

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOHİBRİD YAPILI ve BİYOTAKLİTÇİ  
POLİMER-PEPTİD KONJUGATLARININ  
GELİŞTİRİLMESİ**

Biyolog Banu MANSUROĞLU

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Savunma Tarihi** : 18 Eylül 2007  
**Tez Danışmanı** : Yrd. Doç.Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)  
**Jüri Üyeleri** : Prof.Dr.Candan ERBİL (İTÜ)  
: Prof.Dr. Hüseyin YILDIRIM (YTÜ)  
: Prof.Dr. İnci ATAÇ (YTÜ)  
: Prof.Dr. Tuncay ALTUĞ (İÜ)

İSTANBUL, 2007

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTIMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xxiii
ÖNSÖZ.....	xxiv
ÖZET.....	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 İmmün Sistem.....	5
2.1.1 İmmün Sistemde Görevli Organlar.....	6
2.1.1.1 Birincil Lenfoid Organlar.....	6
Kemik İliği.....	6
Timus.....	7
2.1.1.2 İkincil Lenfoid Organlar.....	7
Lenf Düğümleri.....	7
Mukozalara Bağlı Lenfoid Doku.....	7
Dalak.....	7
2.1.2 İmmün Sistemde Görevli Hücreler.....	7
2.1.3 Antijen.....	8
2.1.3.1 Antijen Molekülleri ve Özellikleri.....	9
2.1.3.2 Antijen Olabilme Özellikleri.....	9
Yabancılık.....	9
Molekül Yüzey Yapısı.....	9
Molekül Ağırlığı.....	10
Molekülün Çözünürlüğü ve Sertliği.....	10
2.1.4 İnfeksiyonlara karşı Defans Mekanizmaları.....	10
2.1.5 İmmüno globulinlerin Yapısı.....	11
2.1.6 Antikorların Fonksiyonları.....	12
2.1.7 Antijen-Antikor Reaksiyonları.....	12
2.1.8 Antijene Karşı Primer ve Sekonder Antikor Cevapları.....	13
2.2 Şap Hastalığı.....	14
2.3 Şap Hastalığının Dünyadaki Durumu.....	15
2.3.1 Türkiye’de Şap Hastalığının Durumu.....	16
2.3.2 Hastalığın Yayılışı.....	17
2.3.3 Şap Hastalığı Virüs Yapısı.....	17
2.3.4 Şap Hastalığı Virüsünün Antijenik Yapısı.....	19
2.3.5 Şap Hastalığı Virüsünün Hücre Tutucu Bölgeleri: Arg-Gly-Asp motif.....	20
2.3.6 Şap Hastalığı Virüsünün Genetik ve Antijenik Değişkenliği.....	21
2.3.7 Virüsün Özellikleri ve Klinik Belirtiler.....	22
2.4 Şap Hastalığı Teşhisi.....	23
2.5 Şap Hastalığı : Korunma ve Kontrol.....	23
2.5.1 Şap Hastalığı'nın Ekonomi ve Ticarete Etkisi.....	24
2.6 Şap Hastalığına Karşı Aşı Geliştirilmesi.....	25
2.6.1 Geleneksel Aşılar.....	25

2.7	Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları.....	28
2.7.1	İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri.....	28
2.7.1.1	Poelielektrolit Komplekslerinin İmmünojenliği.....	31
2.7.1.2	İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin çalışma modeli .....	37
2.7.1.3	Polielektrolit Kompleksleri ve Yapay Aşılar .....	39
2.7.1.4	Üçlü polielektrolit kompleksleri.....	40
2.7.1.5	Polielektrolit Komplekslerinin Alerjik Özelliği .....	41
2.8	Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller.....	42
2.8.1	BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini .....	43
2.8.2	BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar.....	44
2.8.3	KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) Proteini .....	45
2.8.4	OVA (Ovalbumin) Proteini .....	46
2.9	Liposom Özellikteki Taşıyıcı Moleküller .....	47
2.10	Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller.....	49
2.11	Çapraz Bağlama Reaktifleri .....	52
2.11.1	Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	53
2.11.2	Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar .....	55
2.11.3	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar.....	57
2.11.3.1	Karbodiimidler.....	58
	EDC.....	58
	CMC.....	59
	DCC .....	59
	DIC.....	60
	N,N-Karbonildiimidazol .....	60
	EDC ile Konjugasyonun Genel Reaksiyon Mekanizması .....	61
2.11.4	Organik Ortamda Konjugat Sentezinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar .....	62
2.11.4.1	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uranyum heksaflorofosfat (HBTU) .....	62
2.11.4.2	1-Hidroksilbenzotriazol hidrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O·xH <sub>2</sub> O) (HOBT).....	62
	HOBT ile Konjugasyonun Genel Reaksiyon Mekanizması .....	62
2.12	Konjugatların Saflaştırılması.....	63
2.12.1	Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri).....	63
3.	KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ .....	64
3.1	Moleküler Eleme Kromatografisi .....	64
3.2	Fluoresans Spektroskopisi.....	65
3.3	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri .....	66
4.	DENEYSEL KISIM.....	68
4.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler .....	68
4.1.1	Kullanılan Cihazlar .....	68
4.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	69
4.2	Vinil prilidon-Poliakrilik asid (VP/AA) Kopolimerleri.....	71
4.3	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Sentetik Peptid Dizileri .....	73

4.4	Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Peptid Antijenlerini içeren Biyokonjugatlarının Sentezi .....	80
4.4.1	Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezi .....	81
4.4.1.1	Kullanılan Çözeltiler .....	81
4.4.1.2	Hesaplamalar .....	83
4.4.1.3	Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Hazırlanması	84
4.4.1.4	Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlarının Zetasizer Cihazına ait Analiz Sonuçları .....	86
4.4.2	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini içeren Biyokonjugatların Sentezi .....	87
4.4.2.1	Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Sentezi .....	88
4.4.2.2	Kullanılan Çözeltiler .....	88
4.4.2.3	Hesaplamalar .....	88
4.4.2.4	Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks Hazırlanması .....	91
4.4.2.5	Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatların Hazırlanması .....	91
4.4.2.6	Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizilerini içeren Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerin HPLC-Viskotek ve Floresans Cihazları ile Yapılan Analiz Sonuçları .....	91
4.4.2.7	Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini içeren Fiziksel Komplekslerin Hazırlanması ve Biyokonjugatların Sentezi .....	105
4.4.2.8	Hesaplamalar .....	105
4.4.2.9	Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Dizisini içeren Fiziksel Komplekslerin Hazırlanması .....	107
4.4.2.10	Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizisini içeren Biyokonjugatların Sentezi .....	107
4.4.2.11	Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizilerini içeren Biyokonjugatların ve Fiziksel Komplekslerin HPLC-Viskotek ve Floresans Cihazlarına ait Analiz Sonuçları .....	107

4.4.3	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraktorür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranında Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid dizisini içeren Biyokonjugatın Sentezi.....	117
4.4.3.1	Kullanılan Çözeltiler.....	117
4.4.3.2	Hesaplamalar.....	117
4.4.3.3	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraktorür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranında Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatın Hazırlanışı.....	117
4.4.3.4	Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraktorür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid dizisini içeren biyokonjugatına ait HPLC-Viskotek Cihazları Analiz Sonuçları.....	118
4.4.4	Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak, Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini içeren Biyokonjugatların Sentezi.....	119
4.4.4.1	Hesaplamalar.....	120
4.4.4.2	Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini içeren Biyokonjugatların Hazırlanması.....	120
4.4.4.3	Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri (25:75; Mw 80.000) ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların HPLC-Viskotek ve Floresans Sonuçları.....	121
4.5	Floreskamin Yöntemi ile VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanması.....	125
4.5.1	Hesaplamalar.....	125
4.5.2	Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlardaki Amino Grubu Sayısının Tayini.....	126
4.5.3	Floreskamin Yöntemi ile Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanmasına ait Deney Sonuçları.....	127
4.6	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini içeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların MCF-7 Kanser Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi.....	127
4.6.1	MTT Deneyinin Hazırlanması.....	127
4.6.2	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi.....	128
4.6.2.1	Morfolojik İnceleme.....	128
4.6.3	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini.....	129
4.6.4	Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (25/75; Mw 80000) MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkisi.....	130
4.6.4.1	Morfolojik İnceleme.....	130
4.6.5	Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (25/75; Mw 80000) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini.....	131
4.6.5.1	Morfolojik İnceleme.....	131
4.6.6	VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi.....	132
4.6.6.1	Morfolojik İnceleme.....	132

4.6.7	VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini.....	133
4.6.7.1	Morfolojik İnceleme .....	133
4.6.8	VP/AA-Peptid Biyokonjugatın MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi .....	134
4.6.8.1	Morfolojik İnceleme .....	134
4.6.9	VP/AA-Peptid Biyokonjugatının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini.....	135
4.7	Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimerinin, A <sub>22</sub> Serotip Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan VP1 Yapısal Kapsid Proteininin Peptid Epitopları ile Kovalent Bağlanmaları Sonucu İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilir Polimer-Peptid Biyokonjugatlarının Sentezi.....	136
4.7.1	Hesaplamalar .....	136
4.7.2	Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimerinin, A <sub>22</sub> Serotip Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan VP1 Yapısal Kapsid Proteininin Peptid Epitopları ile Kovalent Bağlanmaları Sonucu İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilir VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait HPLC Cihazı Analiz Sonuçları .....	138
4.8	Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Balb/c farelere enjekte edilmesi .....	139
4.9	Fare Serumlarının alınması .....	142
4.10	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara karşı oluşan Antikor Miktar Tayini.....	143
4.10.1	Kullanılan Çözeltiler .....	143
4.10.2	ELISA Deneyinin Yapılışı .....	144
4.11	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayine Ait Sonuçlar.....	146
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ .....	148
5.1	Sentetik Polianyon Özellikteki VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma.....	149
5.1.1	Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma.....	149
5.1.2	Suda Çözünen 1-etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid Hidroklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlara Ait Tartışma .....	150
5.1.3	Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak, Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlarına Ait Tartışma .....	163

5.2	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların MCF-7 Kansere Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerine Ait Tartışma.....	166
5.2.1	Serbest peptidin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi	167
5.2.2	Serbest VP/AA kopolimerinin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi .....	167
5.2.3	VP/AA-Peptid fiziksel karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi .....	168
5.2.4	VP/AA-Peptid Biyokonjugatının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi .....	169
5.3	Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktarına Ait Tartışma.....	169
KAYNAKLAR .....		176
ÖZGEÇMİŞ.....		188

## SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
°	Derece
µL	Mikrolitre
Å	Angström
g	Gram
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
M <sub>w</sub>	Ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
n	Mol
Rpm	Dakikada dönme hızı
λ	Dalgaboyu

## KISALTMA LİSTESİ

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

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	İmmün Sistemde görevli Hücreler (Tetikurt, 2006)..... 8
Şekil 2.2	Antijen molekülü [1] ..... 9
Şekil 2.3	İmmüoglobülinin şematik yapısı (Rossman, 1972)..... 11
Şekil 2.4	Antijene spesifik antikor molekülleri [2]..... 13
Şekil 2.5	Şap Hastalığı Virüsünün ASIA serotipinin 2000-2006 yılları arasındaki dünyadaki durumu [6] ..... 15
Şekil 2.6	Şap Hastalığı Virüsünün SAT serotipinin 2000-2006 yılları arasındaki dünyadaki durumu [6] ..... 16
Şekil 2.7	Şap Hastalığı virüsünün C-S8c1 protomerinin ribbon protein diyagramı VP1-mavi, VP2-yeşil ve VP3-sarı kapsid proteinlerin birleşmesinden oluşur [8]. .. 17
Şekil 2.8	Şap Hastalığı Virüsü ve kapsid proteinlerin (VP1-4) Yapısal Gösterimi (Acharya vd., 1989)..... 18
Şekil 2.9	Olgun tip O <sub>1</sub> BFS Şap Hastalığı Virüsü virionun X-ışın kristalografisi verisine dayalı yapısı. Bu yapılar Acharya, (1989) ve Logan, (1993) tarafından gösterilmişlerdir. (a) Bir biyolojik protomerde viral proteinlerin β-barrel ve ilmik organizasyonunun gösterimi (b) Pentamer konumlanmış virionunun beşli eksenine aşağıdan bakış (c) Tüm bir virion, G-H ilmeği (sarı) ve RGD dizisi (beyaz) (d) Bir protomerde G-H ilmeğinin (mor), RGD dizisi (sarı) gösterimi Tüm bunlar olgun virüse aittir. Viral proteinler mavi renkli olan VP1'e, yeşil renkli VP2'ye, kırmızı renkli VP3'e karşı gelmektedir. VP4 partikülün içine gömülüdür. .... 19
Şekil 2.10	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 proteinin GH lobunun lokalizasyonu (yukarı) ve bu lobun konformasyonunun detaylı gösterimi (aşağıdaki) – Sarı; O1 BFS izole edilen, eflatun; C-S8c1 den izole edilen (Hewat vd., 1997) ..... 20
Şekil 2.11	Şap hastalığı virüs genomu yaklaşık 8.5 kb uzunluğunda tek zincirli RNA molekülünden oluşur. Genomik poliprotein translyasyonu sırasında 3 tane virüse kodlanmış proteazlar tarafından parçalanır. Viral poliprotein kapsid proteinin VPO, VP3 ve VPI içine alan PI bölgesine parçalanır. Kapsid ile çevrilmemiş olan RNA, VPO bölgesi henüz bilinmeyen proteazlarla kapsidin iç kısmında yer alan VP4 ve VP2 içine alacak şekilde parçalanır. Şap hastalığı virionları zarfsızdır ve isohedral yapılı, 20-30 nm çapında ve % 146 sedimantasyon katsayısına sahiptir (Clavijove Kitching, 2003)..... 22
Şekil 2.12	Avrupa' da kesme metodu ile hastalığın yayılmasını engelleme çalışmalarına ait görüntüler [9] ..... 24
Şekil 2.13	Fare karaciğer hücrelerinde antikor oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; 2-PC-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ve Poliakrilik asidin (PAA) (b) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Peolielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10 <sup>-6</sup> eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 2004, 1996a). .... 29
Şekil 2.14	a-b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri ..... 30
Şekil 2.15	Polimer-metal komplekslerinin [Me]/[PE] <<1(I) ve [Me]/[PE]>>1 (II) oranlarında oluşan yapı..... 30
Şekil 2.16	Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 2004, 1996a)..... 31

