuticals as conjugates to polyaldehyde dextran: Synthesis, characterization and stability" *Bioconjugate Chem.* 1,77-82
- Heindel, N.J., Kaufman, M.A., Akyea, E.K., Engel, S.A., Frey, M.F., Lacey, C.J., and Egaf, R.A (1994) "Carboxymetyldextran lactone: A preactivated polymer for amine conjugations" *Bioconjugate Chem.* 5, 98-100
- Haore, D. G., and Koshland, D.E., (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 2057.
- Kobayashi, M., and Ichishima, E. 81991) "Application of periodate oxidized glucans to biochemical reactions." *J. Carbohydr Chem.* 10, 635-644
- Lowe, C.R., Harvey, M.S., Craven, D. B., and Dean P.D.G (1973) *Biochem. J.* 133,499
- Mustafaev, M.I., Norimov A. S ve Petrov, R. V., (1992), "Synthetic Immunomodulators" *Nauka, Moscow.*

- Mustafaev M.I, Bayülken S., Ergen E., Erkol Yılmaz A., Ardagil N., “ Radiation induced formation of polyacrylic acid-protein covalent conjugates” *Radiation Physics and Chemistry* 60(2001) 567-575
- Mustafaev M.I., Salman Dilginmen A., Demchenko M., Kaneko T., Osada Y., “ Water Soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-Isopropylacrylamide) and their immunojenity”, *Biomaterials* 22(2001)2383-2392
- Mustafaev M.I “Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives”, *Turkish Journal of Chemistry*, 1996, 20, pp. 1-15
- Mustafaev M.I, (1996), *Biyopolimerler*, Gebze, Kocaeli
- Mümtaz, S., and Bachawat, B.K. (1991) “Configuration of proteins and enzymes with hydrophilic polymers and their applications” *Indian J. Biochem. Biophys.* 28, 346-351
- Nathau, A., Zalibsky., Ertel, S.I., Agathos, S.N, Yarmush, M.L., and Kahn, J. (1993) “Copolymers of lysin and polyetylenglycol: A new family of functionalized drug carriers.” *Bioconjugate Chem.* 4, 54-62
- Parry, N.R., Qulridge, E.J, Barnet, P.V, et al “Serological prospects for peptide vaccines against foot-and-mouth disease virüs” *J. Gen. Virol.* 1989: 70:2919-2930
- Palmenberg, A.C “Sequence alingments of picarnoviral capsid proteins” *Amer. Socie. For microbio.*1989 pp 211-241
- Petrucci R.H., (1989), *General Chemistry*, New York
- Rossmann, M.G., Arnold, E., Erickson, J.W, et al “Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses.” *Nature ( London)* 1985:317:145-153
- Saraç, S., Özeroğlu, C. ve Mustafaev, M.I., (1995), “ The ternary complexes of Bovine Serum Albumin and polyacrylamide derivatives in the presence of copper ions in natural water”, *J. Bioact. Complet. Poly.* 10: 121
- Van Bekkum, J.G “Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD. Sessions of the research group of the standing technical committee
- Wieder, K.S., Palczuk, N.C., van ES, T., anda Davis, F.F (1979) “Some properties of PEG; phenylalanine ammonia-lyase adducts.” *J. Biol. Chem.* 254, 12579-12587
- Williams, A., and İbrahim, I.A.(1981) “A mechanizm involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodidimid)” *J. Am. Chem. Soc.* 103. 7090-7095
- Zalibpsky, S., Seltzer, R., and Menou, Rudolph, S. (1992) “Evaluation of a new reagent for covalent attachment of PEG to proteins.” *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15-114
- Zalipsky, S., Seltzer, R., and Nho, K. (1991) “Succinimidyl carbonates of PEG: Useful reactive polymers for preperation of protein conjugates in polymeric drugs and drug delivery systems” (R.L. Downn and R.M. Ottenbrite, eds.) PP 91-100. Amrical Chemical Society, Washington, D.C

Zalipsky, S., Seltzer, R., and Menou. Rudolph, S. (1992) "Evaluation of a new reagent for covalent attachment of PEG to proteins." *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15,100-114



**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum Tarihi	16.11.1973	
Doğum Yeri	Van	
Lise	1987-1990	Özel Ahmet Şimşek Fen Lisesi
Lisans	1991-1996	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2002	Yıldız Teknik Üniversitesi Biyokimya Bölümü

**Çalıştığı Kurum**

1997-2000

İLSAN-İLTAŞ İlaç Fabrikası