Şekil 2.17	Sığır Serum Albumin (BSA)'nin çeşitli PE'lerle karışımı ile immünize edilmiş farelerin dalak hücrelerindeki BSA'ya spesifik antijen oluşturan hücrelerin (AOH) nisbi miktarı; 1- Saf BSA; 2- PVP+BSA; 3- PVP-R <sub>16</sub> +BSA; 4- (PVP-R <sub>2</sub> +BSA) suda; 5- (PVP-R <sub>2</sub> +BSA) +0.15 M NaCl; 6- PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )+BSA; 7- PVP(R <sub>0</sub> PVP(R <sub>0</sub> ,R <sub>ac</sub> )+ BSA + Karbodiimid; 9- PAA + BSA; 10- (PAA + BSA) + Karbodiimid; 11- PSSNa + BSA; 12- CP(AA + MVP) + BSA. (PVP: Poli-4-vinilpiridin) (Mustafaev, 2004, 1996a).....	32
Şekil 2.18	Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı (Mustafaev, 2004, 1996a). .....	33
Şekil 2.19	BSA-PE kompleksleri ile immünize edilmiş fare dalak hücrelerinde BSA'ya karşı spesifik oluşan antikor oluşturan hücrelerinin oluşum kinetiği 1- BSA-PVP(R <sub>0</sub> ,R <sub>ac</sub> ); 2- BSA-PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> ); BSA-PVP-R <sub>2</sub> ; 4- Saf BSA (Mustafaev, 2004, 1996a).....	33
Şekil 2.20	Saf BGG (1) ve bunun MVP/AA kopolimeri ile kompleksleri 2- CP-3; 3- CP-2; 4- CP-1'lerle karışımları organizmaya immünize edildiğinde oluşan immün cevap (AOH miktarı) (Mustafaev, 2004, 1996a). .....	34
Şekil 2.21	Protein metal kompleksi-1 (I); Protein metal kompleksi-2 (II); Proteinlerin Kopolimerlerle (III) komplekslerinin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a)..	34
Şekil 2.22	PAA-BSA konjugatının yapısının PAA'nın polimerleşme derecesine bağlı olarak şematik gösterimi P <sub>n</sub> I 140 (I). 550 (II), 43 (III). III halinde BSA/PAA oranına bağlı olarak iki tür yapı oluşur (Mustafaev, 2004, 1996a). .....	35
Şekil 2.23	Kovalent PAA-BSA konjugatı enjekte edilmiş farelerin kanındaki antikor titrelerinin (-log <sub>2</sub> 7) (konsantrasyon) polimer zincirinin uzunluğuna (η) bağlılığı: 1- Birinci immün cevap enjeksiyondan sona 13 günde; 2,3,4-ikinci immün cevap: 7(2), 11(3),10(4) günlerde maksimum olmuştur. N=43 durumunda konjugatın yapısı yukarıdaki şekildeki III b'ye uygundur (Mustafaev, 1996a).....	35
Şekil 2.24	Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a). .....	36
Şekil 2.25	Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerin modellerinin yapısı. ....	37
Şekil 2.26	İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a) .....	38
Şekil 2.27	CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının Cu <sup>2+</sup> iyonları iştiraki ile kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı (Mustafaev, 1996a).....	41
Şekil 2.28	Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat ....	44
Şekil 2.29	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA*B konjugatı) (Mustafaev vd., 2002). ..	44
Şekil 2.30	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002) .....	45
Şekil 2.31	(a) Tek katmanlı liposomun sulu çekirdek kısmı ve fosfolipid ikili tabakasının yapısı (b) Polar ve apolar ilaç maddelerinin aynı anda liposomlarla taşınabilmesi [13] .....	47
Şekil 2.32	(a) Suda çözünebilen sentetik peptidler liposomlara direkt olarak hapsedilebilir, (b, c) Sentetik peptidler liposomlara kovalent olarak bağlanabilir (Haro ve Gómara, 2000).....	49
Şekil 2.33	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler.....	50

	Sayfa
Şekil 2.34	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler..... 51
Şekil 2.35	Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000)..... 52
Şekil 2.36	Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, Mustafaev, 2004)..... 52
Şekil 2.37	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi..... 53
Şekil 2.38	Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi..... 55
Şekil 2.39	EDC kullanılarak sentezlenen VP/AA-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması..... 61
Şekil 2.40	HOBt kullanılarak VP/AA-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması ..... 62
Şekil 2.41	Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantrite edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi ..... 63
Şekil 3.1	Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram..... 65
Şekil 3.2	Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual)67
Şekil 4.1	Vinil prilidon-akrilik asid (25/75) kopolimerinin infrared spektrumu ..... 71
Şekil 4.2	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış % 0.05 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimerine ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları..... 72
Şekil 4.3	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış % 0.05 VP/AA (50/50; Mw 80.000) Kopolimerine ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları..... 72
Şekil 4.4	0.01 M PBS pH 7 içerisinde hazırlanmış % 0.05 PAA çözeltisinin Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları ..... 73
Şekil 4.5	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1mg/ml’sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı. .... 75
Şekil 4.6	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1 mg/ml’sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı ..... 75
Şekil 4.7	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri <b>(2)</b> % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine ait HPLC kromatogramı ..... 76
Şekil 4.8	Sigma Genosys tarafından sentezlenen <b>(1)</b> % 0.1, <b>(2)</b> % 0.05, <b>(3)</b> % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisine ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları..... 76

Şekil 4.9	Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen <b>(1)</b> % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm; <b>(2)</b> % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm; <b>(3)</b> % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(4)</b> % 0.008 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm; <b>(5)</b> % 0.004 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm; <b>(6)</b> % 0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm; <b>(7)</b> % 0.0002 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 353$ nm ait Floresans Spektrumu.....	77
Şekil 4.10	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisinin 1mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı.....	77
Şekil 4.11	Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1 mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı.....	78
Şekil 4.12	Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen <b>(1)</b> % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(2)</b> % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(3)</b> % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(4)</b> % 0.008 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(5)</b> % 0.004 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(6)</b> % 0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm; <b>(7)</b> % 0.0002 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi $\lambda_{\max} = 352$ nm ait Floresans Spektrumu.....	78
Şekil 4.13	Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5 $\mu$ m, 20x0.21cm Kolon, 25°C Oda Sıcaklığı, 0.2 ml/dak Akış Hızı, Mobil faz A: Su, %0.1 TFA, Mobil faz B: Asetonitril, %0.1 TFA, %25-40 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC Kromatogramı.....	79
Şekil 4.14	Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5 $\mu$ m, 20x0.21cm Kolon, 25°C oda Sıcaklığı, 0.2 ml/dak Akış Hızı, Mobil faz A: Su, %0.1 TFA, Mobil faz B: Asetonitril, %0.1 TFA, %25-40 B Elüsyon Gradienti, 1,5 kV Dedektör Voltajı, 1,5 L/dak Gas Akış Hızı, 300 °C CDL Sıcaklığında yapılan Toplam İyon (Kütle Spektrometri) Kromatogramı.....	79
Şekil 4.15	Toplam iyon kromatogramındaki 10-11. dakikalar arasındaki pikin kütle spektrumu. Spektrumdaki pikler 931,50=(M+3H <sup>+</sup> ), 698,60=(M+4H <sup>+</sup> ), 559,30=(M+5H <sup>+</sup> ) iyonlarına aittir.....	80
Şekil 4.16	HRM şematik gösterimi, peptid molekülü (1), suda çözünebilen lineer Polielektrolit (2) ve peptid- lineer polimer konjugat (3).....	81
Şekil 4.17	Serbest AOT misel iç çapının $W_0 = [H_2O]/[AOT]$ oranına bağlı boyut değişimi	86
Şekil 4.18	<b>(1)</b> $W_0 = [PAA]/[AOT]$ (PAA pH 4.83), <b>(2)</b> $W_0 = [BSA]/[AOT]$ (BSA pH 7), <b>(3)</b> $W_0 = [BSA]/[AOT]$ (BSA pH 8); <b>(4)</b> $W_0 = [PAA + BSA]/[AOT]$ (BSA pH 7); <b>(5)</b> $W_0 = [PAA + BSA]/[AOT]$ (BSA pH 8) $W_0$ değerine bağlı misel boyutu. .	86
Şekil 4.19	Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde hazırlanan ve sentezin her basamağında yapılan ölçümlere ait boyut değerleri.....	87

Şekil 4.20	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.5 VP/AA- Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), <b>(2)</b> % 0.2 VP/AA (25/75; Mw= 80.000) Kopolimeri <b>(3)</b> % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	92
Şekil 4.21	0.025 M Sodyum Bikarbonat tamponunda pH 10.6 ’da hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.1 VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), <b>(2)</b> % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ait Viskotek Kırılma İndisi (a), UV (b), Işık Saçılması (c), Viskozite (d) kromatogramları.....	93
Şekil 4.22	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c) kromatogramları.....	93
Şekil 4.23	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), <b>(3)</b> % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(4)</b> % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin170-188 Peptid Dizisine ait HPLC kromatogramları.....	94
Şekil 4.24	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks, ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), <b>(6)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramı.....	95
Şekil 4.25	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ), <b>(6)</b> % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) kopolimerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramı.....	96
Şekil 4.26	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(2)</b> % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, <b>(3)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), <b>(6)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), <b>(7)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait HPLC Kromatogramı.....	96
Şekil 4.27	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ; $\lambda_{\text{max}}346$ nm), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ; $\lambda_{\text{max}}346$ nm), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ; $\lambda_{\text{max}}346$ nm), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ; $\lambda_{\text{max}}345$ nm), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ; $\lambda_{\text{max}}345$ nm), <b>(6)</b> %0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün VP1 kapsid proteininin 170–188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}352$ nm) ait Floresans Spektrumları.....	97

Şekil 4.28	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (2) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (6) VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları .....	97
Şekil 4.29	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (2) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Dizilimli Peptidi, (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (6) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (7) VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait HPLC Kromatogramı .....	98
Şekil 4.30	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ; $\lambda_{\text{max}}344$ nm), (2) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ; $\lambda_{\text{max}}344$ nm), (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ; $\lambda_{\text{max}}344$ nm), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ; $\lambda_{\text{max}}343$ nm), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ; $\lambda_{\text{max}}343$ nm), (6) %0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün 170-188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}352$ nm) ait Floresans Spektrumları .....	98
Şekil 4.31	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (2)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (3)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=14$ ), (4)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=21$ ), (5)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=28$ ), (6) % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları .....	99
Şekil 4.32	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (2)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (3)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=14$ ), (5)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=21$ ), (4)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=28$ ), (5) % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (6) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine (-N terminal uc kısmında trp amino asidi içermeyen) ait HPLC Spektrumu.....	99
Şekil 4.33	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (♦) %0.1 PAA Polimeri (Mw=100.000) (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=4$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=31$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=41$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları .....	100

- Şekil 4.34 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), **(2)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), **(3)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), **(4)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=31$ ), **(5)** PAA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=41$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları..... 101
- Şekil 4.35 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), **(2)** %0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, **(3)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=4$ ), **(4)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), **(5)** PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=31$ ), **(6)** PAA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=41$ ) ait HPLC Spektrumu ..... 101
- Şekil 4.36 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(2)** PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=10$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(3)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=20$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(4)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=31$ ;  $\lambda_{\text{max}}347$  nm), **(5)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=41$ ;  $\lambda_{\text{max}}347$  nm), **(6)** % 0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün 170-188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}352$ ) ait Floresans Spektrumları .. 102
- Şekil 4.37 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait pH değişimine bağlı 280 nm absorbands değerleri ..... 102
- Şekil 4.38 **(1)** % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), **(2)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, **(3)** pH 5 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), **(4)** pH 7 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait HPLC kromotogramları ..... 103
- Şekil 4.39 PAA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait pH değişimine bağlı 280 nm absorbands değerleri ..... 103
- Şekil 4.40 0.01 M PBS pH 5 ve 7’de hazırlanmış PAA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları ..... 104
- Şekil 4.41 **(1)** % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), **(2)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170–188 Peptidi, **(3)** pH 5 PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), **(4)** pH 7 PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait HPLC Spektrumları ..... 104
- Şekil 4.42 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları ..... 108
- Şekil 4.43 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları ..... 109

Şekil 4.44	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait HPLC kromatogramı.....	109
Şekil 4.45	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(5)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ; $\lambda_{\text{max}}349$ nm), <b>(6)</b> %0.004 Şap Hastalığı Vürüsünün 135-161 peptid dizine ( $\lambda_{\text{max}}353$ nm) ait flouresan spektrumu .....	110
Şekil 4.46	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	110
Şekil 4.47	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait HPLC kromatogramları .....	111
Şekil 4.48	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ; $\lambda_{\text{max}}335$ nm), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ; $\lambda_{\text{max}}337$ nm), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ; $\lambda_{\text{max}}337$ nm), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ; $\lambda_{\text{max}}335$ nm), <b>(5)</b> %0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ( $\lambda_{\text{max}}353$ nm) ait floresans spektrumları.....	111
Şekil 4.49	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ oranı sabit; <b>(1)</b> % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(2)</b> % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(3)</b> % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel komplekslerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları...	112
Şekil 4.50	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ oranında <b>(1)</b> % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(2)</b> % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(3)</b> % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel komplekslerine ait HPLC kromatogramı.....	112
Şekil 4.51	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ oranında <b>(1)</b> % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(2)</b> % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, <b>(3)</b> % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugata ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	113

- Şekil 4.52  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugatlarına ait HPLC Kromatogramları ..... 113
- Şekil 4.53  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm), **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}352$  nm), **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm), **(4)** % 0.004 Şap Hastalığı Virüsüne ait 135-161 peptid dizisi ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm) ait Floresans Spektrumu ... 114
- Şekil 4.54 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), **(6)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ), **(7)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları ..... 115
- Şekil 4.55 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), **(6)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ), **(7)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ) ait HPLC kromotogramları 116
- Şekil 4.56 0.01M PBS pH 7'de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ;  $\lambda_{\text{max}}328$  nm), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}}338$  nm), **(3)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ;  $\lambda_{\text{max}}332$  nm), **(4)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ;  $\lambda_{\text{max}}332$  nm), **(5)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ;  $\lambda_{\text{max}}336$ ), **(6)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ;  $\lambda_{\text{max}}337$ ), **(7)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ;  $\lambda_{\text{max}}339$ ) ait floresans spektrumları..... 116
- Şekil 4.57 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış **(1)**  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranında BSA-Peptid Biyokonjugatı, **(2)** % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi, **(3)**% 0.2 BSA'ya ait HPLC Spektrumu ..... 118
- Şekil 4.58 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış **(1)**  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranında BSA-Peptid Biyokonjugatı, **(2)** % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi, **(3)**% 0.2 BSA'a ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları..... 119

Şekil 4.59	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.2 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(2)</b> % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptidi, <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(4)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	122
Şekil 4.60	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.2 VP/AA (50/50; Mw=80.000) Kopolimeri, <b>(2)</b> % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptidi, <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	122
Şekil 4.61	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm), <b>(3)</b> VP/AA(50/50)-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ; $\lambda_{\text{max}}350$ nm) <b>(4)</b> %0.05 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizilimli Peptidine ( $\lambda_{\text{max}}353$ nm) ait floresans sonuçları.....	123
Şekil 4.62	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptidi, <b>(2)</b> % 0.5 VP/AA Kopolimeri, <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(4)</b> Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(5)</b> EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2’ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ) ait zetasizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları .....	123
Şekil 4.63	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ oranına sahip VP/AA-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti .....	124
Şekil 4.64	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ oranına sahip VP/AA(50/50)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti .....	124
Şekil 4.65	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış <b>(1)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=12$ ), <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), <b>(3)</b> % 0.2 VP/AA Kopolimerine (25/75; 80 000) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları.....	125
Şekil 4.66	<b>(1)</b> % 0.003 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizisi, <b>(2)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(3)</b> VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), <b>(4)</b> EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(5)</b> Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), <b>(6)</b> Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait floresans şiddet değişimi.....	127
Şekil 4.67	Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonu sonucu oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 4 mg/mL (b) 0.2 mg/mL (c) Kontrol.....	129

Şekil 4.68	VP/AA kopolimerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 6 mg/mL (b) 0.2 mg/mL (c) Kontrol.....	131
Şekil 4.69	VP/AA-Peptid fiziksel karışımının 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 3,2 mg/mL (b) 0.04 mg/mL (c) Kontrol.....	133
Şekil 4.70	VP/AA-Peptid biyokonjugatının 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 3,2 mg/mL (b) 0.04 mg/mL (c) Kontrol.....	135
Şekil 4.71	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ), (4) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), (5) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), (6) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ), (7) % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizilimli Peptidi, ait HPLC Kromotogramı .....	138
Şekil 4.72	0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı (VP/AA 50/50; $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), (4) % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine ait HPLC Kromotogramı .....	139
Şekil 4.73	Balb/c fare .....	139
Şekil 4.74	Kuyruk veninden madde enjeksiyonu .....	140
Şekil 4.75	İndirek ELISA’nın şematik gösterimi [17].....	145
Şekil 4.76	Yöntem 2’ye göre $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ; 9; 15 oranlarında ve 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar ile immünize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) VP/AA-Peptid’e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği146	
Şekil 4.77	Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ; 4 oranlarında ve 0.5mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 dizisini içeren biyokonjugatlar ile immünize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) VP/AA-Peptid’e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği.....	147
Şekil 5.1	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1’e göre bileşenlerinin farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ oranlarında sentezlenen VP/AA kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellik taşıyan VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisini içeren biyokonjugat (a) ve 131-165 peptid dizisini içeren biyokonjugatlara (b) ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği.....	152
Şekil 5.2	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1’e göre bileşenlerinin farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında sentezlenen PAA polimeri ve Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellikli VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisini içeren biyokonjugatlara ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği.....	154

Şekil 5.3	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (135-161) Biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının Kırılma İndisi (RI), UV, Işık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) dedektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği .....	156
Şekil 5.4	Hidrofilik özellikteki 135-161 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının peptid oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi .....	157
Şekil 5.5	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (135-161 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği.....	158
Şekil 5.6	Hidrofobik özellikteki 170-188 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının VP/AA kopolimerinin oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi .....	159
Şekil 5.7	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının Kırılma İndisi (RI), UV, Işık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği.....	160
Şekil 5.8	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait HPLC alan grafiği.....	161
Şekil 5.9	Hidrofobik özellikteki 170-188 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının peptid oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi .....	161
Şekil 5.10	Mikrodalga Teknolojisinde ısı dağılımı (Brittany, 2002).....	163
Şekil 5.11	0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış (1) % 0.2 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (2) % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisi, (3) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatı (4) Organik Ortamda Mikrodalga Yöntemi kullanılarak sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları .....	164
Şekil 5.12	(1) % 0.003 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizisi, (2) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (5) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (6) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait flouresans şiddet değişimi .....	166

	Sayfa
Şekil 5.13	EDC varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid fiziksel karışım ve biyokonjugatlarının enjeksiyon sonrası (35 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi ..... 170
Şekil 5.14	Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının enjeksiyon sonrası (56 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi ..... 172

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	İmmünojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH'ların göreceli miktarı..... 37
Çizelge 2.2	Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı. .... 39
Çizelge 2.3	Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin titresi (miktar) (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler) ..... 39
Çizelge 2.4	Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktiflik (Mustafaev, 1996a)..... 40
Çizelge 2.5	Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap (Mustafaev, 1996a)..... 40
Çizelge 2.6	Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap (Mustafaev, 1996a)..... 41
Çizelge 2.7	Farelerde serbest OA veya PE kompleksi ile immünize edildikten birinci ve üçüncü hafta sonra OA'ya karşı oluşan immün cevabının dinamiği (Mustafaev, 1996a). .... 42
Çizelge 2.8	Verilen preparatların dozuna bağlı olarak hayvanların OA veya bunun PEK ile bir kat immünize edildikten 10 gün sonra OA'ya karşı IgE cevabının seviyesi (Mustafaev, 2006). .... 42
Çizelge 4.1	$W_0 = 5-55$ değerleri arasında $[H_2O]$ ve $[AOT]$ 'nın konsantrasyon değerleri.... 84
Çizelge 4.2	MCF 7 hücrelerinin serbest peptidin konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği..... 130
Çizelge 4.3	MCF 7 hücrelerinin VP/AA kopolimer konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği..... 132
Çizelge 4.4	MCF 7 hücrelerinin VP/AA-Peptid fiziksel karışımının konsantrasyona bağlı % canlılığı ..... 134
Çizelge 4.5	MCF 7 Hücrelerinin VP/AA-Peptid biyokonjugatının konsantrasyona bağlı % canlılık eğrisi..... 136
Çizelge 4.6	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen örneklerinin içeriği ..... 141
Çizelge 4.7	Mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen örneklerinin içeriği ..... 142

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve becerisi ile beni yönlendiren, yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın her yönde önünü açan, ileri laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bizlere sağlayan eşsiz desteği ile bana her konuda yardımcı olan, akademik kariyerimde bugüne gelmemde emeği mevcut değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölümünün Kurucusu ve Bölümü Başkanı Sayın Prof.Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile beni yönlendiren Sayın Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE'ye,

Tez için gerekli olan peptidlerin sentezini gerçekleştiren Araş.Gör. Zafer ÖZDEMİR'e, Boyut ve Zeta potansiyel ölçümlerimi gerçekleştiren Araş.Gör. Eray DALGAKIRAN'a, GPC-Viskotek analizlerimi gerçekleştiren Araş.Gör. Murat TOPUZOĞULLARI ve Araş.Gör. Yunus SARIÇAY'a, HPLC analizlerimi gerçekleştiren Araş.Gör. Namık AKILIÇ'a ve Flouresans ölçümlerimi gerçekleştiren Araş.Gör. Yasemin Budama BATTAL'a, laboratuvar çalışmalarımda ki yardımlarından dolayı Araş. Gör. Serap ACAR'a,

TÜBİTAK, Marmara Arastırma Merkezi, Gen Mühendisligi ve Biyoteknoloji Arastırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları laboratuvarı sorumlusu Sayın Doç. Dr. Haydar BAGIŞ'a, deney hayvan çalışmalarımda ki yardımlarından dolayı Şakir SEKMEN'e ve Tolga AKKOÇ'a,

Hücre kültürü deneysel çalışmalarını gerçekleştiren Sayın Prof.Dr. Adil Allahverdiev ve hücre kültürü laboratuvar çalışanlarına,

Tez çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan Araş.Gör. Kadriye KIZILBEY'e, Araş.Gör. Sezen CANIM'a

Tez çalışmam süresince yardım, ilgi, ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Arafat MANSUR'a ve biricik oğlum Emir MANSUR'a,

Beni bugünlere getiren ve tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili Annem, Babam ve Kardeşime içtenlikle teşekkür ederim.

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

Zayıf immünojenik özellikli biyomoleküllerin sentetik polielektrolitlerle kovalent konjugasyonunun yapılması, bu biyomoleküllerin immünojenliğinin artmasına neden olmaktadır. Biyokonjugatın yapısında, biyomolekül olarak virüs antijenlerinin kullanılması aşı prototipi geliştirme imkanı vermektedir. Son yıllarda polimer-protein karışımlarının fizikokimyasal analizinin yapılması ve bunlara dayalı polimerik immünojenlerin ve aşılarda geliştirilmesi konusunda birçok çalışma yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında; Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin antijenik özellikli 135-161, 170-188 amino asit dizileri F-moc yöntemi ile sentezlenmiş, akrilik asit içeren polianyonlarla etkileşim mekanizmaları incelenmiştir. Suda çözünür 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür çapraz bağlayıcısı ve mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda bileşenlerinin farklı  $n_{Peptid}/n_{Polimer}$  oranlarında, farklı aktivasyon pH değerlerinde, farklı iyonik şiddette VP/AA-peptid biyokonjugatları sentezlenmiş ve yapı ve karakterizasyonu çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle (HPLC, Dört Detektörlü Viskotek Sistemi -Ultra-viole Visible, Refraktif İndeks, Işık Saçılması ve Viskozite- Flouresans Spektroskopisi) araştırılmıştır. Konjugasyon işleminde peptid oligomerlerinin polimer makromolekülüne kooperatif mekanizma ile bağlandığı bulunmuştur. Farklı metotlar kullanılarak ve bileşenlerinin farklı  $n_{Peptid}/n_{Polimer}$  oranlarında sentezlenen VP/AA-peptid fiziksel karışımları ve biyokonjugatlarının balb/c farelerde immünizasyon işlemleri yapılarak immünoestimule edici (antijenik) aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar fizikokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Tarafımızca ilk kez mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda yüksek verimde sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları, immün sistemi aktifleyerek spesifik immün cevap oluşumunu sağlamıştır. Şap Hastalığı Virüsüne karşı koruyucu özellikleri incelendikten sonra bu VP/AA-Peptid biyokonjugatların 'Polimerik Şap Aşısı' olarak kullanılması ile Türk Sağlık sektörüne ve ekonomisine büyük katkısı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Polielektrolit, biyopolimer sistemler, immünojen, polimer-peptid Konjugat, sentetik aşı, şap hastalığı virüsü (Foot-and-mouth Disease)

## ABSTRACT

Nonimmunogenic synthetic polyelectrolytes (PEs) reveal immunoadjuvant activity in several systems, and their complexes/covalent conjugates induced biomolecules immunogenicity. The use of peptide epitops of virus particles in the composition of such conjugates as vaccine has several potential advantages over whole viral or bacterial preparation. Recently, physicochemical analyses of polymer-protein complexes, polymeric immunogens and their vaccine developments have been studied.

In this thesis study, peptide epitops of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) of VP1 protein both 135-161 and 170-188 amino acid residues were synthesized by using the Fmoc method and were investigated the interaction of peptides with polyacrylic acid. VP/AA-Peptid bioconjugates were synthesized at different ratio of components ( $n_{Peptide}/n_{Polymer}$ ), and pH value of solution in the presence of water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride (WSC) and using Microwave Technology at organic media. These structures of VP/AA-Peptid bioconjugates were investigated by using different physicochemical analyses methods (HPLC, Viscotek-with Ultra-violet Visible, Refractive Index, Light Scattering, and Viscosity Quadruple Detector Systems, Fluorescence Spectroscopy).

It was found that peptide oligomers bind to polymer macromolecules by cooperative mechanism; all added peptide molecules is strongly bound by the polyanion and the existence of the free polymer chains in the system under these conditions obviously indicates a non-random distribution of the peptide molecules between the anionic polyelectrolytes. When peptide molecules are added to activated PEs solutions, one can assume that first the formation of the electrostatic (and hydrophobic) interpolymer-peptide complexes occurs as the most rapidly proceeding process and then the condensation between carboxyl and amino groups of components (covalent conjugation) occurs. The dynamics of peptide-specific antibody formation induced by these conjugates were investigated.

VP/AA-peptide bioconjugates which were synthesized by using microwave technology at organic media, supply to occur immune response. After investigation of protective effect of VP/AA-peptide bioconjugates against FMDV, polymeric FMDV vaccine will provide tremendous improvements public health, veterinary and food economy at Turkey.

**Keywords:** Polyelectrolyte, biopolymer systems, immunogen, polymer-peptide conjugates, synthetic vaccine, foot-and-mouth disease virus

## 1. GİRİŞ

Polimerik biyomalzemeler çok yönlü malzeme gibi tanımlanmakta olup medikal, biyomedikal ve biyoloji alanlarında uygulanmaktadırlar (Tsuruta, 1996; Bamford vd., 1989). Kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği, aşı geliştirme ve hücre üretimi gibi fonksiyonel uygulamalarda kullanılan suda çözünmeyen polimerik sistemlerin yanı sıra suda çözünebilir polimer - biyomolekül konjugatları da enzim kararlılığının artırılması, biyosensör yapımı, DNA'nın hücre içi transferinde ve antijenlerin immünojenliğinin düzenlenmesi amacıyla protein modifikasyonlarında kullanılmaktadırlar (Ogata vd., 1996; Morris vd., 1994; Langer, 1990, 1991; Lee vd., 1977; Abu Chouwski vd., 1977; Mustafaev, 2004). Proteinlerin nötral yapılı sentetik polimerlerle veya sulu ortamda negatif ve pozitif yüklerle yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinilpirilidon, polietilen glikol, dekstran vb.) kovalent konjugasyonu sonucu oluşan biyokonjugatların *in vivo* deneyleri sonucunda bunların doğal protein antijenine kıyasla nispeten daha zayıf immünojen oldukları gösterilmiştir (Mustafaev, 2004, 1996a, 1996b, 1996 d, 1996e, 1996f, 1996h; Başalp, 1996; Özeroğlu, 1996a). Polietilen glikolün (PEG) albumin ve karaciğer katalazı enzimi ile konjugasyonu bu proteinlerin immün reaktifliğini azaltırlar (Özeroğlu, 1996b). İnsulinin PEG ile kovalent konjugasyonu sonucu oluşan konjugatlar ise gıda sektöründe ve ilaç olarak klinikte kullanılmaktadır. Bu tür yapılı polimerler, adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bununla beraber yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitler [(PE) negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilir polimerler], polibazlar polikasyonlar, poliasitler ve bunların kopolimerleri, monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak benzer adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) göstermektedirler (Mustafaev, 2004, 1998, 1996a, 1996b, 1996 d, 1996e, 1996f, 1996h; Kabanov 2004; Başalp, 1996; Güney, 1997; Saraç, 1997a, 1997b; Özeoğlu, 1996b, 1997). Farklı antijenlerin polielektrolitlerle kompleksleri veya konjugatları canlı organizmaya enjekte edildiğinde oluşan özgün antikor sayısı çok miktarda artmaktadır. Yani hastalık yapan virüsün peptid antijenini içeren konjugatlar kullanıldığı durumda kompleksler yada konjugatlar hastalık yapan virüse karşı koruma özelliği göstermektedir, başka bir deyişle bu biyokonjugatlar polimerik aşı gibi davranmaktadırlar (Petrov vd., 1992). Antijenlerin immünojenliğinin polimer makromolekülü ile birleştirildikten sonra iki farklı biçimde düzenlenmesinin fiziko-kimyasal mekanizması, konjugat moleküllerinin hücre yüzeyi membranları ile etkileşime girebilme kuramsal temeline dayanmaktadır (Mustafaev, 2004, 1996a; Petrov 1992).

Klasik aşilar, devamlı hücre kültürlerinde çoğaltılan virüs veya bakterilerin çeşitli yöntemlerle (fiziksel ve kimyasal) inaktive edilmesi ve bir adjuvant (alüminyum hidroksit ve/veya yağ adjuvantı-saponin) ile birleştirilmesi yoluyla hazırlanmaktadır. Söz konusu adjuvantlar varlığında hazırlanan aşiların çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Geleneksel alüminyum hidroksit ve yağ adjuvantlarının yüksek viskozitesi, enjeksiyon yerindeki lokal reaksiyonları, yüksek toksitesi, alerji oluşturma özellikleri ve karışımın stabilitesinin az olması bunların pratikte kullanılmasını engellemektedir. Alüminyum hidroksit genellikle yeterli seviyede immün koruma etkisi de göstermemektedir. Aynı zamanda bu adjuvantlar varlığında antijen formülasyonundaki zorluklar, yapı-işlev ilişkilerinin bilinmemesi, ancak T-bağımlı (T-dependent) immün yanıt oluşturmaları, son yıllarda bir seri yeni türde adjuvantların geliştirmesini gündeme getirmiştir. Son yıllarda sentetik aşı probleminin çözümü için yeni bir yaklaşım sağlamıştır. Doğal olmayan polielektrolitlere karşı (negatif veya pozitif yüklü polimerler) organizmanın immün yanıtının kuvvetli olması, bu PE'lerin mikrop veya virüs antijenleri için taşıyıcı matris (ve adjuvant) olarak kullanılması olanağını sağlamıştır. Polimerlerin immünojenik olmaması, T-bağımlı immün yanıtın T-bağımlı olmayan forma çevrilmesi, ucuz teknolojisi, kolaylıkla modifikasyonu ve amaca uygun formda sentezlenmesi, yeni türde etkili aşiların geliştirilmesi için büyük olanaklar sağlamaktadır.

Farklı protein antijenlerinin belirlenmesi biyokimya, immünoloji ve moleküler biyoloji alanlarında geniş kapsamlı uygulamalara konu olmaktadır. Kısa peptid epitopları immün yanıtın mekanizmasının açıklanması için kullanılabilir (Smith vd., 1977, 1989) ve antikor/antijen etkileşim kompleksinde moleküler tanı olayını araştırma imkanına izin verir (Hinds vd., 1991). Doğal proteinlerin sentetik epitoplarına karşı gelişen antikorların çapraz reaksiyona girmeleri, potansiyel olarak Şap Hastalığı (Foot-and-Mouth Disease-FMD), Hepatit B ve HIV gibi viral hastalıklara karşı kullanılabilen sentetik peptid aşilarının yeni türünün geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, doğal proteinlerin antipeptid antikorlarının çapraz seçiciliği, gen ürünlerinin ayrılmasında ve karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Sentetik oligopeptidlerin virüs partiküllerinin protein yapılarında var olan benzer antijen dizisini taklit edilebilmesi aşı özelliği taşıyabilen peptidlere dayalı immünojenik preparatlar geliştirme imkanı sağlamaktadır. Burada en önemli sorunlardan birisi peptidin önce uygun bir taşıyıcıya bağlanması ve ikinci aşamada ise bir adjuvant ile karıştırılarak organizmaya verilmesidir. Taşıyıcı molekül olarak sentetik polielektrolitlerin (PE) kullanılması klasik yöntemlere kıyasla birkaç potansiyel üstünlük sağlamaktadır. PE'ler peptid molekülü için eş

zamanlı hem taşıyıcı ve hem de adjuvant özelliği göstermektedirler. Biyopolimer sistemlerin tabiatı, genelde içerdikleri polielektrolitlerin ve biyomolekülün kimyasal ve biyolojik özellikleri yanı sıra bunların kompozisyonu, yapısı ve ölçüleri ile idare edilmektedir. Bundan dolayı peptid ve PE arasındaki etkileşimin mikroskobik ölçülerle belirlenmesi ve polikompleksin yapısının anlaşılması, biyopolimer sistemlerin mikroskobik davranışını idare etmek için gerekli olan parametrelerdir. PE'lerin peptidlerle etkileşimi sonucu suda çözünebilen kompleksler, kompleks koaservatlar veya amorfik çökeltiler oluşabilir. Bu şekilde faz değişimleri pratikte biyopolimer sistemlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde büyük potansiyel taşımaktadır. Ayrıca kompleks oluşum yöntemi; polimerin molekül ağırlığına dayanarak suda çözünebilen ve birden fazla sayıda biyomoleküllü (farklı protein antijenleri, haptenler veya protein-hapten karışımları) içeren polifonksiyonel özellikte biyopolimer sistemler geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. Fakat yapılmış polimer sistemler genelde bir antijen ve bir PE makromoleküllü içeren karışımlarda araştırılmış, farklı antijenler (ve antijen-hapten) olduğu durumda bu alanda sistematik incelemeler yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında vinil prilidon akrilik asid kopolimerinin Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 kapsid proteininin peptid epitopları ile kovalent bağlanması sonucu immünolojik özellik taşıyabilen polimer-peptid biyokonjugatlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonrasında vinil prilidon akrilik asid kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 kapsid proteininin peptid epitoplarını içeren polimer-peptid biyokonjugatlarının balb/c farelerde immünizasyon işlemleri yapılarak, immünoestimule edici (antijenik) aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar fizikokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Sentezlenen polimer-peptid biyokonjugatları yeni tür biyopolimerler ve modifiye edilmiş peptidler olarak gerek Polimer Kimyası ve gerekse de Protein Kimyası bilimlerine büyük katkılar sağlayacaklardır. Ayrıca polimer-peptid konjugatlarına dayalı Biyopolimer Sistemlerin oluşum mekanizması ile ilişkili temel bilgiler, gerek biyopolimerlerin canlı organizmada etki mekanizmasının ve gerekse immün sistemin çalışma mekanizmasının fizikokimyasal temelini anlaşılması için önem taşımaktadırlar. Bu tür sistemlerin teorik bir "kimyasal alet" gibi kullanılması ve aşı formülasyonunda yapı oluşumun rolü gibi temel araştırmaların bilime verebileceği katkıların da vurgulanması gerekmektedir.

İmmünojenik polimer-peptid biyokonjugatları klasik aşılarla alternatif nitelikli, etkin ve virüs içermeyen yapay aşıları, teşhis ürünleri ve biyoteknolojik preparatlar geliştirmek açısından önem taşımaktadırlar. Ucuz ve basit bir teknoloji yöntemi ile sentezlenmeleri daha etkin, daha

az riskli ve daha kararlı bir yapıda, uygulamaya aktarılma potansiyeli yüksek ve ekonomiye önemli katkıları olacağı düşünülmektedir.

Şap hastalığına karşı, immünojenik biyopolimer sistemlere dayalı aşuların geliştirilmesi, klasik aşulardan daha etkin ve daha az riskli olacağını düşündürmektedir. Bütünlükle bir alt ünite (subunit) aşı niteliğinde olması, polimer yapıli adjuvantların hazırlanmasının ucuz ve basit bir teknoloji yöntemi ile oluşturulması, klasik aşulardan daha etkin olma olasılığı, aynı zamanda hem virüslerden ve hem de ışınlamadan canlı organizmayı koruma özelliği gösterebilmesi vb. özelliklerden dolayı bu çalışma sonuçlarının tüm Türkiye sağlık sektörüne ve ekonomisine büyük katkısı olacaktır.

Bu çalışma ile nitelik olarak ülkemizin hedeflediği ileri teknolojiye uyum sağlayacak polimer ve protein teknolojisi birlikteliğinde, ileri biyoteknolojik malzemelerin üretilmesine zemin hazırlamıştır. Bu nedenle sunulan tez çalışması, temel bilimler uygulamalı araştırma alanlarını kapsayan disiplinler arası nitelikte geniş spektrumlu bir çalışmadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İmmün Sistem

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

şarbona karşı da bir aşı hazırladı. Ehrlich (1987) antikorların sentezi konusunda ortaya koyduğu teoriye göre, antikor üreten hücreler, yüzeylerinde çok çeşitli yan zincirler bulundurlar ve bunlar hücre içine besin maddelerini almakda görevlidirler. Bu yan zincirlerden biri kendine uyan bir toksik madde ile bloke edilecek olursa hücre buna tepki olarak aynı yan zincirden fazla miktarda üretir. Bunların bir kısmı dolaşımında antikorlar olarak bulunur. Ehrlich, ayrıca antijen-antikor birleşmesini anahtar-kilit ilişkisine benzetmiş ve reaksiyonun kimyasal yapıda olduğunu ileri sürmüştür. Elektroforez ve ultrasantrifügasyonla atılan ilk adımların ardından teknolojiye elde edilen baş döndürücü gelişmelerle (immün elektroforez, immün radyo mikroskopi, doku kültür tekniği, radyoimmünoassay, enzim immünoassay, immün flouresans, immün blotting, moleküler hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, flowsitometri ve diğerlerinin bulunması ve uygulamaya konulması) ve yine moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinde sağlanan ilerlemelerle knock-out transgenik fare modelleri gibi çeşitli genetik manipulasyonlar, uygun yöntemlerle birçok “bilinmeyen”in aydınlığa çıkmasını sağlamıştır (Erganiş ve İstanbuloğlu, 1993).

### **2.1.1 İmmün Sistemde Görevli Organlar**

Lenfoid organlar, immün sistemde yer olan görevli organlardır. İmmün sistemi oluşturan hücrelerin kemik iliğinden çıktıktan sonra olgunlaştığı organlara *birincil*, immün cevabın oluştuğu organlara ise *ikincil lenfoid* organlar denir. Dolaşıma geçen kök lenfoid hücrelerinin T ve B lenfosit şekline farklılaşması birincil lenfoid organlarda; timusta ve mide bağırsak sistemi mukoza, altı lenfoid dokuda fetüsün karaciğerinde olmaktadır. İmmün cevabın oluştuğu ikincil lenfoid organlar ise lenf düğümleri, mukozalara bağlı lenfoid doku ve dalaktır (Özbal, 2000).

#### **2.1.1.1 Birincil Lenfoid Organlar**

##### **Kemik İliği**

Kemik iliği, fetal döneminin 4. ayından itibaren kan hücrelerini yapan ve immün cevapta önemli görevleri olan lenfoid bir organdır.

İmmün sistemin en önemli hücreleri lenfositler olup kemik iliğindeki ortak bir kök hücreden gelişirler. İki tip lenfosit mevcuttur: Hücresel immün cevaptan sorumlu T lenfositler ve antikor oluşturan B lenfositler (humoral immün cevap). Kök kan hücrelerinin farklılaşmasıyla olgunlaşan çeşitli lenfositler ve immün cevapta görevli diğer kan hücreleri, kemik iliğinden periferik kan dolaşımına geçerek ilgili doku ve organlara yerleşmektedir (Özbal, 2000).

**Timus**

Hücresel tip immün cevapta etkili, iki loblu bir organdır. Timusun her bir lobu korteks ve medülla bölgelerinden oluşmaktadır. Timusa gelen öncü hücreler, korteksten medüllaya geçişi sırasında, medullada bulunan epitelooid hücrelerin salgılarıyla olgunlaşarak T lenfosit şekline farklılaşmaktadır (Özbal, 2000).

**2.1.1.2 İkincil Lenfoid Organlar**

İkincil lenfoid organlar; birincil lenfoid organlarda farklılaşan, olgunlaşan ve immünolojik reaksiyonlar için hazır hale gelen olgun T ve B lenfositlerin yerleştiği organlardır. Antijenik uyarım olduğunda bağışık yanıt ikincil lenfoid organlarda gerçekleşir. Kısaca immün hücreler birincil lenfoid organlarda oluşur ve ikincil lenfoid organlarda görev yaparlar (Özbal, 2000).

**Lenf Düğümleri**

Lenf düğümleri, vücudun çeşitli yerlerinde çevreden gelen lenfatik damarların boşaltım yollarında bulunur. Lenf düğümlerinin etrafında bağ dokusundan yapılmış bir kapsülü ve kapsül uzantılarıyla ayrılmış lobları vardır. Bir lenf düğümü hilus, korteks, medülla ve parakortikal bölgelerinden oluşmaktadır (Özbal, 2000).

**Mukozalara Bağlı Lenfoid Doku**

Gastrointestinal, solunum ve ürogenital sistem mukozalarının altındaki bölgelerde kapsülsüz olan yaygın lenfoid dokuya mukozal immün sistem denilmektedir. Mukozal immün sistem, infeksiyon etkenlerine karşı koruyucu özelliğe sahip ve ikincil lenfoid doku gibi görevi olan bir sistemdir (Özbal, 2000).

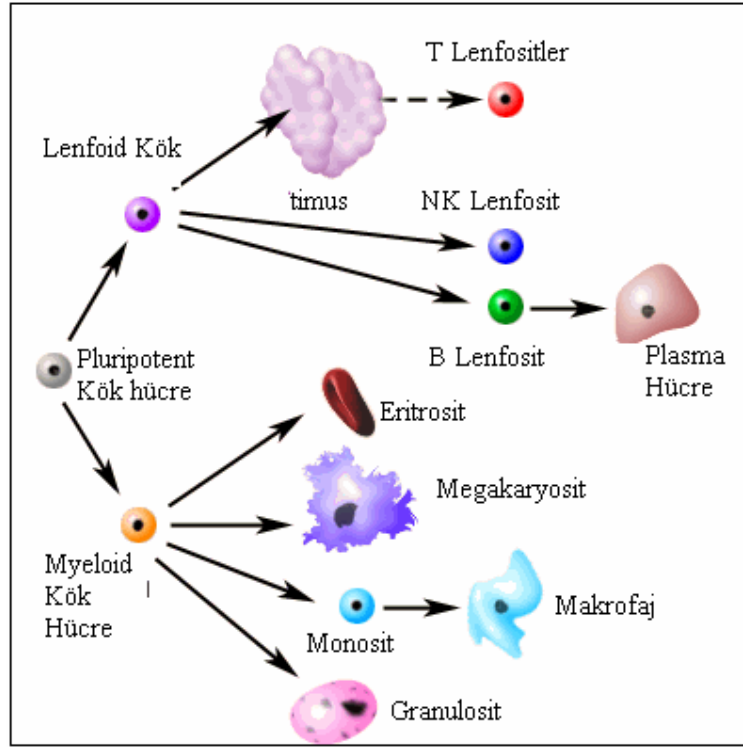
**Dalak**

Dalak, damar içi yoluyla verilen antijenlere karşı immün cevap oluşumunda ve eritrosit yıkımının temizlenmesinde etkili organdır (Özbal, 2000).

**2.1.2 İmmün Sistemde Görevli Hücreler**

Kan hücreleri doğumdan önce karaciğerde, doğumdan sonra kemik iliğinde yapılmaktadır. Omurgalıların immün sisteminde, kan ve dokularda bulunan üç ayrı hücre grubu görev yapmaktadır. Bunlar; lenfositler, monositler ve polimorfonükleer granülositlerdir. Bu hücrelerin bir kısmı konağa giren antijen özelliğindeki molekülleri fagosite eder. Diğer bir kısmı, antijenin uyarımıyla farklılaşarak onlara karşı immün cevap ürünleri çıkarmakta ve

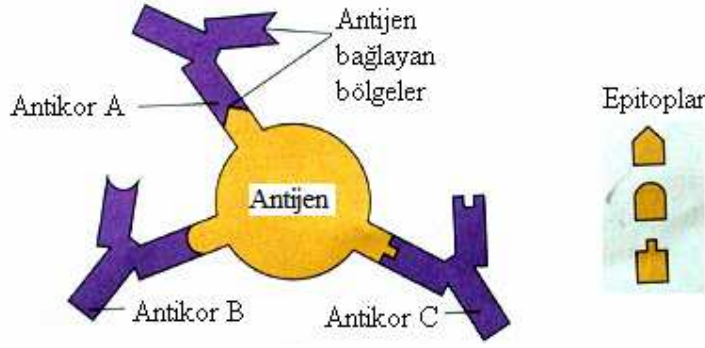
antijenleri yok etmektedir (Özbal, 2000).



Şekil 2.1 İmmün Sistemde görevli Hücreler (Tetikurt, 2006)

### 2.1.3 Antijen

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



Şekil 2.2 Antijen molekülü [1]

### 2.1.3.1 Antijen Molekülleri ve Özellikleri

Konak organizmaya yabancı bir molekülün antijen olarak girmesi, lenfositler tarafından tanınması ve lenfositlerde immün cevaba yol açacak uyarımı yapması için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Antijen niteliği taşıyan moleküllerin her canlıdaki uyarımlar farklıdır. Kimyasal bir molekülün antijen olabilmesi için sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır (Özbal, 2000).

### 2.1.3.2 Antijen Olabilme Özellikleri

#### Yabancılık

Bir kimyasal maddenin antijen olabilmesi için ilişki kuracağı canlının kalıtsal olarak yapısına yabancı olması gereklidir. Yabancılık, molekülü oluşturan kimyasal birimlerin diziliş farklılığından ve üç boyutlu duruşundan kaynaklanmaktadır. Türler arasındaki yakınlık, antijen benzerliği yönünden de yakınlığı gösterir (Özbal, 2000).

#### Molekül Yüzey Yapısı

Bir kimyasal maddenin yüzeyindeki her determinant antijenik etki göstermez. Bir antijen molekülünün bir bölgesi antijenik determinant olarak görev yapıyor ve immün cevap oluşturuyor ise, bu tip antijenlere “**immünopotans antijenler**” denir. Antijenik uyarımı yapabilen determinantlar, **immünodominant** determinantlardır. Farklı amino asitlerin peptidleşmesi ile oluşan antijenler kuvvetli antijenlerdir.

Lenfositlerin; antijen yüzeyindeki determinantların kimyasal yapısı ile etkileşmesiyle, antijenin her bir determinantına özgü immün cevap oluşmaktadır. Antijenin determinantlarını oluşturan moleküller aynı olsa bile, moleküllerin sıralanışında farklı diziliş gösterenler,

immün sistemi farklı uyararak değişik özgüllükte immün cevaba yol açarlar. Lizin, alanin, glutamik asit, tirozin gibi amino asitlerin eklenmesi ile antijenite artar ve bu moleküllerin farklı dizilişleri ile antijenik özellik de değişmektedir (Özbal, 2000).

### **Molekül Ağırlığı**

Bir organizmaya yabancı determinant grubu olan bir maddenin molekül ağırlığı ( $M_A$ ) 5 kilo dalton (kDa)'dan az ise çok zayıf antijenite gösterir. Bir adjuvantla birleşmiş molekül ağırlığı 14 kDa olan bir molekül zayıf, molekül ağırlığı 40 kDa olan bir molekül orta, molekül ağırlığı 500 kD olan bir protein veya polipeptid-karbohidrat molekülü çok iyi bir antijendir. En kuvvetli antijenler molekül ağırlığı 100 kDa'dan büyük olan protein ve protein bileşikleridir (Özbal, 2000).

### **Molekülün Çözünürlüğü ve Sertliği**

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

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

### **2.1.4 İnfeksiyonlara karşı Defans Mekanizmaları**

İmmün sistemin primer görevi organizmayı enfeksiyonlara karşı korumasıdır. *Doğal immünite* eski bir savunma sistemi olup farklı türlerde büyük oranda korunmuştur. Başlıca fagositik hücreler, kan proteinleri ve natural killer hücrelerden oluşur. Savunma mekanizması, farklı patojenlerde ortak olan tipik moleküler yapıların tanınmasına dayalıdır. *Adaptif immünite* ise patojenlerin belli bölgeleri (epitoplar) için ileri derecede spesifik reseptörlerin

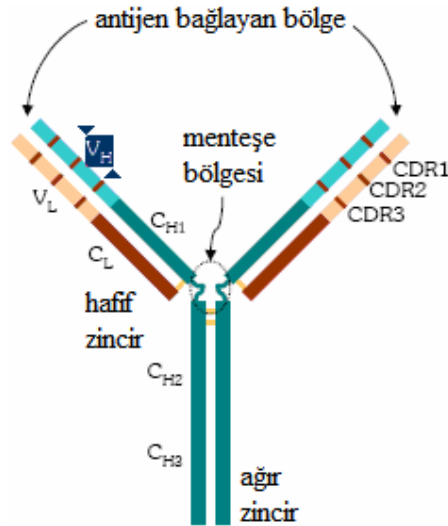
varlığına bağlıdır. Bu reseptörler ya hücreye bağlıdır (T lenfositler ve bazı B lenfositler) ya da sekrete edilirler (Özbal, 2000).

### 2.1.5 İmmüoglobulinlerin Yapısı

İmmüoglobülinler (Ig), yabancı antijenlere karşı oluşan, onları selektif olarak tanıyan ve antijenlerle reaksiyona girebilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Esas itibariyle antikor özelliği taşırlar ve plazma hücreleri tarafından sentezlenirler. Ancak immüoglobulinlerin tümü antikor değildir ve total plazma proteinlerinin %20'sini oluştururlar.

Bir İmmüoglobülin molekülü, monomer adı da verilen en az bir bazik ünitenden oluşur. Monomer ise 450 aminoasidden oluşan, molekül ağırlığı fazla bir çift ağır (H) polipeptid zinciri ile 212 amino asidden oluşan ve molekül ağırlığı daha az olan bir çift hafif (L) polipeptid zincirinden oluşur. Bu zincirler birlikte, Y harfine benzeyen bir yapı oluştururlar (Özbal, 2000).

H ve L zincirlerinde bir amino bir de karboksi terminal ucu bulunur. Aminoasitlerin diziliş sırası büyük değişkenlik (heterojenite) gösterebildiğinden, aminoterminal kısma değişken bölge (V) denir. Bu değişkenliğin görülmediği karboksi terminal kısım ise sabit bölge (C) olarak adlandırılır. İmmüoglobülini oluşturan polipeptid zincirleri birbirine disülfid bağları ile bağlı bulunurlar (Özbal, 2000).



Şekil 2.3 İmmüoglobülinin şematik yapısı (Rossman, 1972).

### 2.1.6 Antikorların Fonksiyonları

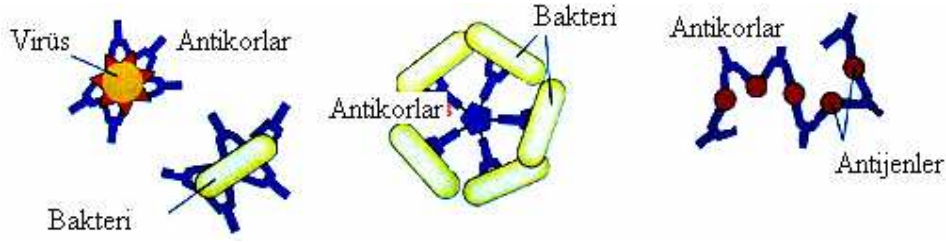
Antikor moleküllerinin çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Bunlar;

- a) Antijen ile immün kompleksler oluşturarak antijenlerin fagositoz ile dolaşımdan kaldırılmalarını sağlamak;
- b) Enfeksiyon etkilerini aglütine ederek hareketsiz bırakmak ve fagositoza hazırlamak (opsonizasyon);
- c) Toksinleri ve viral etkenleri nötralize ederek zararsızlaştırmak;
- d) Komplemanı aktive etmek;
- e) Mikroorganizmaların mukoza yüzeylerine aderans ve kolonizasyonlarını inhibe etmek;
- f) Zararlı bazı makromoleküllerin gastrintestinal mukozadan absorpsiyonlarını engellemek;
- g) Antikora bağımlı hücrel immünitede görev almak (spesifik IgG moleküllerinin bağlanmış hedef hücrelerin, IgG Fc reseptörü taşıyan öldürücü hücreler tarafından lizisi)

### 2.1.7 Antijen-Antikor Reaksiyonları

Antijenle antikorun birleşmesi spesifik ve selektif bir olaydır. Çünkü belli bir antikor, değişik antijenler karşısında selektif olarak sadece kendisine uyan antijenle birleşmektedir. Antijenle antikor arasındaki birleşme kovalent bağlar aracılığı ile değil, elektrostatik, kulombik, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları gibi nispeten zayıf etkileşimlerle sağlanırlar. Bu iki molekül arasındaki bağın gücünü, antijenin birleşme yeri ile antikorun bağlanma yeri (paratop) arasındaki sıkı temasın genişliği belirler. Bu birleşme, iki molekül arasındaki “afinite” (karşılıklı ilgi) oranında süratli ve güçlüdür. İmmün kompleksi oluşturan antijen antikor moleküllerin birbirlerinden tekrar ayrılmalarına karşı koyan güce, molekülün “avidite”si denmektedir. Zayıf aviditeli antikor molekülleri, antijenle birleştikten sonra, nispeten kolaylıkla ayrılabilirler. Antijenler multivalent (birden çok birleşme bölgesine sahip) oldukları için, bir antijen molekülü, birçok molekülü bağlayabilir. Böylece bir karışımda antikor ve antijen moleküllerinin değişik oranlarda yer aldığı immün kompleksler oluşur. Her bir antijen molekülünün birden fazla antikor (Ab) molekülünü bağlaması durumuna veya her bir antikor molekülünün birden fazla antijen (Ag) molekülünü bağlaması durumuna göre değişik Ab-Ag agregatlarının oluştuğu gösterilmiştir. Ab/Ag oranının birden büyük olduğu

(Ab/Ag=3,4,5....) komplekslere *antikor fazlalığı taşıyan kompleksler*; Ab/Ag oranının bire çok yakın veya birin altına indiği komplekslere de *antijen fazlalığı taşıyan kompleksler* denir.



Şekil 2.4 Antijene spesifik antikor molekülleri [2]

Antikor fazlalığı taşıyan kompleksler kolay çökerler ve çökelti oluştururlar. Antijen fazlalığı taşıyan kompleksler ise küçüktürler ve çökelti oluşturmaz (çözünür kompleksler) antijen ve antikor yoğunluğuna göre immün komplekslerin büyüklüğü hakkında fikir verilmektedir (Roitt vd., 2002).

Antijen ile antikor arasındaki reaksiyon uygun serolojik (immünolojik) testlerle gösterilebilir. Her serolojik testin ölçebileceği ve duyarlı olduğu antikor ya da antijen miktarı sınırlıdır ve farklıdır.

### 2.1.8 Antijene Karşı Primer ve Sekonder Antikor Cevapları

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

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

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

sürdürülebilir. Antijenler “adjuvant” denen bir takım maddelerle birlikte enjekte edildikleri takdirde, spesifik antijene karşı organizmada daha güçlü bir immün yanıt oluşturabilirler. Genellikle fosfat ve aliminyum hidroksit gibi mineral tuzları; içinde öldürülmüş mikrobakteri bulunan madensel yağ-su emulsiyonları (Freund’un komplet adjuvanı) adjuvan olarak sıklıkla kullanılırlar. Bunlar antijeni enjekte edildiği yerde daha uzun süre tutmak suretiyle, immün sistemi uzun süreli stimüle ederek antikor cevabını büyütürler.

Bazı hallerde primer antijenik stimulus immün mekanizmada öyle değişiklik yapabilir ki, ikinci stimulus tam tersine, zayıf immün cevap veya cevapsızlık oluşturabilir. Bu bir “negatif” bellek örneğidir ve “kazanılmış immün tolerans” olarak ta isimlendirilir (Özbal, 2000).

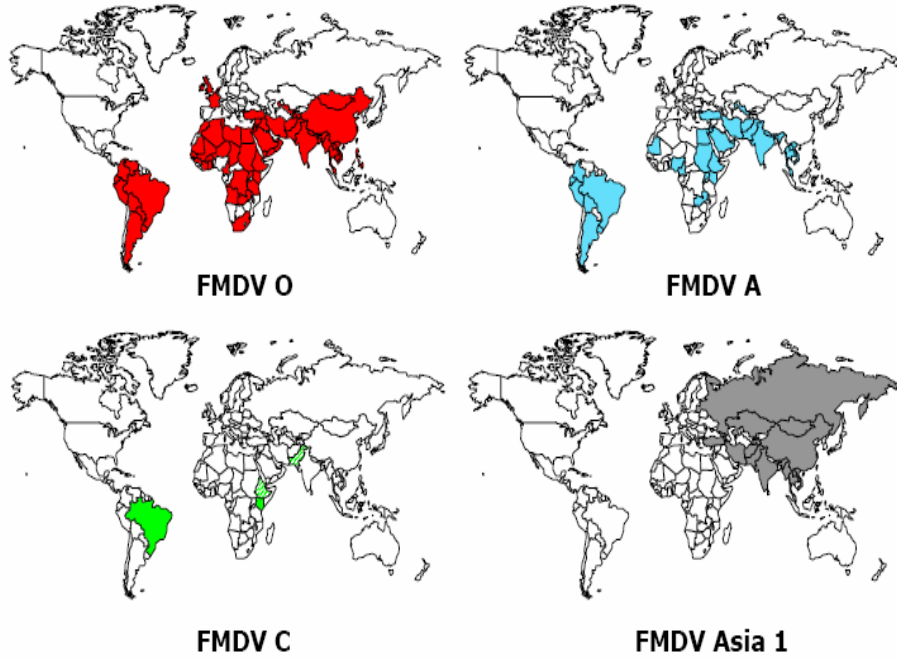
## 2.2 Şap Hastalığı

Şap hastalığı, halk arasında tabak hastalığı olarak bilinen, bütün çift tırnaklı hayvan türlerinde görülebilen bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık için; Aft Humması, ayak-ağız hastalığı (foot-mouth disease) isimleri de kullanılmaktadır [3].

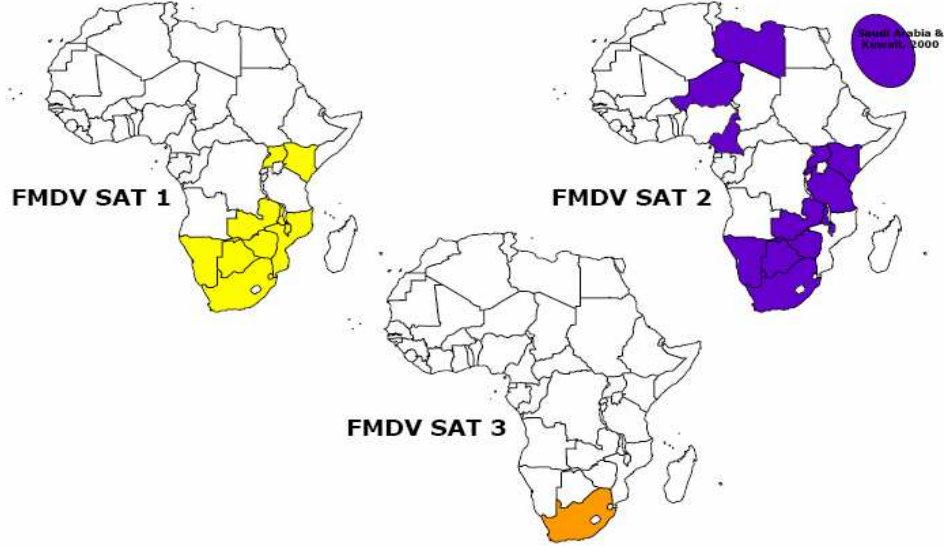
Şap hastalığı sığır, manda, koyun, keçi ve domuzlarda olduğu gibi, vahşi hayvanlarda da görülebilen oldukça enfeksiyöz bir hastalıktır. Şap hastalığı etkeni olan ve *Picornaviridae* familyasından Aphthovirüs genusuna ait virüsün, immünolojik olarak ayırt edilen yedi serotipi (O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Asya 1) vardır. Hastalık ayakta ve ağız çevresinde vesiküller oluşturur ve genç hayvanlarda ise kalp yetmezliği nedeniyle ani ölümlere neden olur. Duyarlılık az olduğu için hastalık da oldukça seyrek görülür. İnsanlar, hasta hayvanların deri veya ağız mukozası ile temas ederek, yeterli ısı işlemi uygulanmamış (iyi pastörize edilmemiş) enfekte sütleri içerek, çiğ süttten üretilen ve olgunlaştırılmayan peynirleri yiyerek, yine yeterli ısı işlemi uygulanmamış ve pH’sı düşmemiş etleri tüketerek enfekte olabilirler. Hastalık insandan insana geçmemektedir. İnkübasyon süresi 2-6 gün kadar olup, ateş, yorgunluk, keyifsizlik, kollarda ve bacaklarda ağrılar dikkati çeker. Ağız mukozası kızarıklıkla beraber ağızda, gırtlakta ve dudaklarda vezikül benzeri ağrılı kesecikler oluşur. Bu oluşumlara daha çok, hasta hayvanlarla direkt temasta bulunan hayvan sahiplerinin ellerinde, ayaklarında ve genellikle de parmak uçlarında rastlanır. İnsanlarda prognoz iyidir ve iyileşme 5-10 gün içerisinde görülür. Şap hastalığı, bir halk sağlığı problemi olarak görülmemektedir [4].

### 2.3 Şap Hastalığının Dünyadaki Durumu

Hastalık 19. yy. boyunca Avrupa, Asya, Afrika, Kuzey ve Güney Amerika da yaygın olarak Avusturalya da ise yalnızca bir kez görülmüştür. Endüstriyel çiftçiliğin gelişmesi şap hastalığı üzerine dikkatlerin toplanmasına yol açmış ve hastalığın sonuçları akut hastalıktan daha önemli bulunmuştur. Hastalık sütçü sürülerde süt verimi periyodunun duraklamasına, süt üretiminin % 25 civarında azalmasına, etçi sürülerde ise gelişmenin gecikmesine yol açmaktadır. Çeşitli ülkelerde enfekte hayvanların kesimi veya etkili aşılama programları ile hastalık eradike edilmiştir. Ancak Amerika, Avusturalya, Yeni Zelanda, Japonya ve Avrupa ülkeleri dışında tüm dünyada hastalığın endemik olarak seyretmesi sonucunda hiçbir ülke şap hastalığına karşı güvende bulunmamaktadır. Avrupa kıtasında 1991 ve 1993 yılında Bulgaristan'da , 1994 yılında Yunanistan'da, 1995 yılında Rusya'da, 1996 yılında Rusya ve Makedonya'da, 1993'te İtalya'da O tipi, 1996'da Arnavutlukta A tipi şap hastalığı sporadik olarak görülmüştür. 2001'de İngiltere'de görülen ve 1997'de Taiwan'da şap hastalığına yol açan virüs ile aynı olduğu açıklanan O tipi şap virüsü Avrupa kıtasında hızla yayılmaktadır. Bu virüs yurdumuz da görülen O tipi şap virüsünden farklıdır. Afrika kıtasında O, A, C, SAT I, ve SAT 2 serotipleri salgınlara yol açmaktadır. Ortadoğu, Hindistan ve Uzakdoğu'da ise O, A ve ASIA serotipleri görülmektedir [5].



Şekil 2.5 Şap Hastalığı Virüsünün ASIA serotipinin 2000-2006 yılları arasındaki dünyadaki durumu [6]



Şekil 2.6 Şap Hastalığı Virüsünün SAT serotipinin 2000-2006 yılları arasındaki dünyadaki durumu [6]

### 2.3.1 Türkiye’de Şap Hastalığının Durumu

Yurdumuzda şap hastalığı ile ilgili ilk istatistiki bilgilere 1914 yılında yayınlanan Ziraat İstatistik Dergisinde rastlanmaktadır. Hastalık hakkındaki geniş bilgi ve kayıtlara ise 1957 yılından sonra rastlanmaktadır. 1957 yılında görülen büyük şap salgını takiben; 1958 yılında Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü bünyesinde geçici bir şap laboratuvarı ve daha sonra 1967 yılında Şap Enstitüsü kurulmuştur. Ülkemizde görülen şap virüsü tiplerinin belirlenmesi, bu tiplere karşı aşı üretiminin yapılması, bağışıklık düzeyinin belirlenmesi ve şap hastalığı ile ilgili araştırma ve eğitim çalışmaları Şap Enstitüsünce yürütülmektedir. Ülkemizde 1957 yılındaki büyük salgına O tipi şap virüsünün yol açtığı bildirilmiştir. 1962-1965 yılları arasında O<sub>1</sub>, SAT<sub>1</sub> ve A<sub>22</sub> tipi şap virüsleri salgınlara yol açmıştır. 1973-1978 arası görülen ASIA1 tipi şap salgınlarına daha sonra 1983-1985 arası rastlanmıştır. 1985'den sonra ise O<sub>1</sub> ve A<sub>22</sub> tipleri görülmüştür. Ancak 1997 yılında İran'dan yurdumuza yeni bir A tipi girmiş ve A<sub>22</sub> tipine karşı dominant özellik kazanmıştır. 1999 yılında ise ASIA1 tipi şap virüsü yurdumuza girmiştir. Şu anda O<sub>1</sub>, A İran ve ASIA1 tipi şap virüsleri ülkemizde şap hastalığına yol açmaktadır. Ülkemizde şap hastalığı ile mücadelede aşılama ve karantina yöntemi kullanılmaktadır. Ancak hayvan hareketlerinin çok fazla oluşu, doğu ve güneydoğu sınırlarımızdan kaçak hayvan girişleri, endüstriyel hayvancılığa geçilememesi ve çiftçimizin yeterince bilinçlenmemiş olması mücadeleyi güçleştirmektedir [5].

### 2.3.2 Hastalığın Yayılışı

Hayvanlar arasında çok bulaşıcı olan hastalık, enfekte ya da kontamine hayvanlar, ürünler, nesnelere ve insanlar aracılığı ile yayılır. Virüs ile kontamine materyaller, meralar, yemler, sular, rüzgar, enfekte çift tırnaklı hayvanlar, sinekler ve hayvan bakıcıları hastalığın bir bölgeden başka bir bölgeye yayılmasında önemli rol oynarlar. Panayır, pazar, göçler ve kurbanlık hayvan hareketleri, hastalıklı bölgeden hayvan ürünlerinin çıkartılması, taşıma araçları şap virüsünün bölgeden bölgeye, hatta bir ülkeden diğer ülkeye yayılmasına neden olurlar. Bu nedenle hastalığın denetiminde, karantina önlemleri, taşımanın önlenmesi ile dezenfeksiyonun önemli yeri vardır. Şap Hastalığının en önemli epidemiyolojik özelliklerinden biri de virüsün hava yoluyla kilometrelerce uzaklara kadar taşınarak yayılmasıdır. Hava yolu ile yayılmada önemli etmenler rüzgarın yönü ve hızı, hava sıcaklığı ve havadaki nem oranıdır. Şap virüsünün uygun hava koşullarında, % 60'ın üzerinde nem oranı ve 21-27 °C hava sıcaklığında, 100 km uzaklığa kadar taşınabileceği bildirilmiştir [7].

### 2.3.3 Şap Hastalığı Virüs Yapısı

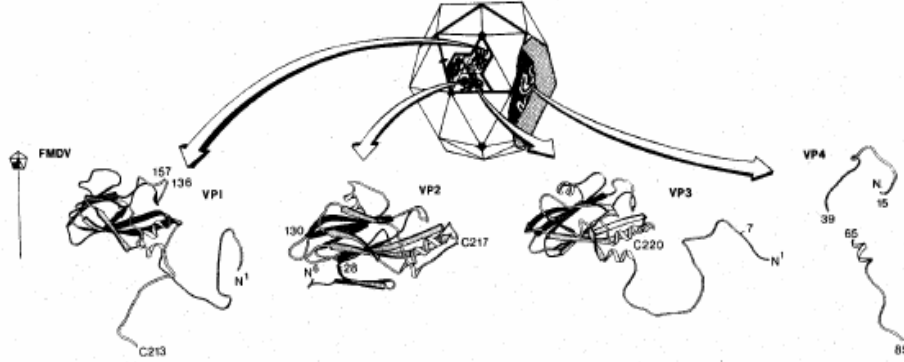
Viral partikül yada virion yaklaşık 8500 nükleotid uzunluğunda pozitif yüklü tek bir RNA zinciri içerir. Bu RNA molekülü küçük bir protein olan VPg'ye kovalent olarak bağlanır. Virüs kapsülü zarfsızdır ve VP1, VP2, VP3 ve VP4 yapısal proteinlerinin 60 kopyasını içeren yaklaşık 300 Å çapında isohedral simetriye sahiptir. İlk üç yapısında proteinler (Mw~24 Kilodalton-kDa) yüzey komponentlerini oluştururken, dördüncü yapısında ise (Mw~8,5 kDa) bu komponentler iç kısımda yer alır (Acharya vd., 1989; Domingo vd., 1992).



Şekil 2.7 Şap Hastalığı virüsünün C-S8c1 protomerinin ribbon protein diyagramı VP1-mavi, VP2-yeşil ve VP3-sarı kapsid proteinlerin birleşmesinden oluşur [8].

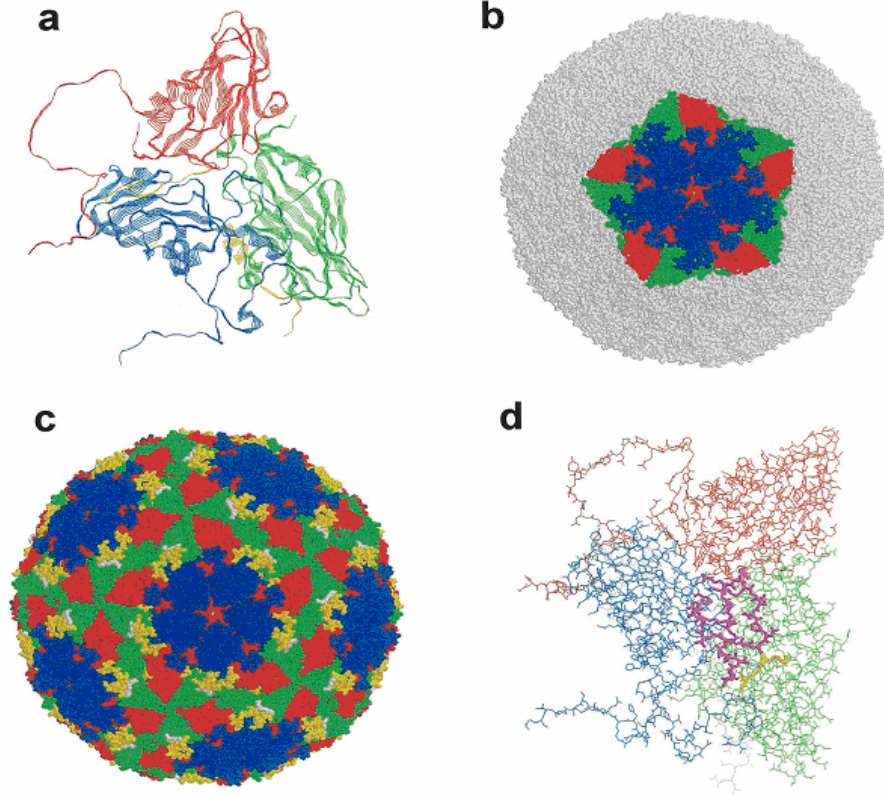
Şap hastalığı virüs partikülünün yapısı ilk olarak O<sub>1</sub> BFS 1860 serotipi için X-ışın difraksiyon analizi ile aydınlatılmıştır (Acharya vd., 1989). Bunun ardından, şap hastalığı virüsünün diğer serotipleri de kristalize edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Virüsün fenotipik ve serolojik

(immünolojik ve antijenik) özellikleri araştırılıp açıklanmıştır (Parry vd., 1990; Curry vd., 1992; Logan vd., 1993; Lea vd., 1994).



Şekil 2.8 Şap Hastalığı Virüsü ve kapsid proteinlerin (VP1-4) Yapısal Gösterimi (Acharya vd., 1989)

Virüsün dış yüzeyi küresel, 25 nm çapında ve oldukça düz yapıdadır. Virüs isohedral simetriye sahiptir (Şekil 2.9) ve her bir asimetrik ünite (patikülün 1/12'si) virüsün biyolojik protomerlerinin beş kopyasının birleşmesiyle oluşan bir pentamer yapıdır (Acharya vd., 1989; Parry vd., 1990; Curry vd., 1992; Logan vd., 1993; Lea vd., 1994). Virüsün yapısal proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3; kapsid yapının çoğunluğunu oluşturmak amacıyla bir araya gelerek 8-zincirli, takoz-biçimli,  $\beta$ -barrelerden ( $\beta$ -katlanmış yapının kapanması ile oluşan yapı) oluşan yapının içe katlanmış şeklidir (Şekil 2.10a). Kapsidin içine gömülü olan VP4 proteini ise miristil (Myristyl) bir gruba sahiptir ve bu grup proteine N-terminal uç kısmından kovalent olarak bağlanmıştır (Chow vd., 1987; Belsham vd., 1991). VP1, VP2 ve VP3'ün  $\beta$ -barrel zincirleri virionun dış yüzeyini oluşturan ilmiklerle birbirine bağlanmıştır (Şekil 2.10a). Şap hastalığı virüsünün diğer picornovirüslerden ayıran özellikleri şunlardır: 1- yüzey kanyon veya çukurlarına sahip olmaması, (Hogle vd., 1985; Rossmann vd., 1985; Luo vd., 1987; Muckelbauer vd., 1995; Kolatkar vd., 1999; Belnap vd., 1999; Zuccola vd., 2000. He vd., 2000; Xiao vd., 2001). 2- isohedral yapının beşli ekseninde küçük moleküllerin (örneğin; CsCl) girişine izin veren kanalların bulunması ve 3- virüs kapsidine ait 12S pentamerik alt ünitenin 6,5 altındaki pH değerlerinde ayrışmasıdır (Brown ve Cartwright, 1961). VP1 ve VP2 kapsid proteinlerinin ara yüzeyinde bulunan ve düşük pH değerlerinde proton alarak pozitif hale geçen histidin kalıntılarının gruplaşmasından dolayı bu ayrışmanın olduğu düşünülmektedir (Curry vd., 1992; Ellard vd., 1999). Ayrıca düşük pH değerlerinde kararsız bir yapıya sahip olması virüsün bulaşma mekanizmasının diğer picornovirüslerden farklı olmasına neden olmaktadır.

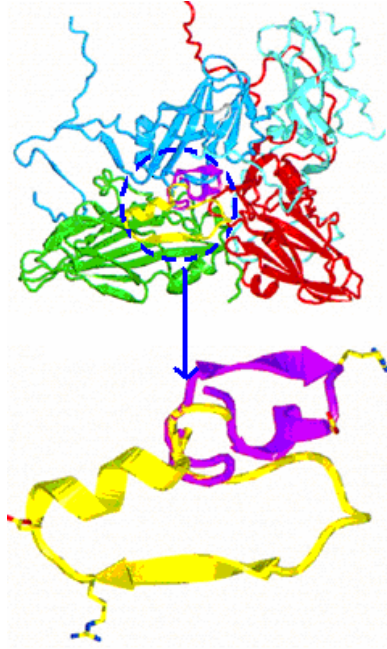


Şekil 2.9 Olgun tip O<sub>1</sub>BFS Şap Hastalığı Virüsü virionunun X-ışın kristalografisi verisine dayalı yapısı. Bu yapılar Acharya, (1989) ve Logan, (1993) tarafından gösterilmişlerdir. (a) Bir biyolojik protomerde viral proteinlerin  $\beta$ -barrel ve ilmik organizasyonunun gösterimi (b) Pentamer konumlanmış virionunun beşli eksenine aşağıdan bakış (c) Tüm bir virion, G-H ilmeği (sarı) ve RGD dizisi (beyaz) (d) Bir protomerde G-H ilmeğinin (mor), RGD dizisi (sarı) gösterimi Tüm bunlar olgun virüse aittir. Viral proteinler mavi renkli olan VP1'e, yeşil renkli VP2'ye, kırmızı renkli VP3'e karşı gelmektedir. VP4 partikülün içine gömülüdür.

### 2.3.4 Şap Hastalığı Virüsünün Antijenik Yapısı

Şap hastalığı virüsünün hücreyle etkileşime giren kısmı ve immünodominant bölgesi virionun yüzeyinde çözücüye karşı korunaksız bir bölgede (yani VP1'in tripsine hassas bölgesinde) yerleşmiştir (Laporte vd.,1973; Cavanagh vd.,1977). Yapılan serolojik çalışmalarla şap hastalığı virüsün en önemli antijenik bölgesi olan VP1'in (135-155 dizisini kapsayan), virüsünün farklı serotiplerinde dahi ortak olduğu bulunmuştur (Strohmaier vd., 1982). Bir çok B-hücre epitopları bu bölge içerisinde bulunmaktadır ve bu bölge hem nötralize hem de nötralize olmayan antikor cevaplarına neden olmaktadır (Strohmaier vd., 1982; Cheung vd.,1983; Oulridge vd., 1984; Beck vd.,1983; Grubman vd., 1987). Şap hastalığı virionun yüzeyinde yer alan antijenik bölgeler virüsün (Güney Afrika Bölgesi) farklı serotipinin yalnızca beşi için aydınlatılmıştır (Baxt vd., 1984, 1989; McCullough vd., 1987; Xie vd., 1987; Thomas vd., 1988; Bolwell vd., 1989; Haydon vd., 1998; Kitson vd., 1990; Crowther

vd., 1993; Lea vd., 1994; Mateu vd., 1995; Marquardt vd., 2000). Dört antijenik bölge tanımlanmıştır. Kapsid proteinleri yani VP1, VP2 ve VP3 bu antijenik bölgelerin bir veya daha fazlasını içermektedir. Bununla birlikte, her bir serotip bu dört antijenik bölgeyi içermeyebilir. İlginçtir ki; küçük birimlerden oluşan bu antijenik bölgelerden üçü viral proteinlerin  $\beta$ -tabakalarına bağlanan esnek ilmeklerin içerisine yerleşmiştir. VP1'in C-terminalini en az iki antijenik bölge içerir. Bütün bu bölgeler hem hastalık bulaştığında hem de aşılama sonucunda oluşan immünolojik cevap için gerekli görülmektedir. VP1'in GH ilmeği içerisinde yerleşmiş olan antijenik bölge farklı 7 serotipte de ortak olan kısımdır (Şekil 2.10d) (Borrego vd., 1995; Mateu, 1995). Bu bölge ayrıca RGD reseptör bağlama bölgesini tanıyan diziyide içerir.



Şekil 2.10 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 proteinin GH lobunun lokalizasyonu (yukarı) ve bu lobun konformasyonunun detaylı gösterimi (aşağıdaki) – Sarı; O1 BFS izole edilen, eflatun; C-S8c1 den izole edilen (Hewat vd., 1997)

### 2.3.5 Şap Hastalığı Virüsünün Hücre Tutucu Bölgeleri: Arg-Gly-Asp motif

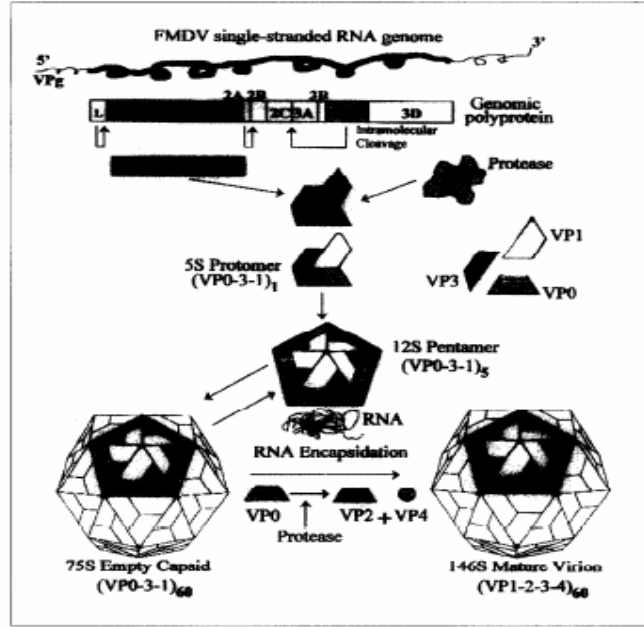
Yüzey geometrik şekilleri, amino asit dizilerinin korunması ve farklı picornovirüslerin hücre tutunan bölgelerinin inhibisyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar “bu patojenlerin çoğunun immün sisteminin hücrelerine tutunan bu bölgelerini saklamayı amaçladığını” göstermiştir. Öyle ki; bu bölgeler genellikle kanyonlar ya da oyuklar içerisine yerleşmişlerdir (Chapman vd.,1993). Pürüzsüz Şap Hastalığı virüsünün yüzeyinde herhangi bir benzer kanyon yada çukur olmadığından VP1'nin yüksek oranda değişkenlik gösteren GH

ilmeği içerisinde Arg-Gly-Asp (RGD) (yüksek derecede korunmuş) amino asid dizisinin varlığı bu dizinin hastalığın bulaşmasında anahtar role sahip olduğu şüphesini uyandırmaktadır (Hynes, 1992; Fox vd., 1989; Verdaguer vd., 1995,1996; Mateu vd., 1996; Novella vd., 1993; Berinstein vd., 1995). İmmünokimyasal ve yapısal çalışmalar, virüsün RGD dizisinin, konak hücrenin vitronektin reseptörlerine integrin  $\alpha v \beta_3$  aracılığıyla tutunarak şap hastalığı virüsünün enfektivitesinde kritik role sahip olduğunu göstermiştir (Cavanagh vd., 1997; Sevilla vd., 1999). Şap hastalığı virüsünün korunmasız bölgesinde yerleşmiş bulunan RGD dizisi farklı serotiplerde dahi korunmuş olarak bulunmaktadır. Virüsün, konak organizmada antikor netrülizasyonundan korunma mekanizması RGD üçlü amino asid dizisinin açık-dönüşüm konformasyonunu koruyan ve güç fark edilen yapısal modifikasyonlar içermesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.10). Bu veriler ışığında, şap hastalığı virüsünün konak hücre ile internalize olmasında; RGD dizisinin mümkün olan tek yol olmadığı söylenmektedir (Ruiz-Jarabo vd., 1999; Mason vd., 1993, 1994; Jackson vd., 1996; Sá-Carvalho vd., 1997). Gerçekte, şap hastalığı virüsünün hücre tarafından tanınmasının en az 3 farklı mekanizmayla gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlardan birincisi; Predominant hücre yüzey ligandı olarak heparan sulfat (HS) aracılığıyla (örneğin; Şap hastalığı O<sub>1</sub> virüsünün bazı zincirleri, hücre kültürüne-adapte olan virüslerdir), ikincisi; RGD-ve-HS-bağımsız olarak hücre Şap hastalığı virüsünün antikordan-bağımsız artışı yoluyla ve üçüncüsü; şap hastalığı virüsünün Fc reseptörleri aracılığıyla hücre içerisine girip virüse-spesifik antikora bağlanması ile (RGD mekanizmasını pas geçerek) gerçekleşmektedir (Mason vd., 1993; Ruiz-Jarabo vd., 1999).

### 2.3.6 Şap Hastalığı Virüsünün Genetik ve Antijenik Değişkenliği

RNA virüsleri hataya-eğilimli RNA replikasyonu ile karakterize edilir. Şap hastalığı virüsünün genomu farklı serotipler arasındaki dizi homolojisi % 25-40 iken, aynı serotipin farklı alt tipleri arasında ki homolojisi % 60-70 den fazladır. Bir salgın sonucu oluşan şap hastalığı virüsünün doğal popülasyonlarında heterojenite görülmüştür. Bununla birlikte 'kişisel' izolatlarda iki farklı nükleotid dizisi içerdiği rapor edilmiştir. Replikasyon sürecindeki yüksek mutasyon oranı şap hastalığı virüsüne; gelişme ve yeni ortamlara adaptasyon imkanı sağlamaktadır. Tüm mutasyonların zararlı olmasına ve doğal seleksiyon (negatif seleksiyon) ile elemine edilmesine rağmen, bazı mutasyonlar virüsün replike olduğu özel durumlarda pozitif seleksiyon ile gerçekleşebilir (Sevilla vd., 1996; Domingo vd., 1996; Charpentier vd., 1996; Martínez vd., 1997) Şap hastalığı virüs popülasyonu yüksek heterojeniteye sahip olmasına rağmen, yapının devamlılığının sağlanması amacıyla virüs uzun

süre dizilerini koruma özelliğine sahiptir. Bu durum bozulduğunda ise hızla bir evrim gerçekleşir ve yeni *temel* diziler yerlerini alır. Genetik değişkenliğin en önemli sonucu antijenik çeşitliliktir. İmmünokimyasal çalışmalar aynı coğrafi ve kronolojik orijinden olan izolatların tek bir izolatdan türemiş viral klonlar olsa dahi antijenik olarak farklı olabileceğini göstermiştir. RNA replikasyonu sırasında gerçekleşen yüksek mutasyon oranları sonucunda oluşan mutant fenotiplerin çoğunda negatif seleksiyon sonucu antijenik varyantlar oluşur.



Şekil 2.11 Şap hastalığı virüs genomu yaklaşık 8.5 kb uzunluğunda tek zincirli RNA molekülünden oluşur. Genomik poliprotein translyasyonu sırasında 3 tane virüse kodlanmış proteazlar tarafından parçalanır. Viral poliprotein kapsid proteininin VP0, VP3 ve VP1 içine alan PI bölgesine parçalanır. Kapsid ile çevrilmemiş olan RNA, VP0 bölgesi henüz bilinmeyen proteazlarla kapsidin iç kısmında yer alan VP4 ve VP2 içine alacak şekilde parçalanır. Şap hastalığı virionları zarfsızdır ve isohedral yapı, 20-30 nm çapında ve % 146 sedimantasyon katsayısına sahiptir (Clavijove Kitching, 2003)

### 2.3.7 Virüsün Özellikleri ve Klinik Belirtiler

Virüs güneş ışığına ve dezenfektanlara karşı çok duyarlı olmasına karşın, + 5 °C'nin altındaki soğuk muhafaza ve dondurma sıcaklıklarında canlılığını yıllarca korur. Sığır derisi ve kıllarında 4-6 hafta, salya ve gübrede 1-4 hafta, suda 3-4 ay, toprak yüzeyinde 3-28 gün, kontamine ayakkabılarda 11-14 hafta canlılığını korur. Canlı kalabildiği pH aralığı, pH 6.5 – 9.5 tir. Daha düşük pH değerlerinde (<pH 6.0) inaktivasyon süreleri; pH 4'ün altında <15 saniye, pH 6.0'da 2 dakika, pH 7.0'de birkaç hafta olup, 9.5 ten yüksek pH değerlerinde süratle inaktive olur (pH 12.5'da <15 saniye). Bu nedenle NaOH (% 1'lik) ile pH 14 olan solüsyonlar etkili dezenfektan olarak kullanılır. Virüs, yüksek tuz konsantrasyonlarından

etkilenmez. Sıcaklığa dayanıksız olan etken, 60 °C'de 5 dakikada, 80 °C'de ve pastörizasyon işlemi sırasında canlılığını koruyamaz. Etken, şap hastalığından ölen ve/veya kesilen hayvanların salgılarında ve dokularında bulunabilir.

Şap Hastalığı Virüsü ekonomik açıdan da dünya çapında önemli olan viral bir hayvan hastalığıdır. Bu hastalığa bağlı ölüm oranı genellikle düşük olmasına rağmen bu hastalık çiftlik hayvanlarının verimliliğini azaltır ve bu hastalığın görüldüğü ülkelerin hayvan ve hayvan ürünleri uluslararası alanda kullanılmaz. Ölüm oranının düşüklüğüne rağmen hassas hayvanlarda ölüm oranı %100'e yaklaşır. Süt, et ve iş verimini düşürerek büyük ekonomik kayıplara sebep olur. Hastalık, çok hızlı ve akla gelebilecek her vasıta ile yayılır [4].

#### **2.4 Şap Hastalığı Teşhisi**

Laboratuarda hastalığın teşhisi, etken izolasyonu veya serolojik yöntemlerle yapılır. Gelen marazi maddelerden komplement fiksasyon testi (CFT) ve ELISA gibi testler ile şap antijeni aranır.

Şap virüsünün tip tayini, hastalığın teşhisi yanında epizootiyolojik olarak ve aşılama açısından da büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan klinik olarak hastalığın teşhisi konya bile kesinlikle tip tayini için laboratuara numune gönderilmelidir.

Son yıllarda daha çabuk ve pratik olarak teşhis konulabilmesi için yeni teşhis metodları üzerinde çalışılmaktadır. Bu amaçla insitu hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve koagülünasyon testi gibi testler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır [9].

#### **2.5 Şap Hastalığı : Korunma ve Kontrol**

Şap hastalığı virüsü enfekte hayvanlar ile hastalığa hassas hayvanlar arasında direkt temasla, et, süt vb. hava yolu ile ve çeşitli araçlarla bulaşır. Kontrol tedbirlerinin amacı bu anlamda bulaşmanın önlenmesidir.

Böyle bir hastalıkla karşılaşılınca alınacak tedbirler nelerdir? Uygulanabilecek üç metod vardır ki bunlar; aşılama, aşılama ve kesim, sadece kesim. Aşılama metodu; hastalığın endemik olduğu Arjantin, Brezilya, Fransa, İtalya ve Afrika'nın bazı bölgelerinde, aşılama ve kesim metodu; Danimarka, İsveç, İsviçre, Hollanda, Meksika gibi ülkelerde, kesim metodu ise; İngiltere, Kanada, A.B.D., Norveç gibi ülkelerde uygulanmıştır.

Hayvan hareketlerinin önlenmesi en etkili tedbirlerden biridir. İnsanların enfekte çiftlikleri ziyareti önlenmelidir. Hayvan taşıyan araçlar dezenfekte edilmelidir. Enfekte hayvanların

kesimi virüs üretimini durdurur ve bulaşma zincirini kırar.

Şap aşılı inaktif virüsler ile hazırlanırlar. Aşıda kullanılacak şap virüsünün seçimi çok önemlidir. Aşı monovalan, bivalan, trivalan ve polivalan şekillerde hazırlanabilir. Aşılama genellikle sığırlarda koyunlardan daha fazla uygulanmaktadır. Şap hastalığının kontrolü için çok yakın uluslararası işbirliği gerekmektedir [9].

### 2.5.1 Şap Hastalığı'nın Ekonomi ve Ticarete Etkisi

Şap hastalığının meydana getirdiği kayıplar;

- Süt ve et verimindeki kayıplar,
- Hayvanların gelişmesinde gerilik,
- Gebe hayvanlarda yavru atma,
- Özellikle genç hayvanlarda görülen oldukça yüksek oranda ölümler,
- Dış ticarete getirilen kısıtlamalardan doğan ekonomik kayıplar,
- Tedavi masrafındaki maliyet,

Şap hastalığından dolayı yıllık % 15 süt kaybı görülmektedir ve süt kaybından dolayı uğradığımız zarar yaklaşık 8 milyon ABD \$ dır. Hastalıktan dolayı et kaybı ise % 10 dolayındadır ve uğradığımız yıllık zarar 81 milyon ABD \$dır.

Hastalık görülen bölgelerde canlı hayvan ve hayvansal ürün ticareti durdurulmakta, çok sayıdaki tarımsal ürünün başka ülkelere ithalatına sınırlama getirilebilmektedir.



Şekil 2.12 Avrupa’ da kesme metodu ile hastalığın yayılmasını engelleme çalışmalarına ait görüntüler [9]

## 2.6 Şap Hastalığına Karşı Aşı Geliştirilmesi

### 2.6.1 Geleneksel Aşılar

Aşı geliştirilmesi çalışmalarının, tıp alanında immünolojiye ve genel sağlığa katkısı çok büyüktür. Yaklaşık 200 yıl önce Jenner tesadüfî bir şekilde çiçek hastalık enfeksiyonundan korunmak amaçlı aşı yapmıştır. Bundan yüzyıl sonra; Pasteur patojenliği azaltılmış kuduz aşısını bulmuştur. Bu buluşlar, tüm viral aşıların geliştirilmesinde temel rol oynamıştır. Bu ‘eski’ ya da geleneksel aşılar canlıların bünyesinde hastalığa sebep olabilme gücüne sahip mikropların güçlerinin zayıflatılarak vücuda verilmesi işlemidir. İnsan ve hayvanlarda hastalık yapma yeteneğinde olan virüs, bakteri vb. mikropların hastalık yapma kudretlerinden arındırılarak ya da bazı mikropların salgıladığı zehirlerin etkisinin ortadan kaldırılarak sağlam kişilere verilmesi için geliştirilen biyolojik maddelere “**aşı**” denilmektedir. Kişileri hastalıklardan ve onun kötü sonuçlarından koruyabilmesi için sağlam ve risk altındaki kişilere uygulanmaktadır. Aşıların tedavi edici özellikleri yoktur. Yani herhangi bir hastalık oluşuktan sonra hasta kişiye aşı yapmanın yararı olmamaktadır. Aşılar, ağız yoluyla, adale içerisine, cilt altına veya cilt içine verilmek suretiyle uygulanabilirler. Hangi yoldan verilirse verilsin, aşılar vücudumuzu hastalıklara karşı koruyan ve savunma cisimcikleri olarak isimlendirilen antikorları oluştururlar. Oluşan antikorlar vücutta uzun süre kalırlar ve bu süre içinde aynı mikrop vücuda tekrar girerse, bu mikrobun hastalık oluşturmaya fırsat vermeden ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Herhangi bir aşının koruyucu etki gösterebilmesi için uygun yaşlarda ve uygun aralıklarla yapılması şarttır. Zira aşıların çocuklara; hastalıklara yakalanma riskinin en yüksek olduğu dönemlerden önce yapılması gerekmektedir. Yapılan geniş araştırmalar sonucunda her aşı için belirli bir aşı takvimi geliştirilmiştir.

Aşılar cinsine göre ağız yoluyla alınır yada enjekte edilirler. Hangi yoldan yapılırsa yapılsın, aşı vücudun savunma mekanizmasını harekete geçirerek vücudu hastalıktan korur (Arnon ve Yedidia; 2003)

Dört çeşit aşı türü vardır.

- ◆ Cansız (ölü) mikrop aşıları,
- ◆ Canlı (atenüe) mikrop aşıları,
- ◆ Mikrop ürünlerinden hazırlanan aşılar,
- ◆ Biyoteknolojik aşılar.

### a) Cansız (ölü) mikrop aşıları

Çeşitli yöntemlerle öldürülmüş bakteriler ile inaktive edilmiş virüs aşılarıdır. Bakteri veya virüsler laboratuarlarda üretildikten sonra 1 cm<sup>3</sup> sıvıda belirli sayıda mikrop olacak şekilde sulandırılarak ısı, formaldehit, fenol, aseton, ultraviyole gibi etki veya maddelerle öldürülürler. Bu öldürülme veya inaktivasyon işleminde genellikle mikrop bütünlüğü ve antijenik yapı bozulmaz.

Cansız mikrop aşıları genel olarak ilk verilişten 4 gün sonra antikor oluşturmaya başlarlar. Ancak ilk uygulamada oluşan antikorlar koruyucu düzeyde değildirler. Bu nedenle 2. kez ve 3. kez, hatta bazen daha çok sayıda aşılama ile bağışıklık düzeyini arttırmak gerekir. Cansız mikrop aşılarının koruyuculuk süresi diğer aşılarından daha kısadır (Yeğen, 1990). Aşağıda cansız mikrop aşılara birkaç örnek verilmiştir.

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

### b) Canlı (atenüe) mikrop aşıları

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

- Canlı (atenüe) bakteri aşıları: BCG Verem Aşısı
- Canlı (atenüe) virüs aşıları: Sabin tipi çocuk felci aşısı, Sarı ateş , kızamık, kızamıkçık, kabakulak.

### c) Mikrop Ürünlerinden Hazırlanan Aşılar

*Toksoid (Anatoksin) aşılar:* Difteri ve tetanoz gibi bakteri toksinleriyle meydana gelen hastalıklardan korunmada kullanılan aşılardır. Saf olarak elde edilen bakteri toksinin daha sonra ısı veya formol ile muamele edilerek (% 0.3 - 0.4 oranında formol eklenerek 37 °C'de

3-4 hafta bekletilir) zehir etkisi giderilir bu şekilde antijen yapısı bozulmadan hazırlanan toksoid (anatoksin) ler aşı olarak kullanılır. Toksoid aşılarda daha çok hümmoral bağışık yanıt oluşturarak koruma sağlarlar.

*Mikropların belirli bir kısmından hazırlanan aşılarda:* Bazı infeksiyon hastalıklarında, etken mikrobun belirli bir parçasından (örneğin HBs Ag partikülleri, N. meningitidis'in hücre duvarpolisakkariti gibi) hazırlanan aşılarda daha iyi koruyucu etki yaptığı araştırmalarla gösterilmektedir.

#### **d) Biyoteknolojik Aşılarda**

Aşılamada bazı sorunların yaşandığı infeksiyon hastalıklarında, daha etkili ve yan etkileri daha az olan aşılarda elde edilmesi için yeni, moleküler biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu tekniklerle hazırlanan aşılarda:

- *Rekombinant DNA Aşılarda:* Bu teknikle mikropların bağışıklıkta etkili olan proteinlerini kodlayan genleri ayırılır ve bu genler bir taşıyıcı hücreye aktarılarak, orada bol miktarda sentezletirilirler. Örneğin Hepatit B virüsünün yüzey antijenini (HBsAg) kodlayan gen bir maya hücresine aktarılarak çokça elde edilir ve aşı olarak kullanılır (Rekombinant HBV aşısı). Rekombinant DNA tekniğinin bir başka uygulaması, elde edilen "aşı geni"nin taşıyıcı bir virüse (örneğin herpes virüslere) rekombine edilmesidir.

- *Sentetik Peptid Aşılarda*

Proteinlerin yapı taşları olan aminoasit dizileri antijen olarak kullanılabilir. Çeşitli peptidler içerisinde belli bir tanesinin seçilmesi avantajdır. Peptid antijenleri sentetik olarak elde edildikleri için canlı mikroorganizmaların üretilmesine ihtiyaç yoktur. Peptidlerin saflaştırılması daha kolaydır. Küçük molekül ağırlı olduklarından immünojen özellikleri azdır. Bu yüzden taşıyıcı protein ve ya adjuvant kullanımına gerek duyulabilir. Hayvan deneylerinde başarılı sonuçta ulaşmış peptid aşısı vardır.

- *Mutant Aşılarda:*

Canlı mikrop aşılarda hazırlanırken uygulanan eski virulans azaltma yöntemleri yerine, biyoteknoloji ile patojen mikroplardaki virulans genleri yok edilerek "avirulan mutant" suşlar ile atenue aşılarda hazırlanabilmektedir. Örneğin V.cholerae bakterisinde toksini kodlayan genin yok edilmesi gibi.

- *Anti idiotip Aşılarda:*

Antikorlar aracılığı ile gerçekleştirilen yeni bir aşı tekniğidir.

▪ *Konjuge Polisakkarid Aşılar:*

Bazı patojenik bakterilerin virülansı hidrofilik polisakkarid kapsüllerinin antifagositik özelliklerine dayanır. Kapsülün antikor ile kaplanması makrofajların ve nötrofillerin o patojeni fagosite etmelerini kolaylaştırır. Polisakkarid aşıların dezavantajı T hücrelerini uyaramamalarıdır. B hücrelerini T-bağımsız olarak uyarırlar ve IgM yapımı gerçekleşir. Hafıza hücresi oluşmaz. Polisakkarid antijenler zayıf immünojenik özellik gösteren haptentlerdir. Bir protein taşıyıcısı ile bağlanarak haptentin immünojenitesi artırılır. Polisakkarid-protein konjugatının T hücreleri aktive etmesi sonucunda immünoglobulin dönüşümü meydana gelir. Bu aşılar karşı IgG sınıfı antikorlar oluşur. İmmün hafıza oluşur. Hayatın ilk anlarından itibaren korunma sağlanır (Akan, 1992; Bigehan, 1993; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994; Kılıçyurgay, 1994; Yeğen, 1990)

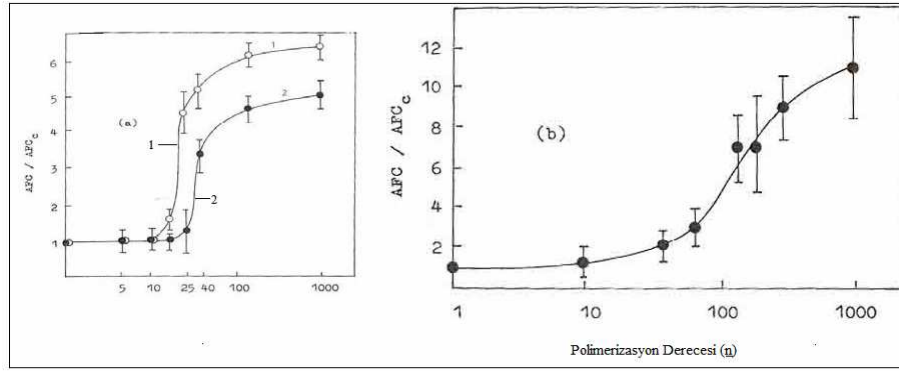
## **2.7 Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları**

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

### **2.7.1 İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri**

1970'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. PE'lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler hayvanlara immünize edilerek, immün cevabın yükselmesinde PE'lerin etkili oldukları gösterilmiştir. PE'lerin bakteri, virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması sonucu immün cevabın artması ve devamlı bir immün koruyuculuk sağlaması sentetik aşı tasarlama fikrini ortaya çıkarmıştır (Mustafaev, 1996a). Yüklü olmayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinil pirlidon, polietilen glikol) eritrositlerin kompleksleri yapılmış, fakat bu kompleksler immün cevapta artış sağlayamamışlardır yani bu tür yapılı polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bu bilgiler ışığında yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitlerin (PE), (negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen

polimerler; polianyonlar, polikasyonlar ve bunların kopolimerleri) monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır (Mustafaev 1996c, 1996d, 1996e, 1996f, 1996 g, 1996h, Başalp, 1996; Özeroğlu, 1996b; Güney, 1997; Saraç, 1997a, 1997b; Özeoğlu, 1997; Mustafaev, 1998). Bunun nedeni şu şekilde açıklanmıştır: Bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Suda iyi çözümler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilmektedir. Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır (Mustafaev, 1996a).

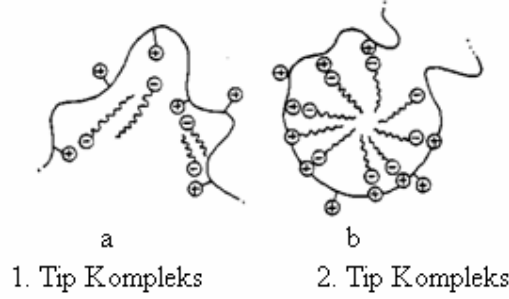


Şekil 2.13 Fare karaciğer hücrelerinde antikor oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 2-PC-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> ve Poliakrilik asidin (PAA) (b) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Peoliektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10<sup>-6</sup> eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 2004, 1996a).

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

PE moleküllerinin sulu ortamlarda supramoleküler yapısının değişmesinin birinci yolu hidrofoblaşmasıdır. Bunun için poliyon zincirlerinin yüzey aktif maddelerle yüklenmesi gerekmektedir. PE'in yüzey aktif maddelere kovalent bağlanması veya yüzey aktif maddelerle PE'in arasında elektrostatik bağlarla kompleks oluşması ile PE'ler hidrofoblaştırılmaktadır. Polimer molekülü ile yüzey aktif maddeler (sodyum dodesil sulfat, sodyumdezoksi şelat, setil

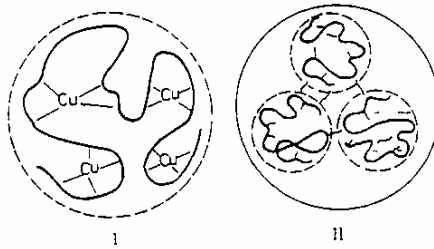
trimetil, amonyum bromür v.s.) arasında elektrostatik kompleks oluşumundan meydana gelen komplekslerin yapısı yüzey aktif madde/PE oranına bağlıdır (Mustafaev, 2004, 1996a)



Şekil 2.14 a-b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri

Şekil 2.14 a'da yüzey aktif madde/PE oranının küçük olduğu değerlerde oluşan 1. Tip Kompleks, Şekil 2.14b'de ise yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun artması durumunda oluşan 2. Tip Kompleks görülmektedir. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun artırılması ile birinci tip intramoleküler komplekste karşılıklı etkinin artması sonucu 2. Tip elektrostatik kompleks oluşur. 2. Tip kompleksin kompaktlığı 1. Tip komplekse göre daha fazladır (Mustafaev, 2004, 1996a).

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

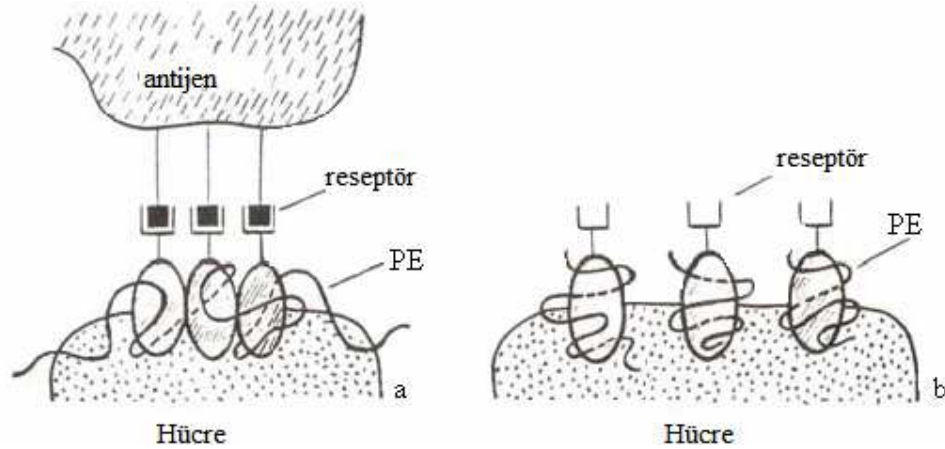


Şekil 2.15 Polimer-metal komplekslerinin  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \ll 1$  (I) ve  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \gg 1$  (II) oranlarında oluşan yapı

PE-Metal kompleks bileşenlerinin oranlarının sabit değerlerinde oluşan PE komplekslerinin yapısı çözeltideki PE'in başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Fazla seyreltilmiş çözeltelerde

PE-Metal kompleksleri kompakt yapıdadır. Polimerin başlangıç konsantrasyonu arttıkça metal iyonları ile makromoleküller arasında çapraz bağlar oluşur ve sistemde assosiyeye olmuş asimetrik partiküller meydana gelir (Mustafaev, 1996a).

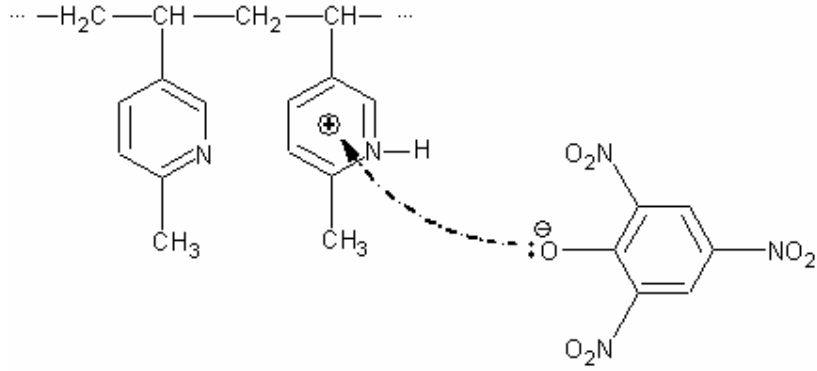
PE-Metal ve PE-Yüzey aktif madde komplekslerinin immün sistem üzerine etki mekanizması genelde aynıdır ve PE kompleksinin kimyasal yapı çevrimlerine bağlıdır. Kimyasal olarak açık yapı ile karakterize edilen PE kompleksleri immün sistemi güçlü uyararlardandır. PE kompleksleri kompaktlaştığında ya immün sistemi uyarmazlar ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliğinin oluşmasında protein faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Öyke ki; kana enjekte edilmiş PE makromolekülleri kanda plazma proteinleri ve ya hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilirler ve makrofajlar tarafından adsorbe edilebilirler. Ayrıca; PE kompleksinin immün sistemi stimule etmesi; PE kompleks bileşiminin hem polimer zincir uzunluğuna, hem de kompleksin kompaktlığına bağlıdır. Stokiometrik olmayan PE kompleksleri antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında birden fazla noktada etkileşim imkanı sağlamaktadır (Şekil 2.15a). Stokiometrik PE komplekslerinde ise antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim ihtimali azalmakta ve birbirinden izole olmuş kompleksler oluşmaktadır (Şekil 2.15b).



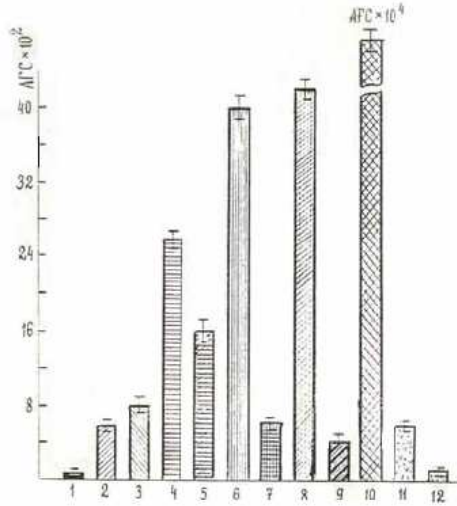
Şekil 2.16 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri  
(a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 2004, 1996a).

### 2.7.1.1 Poielektrolit Komplekslerinin İmmünojenliği

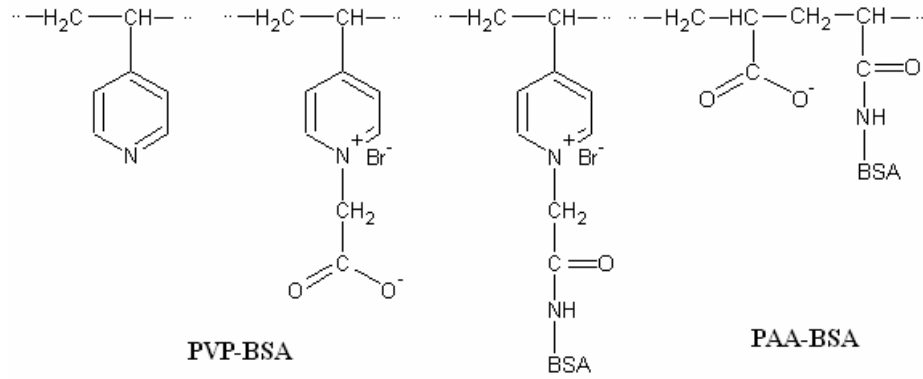
Doğal olmayan PE olarak sentezlenmiş ilk suni antijen poli-2-metil-5-vinil-piridin trinitrofenol ile elektrostatik kompleksidir.



Bu suni antijen organizmaya immünize edildiğinde immün cevap oluşturması için bir adjuvanta (yardımcı) ihtiyaç göstermez ve timus organı olan veya olmayan hayvanlarda antikor oluşumunu artırır. Doğal olmayan ikinci tip antijen ise; kooperatif, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle kararlı hale getirilen proteinlerin PE-Protein kompleksleridir. Adjuvant olmadan enjekte edilen bu kompleksler bu proteine spesifik antikorların sentezini uyarmışlar ve immün cevabın oluşmasının immün cevap genlerine ve timusa bağlı olmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda protein antijenlerinin PE'lerle olan kompleksleri efektif aşı özelliği göstermektedir. PE komplekslerinin yapısı ile (stabilitesinin, yükünün, konformasyonunun ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin) immünolojik aktivite arasındaki bağlar analiz edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında polimer bileşimli immünojenlerin model yapısı ortaya konulmuştur (Mustafaev, 1996a).

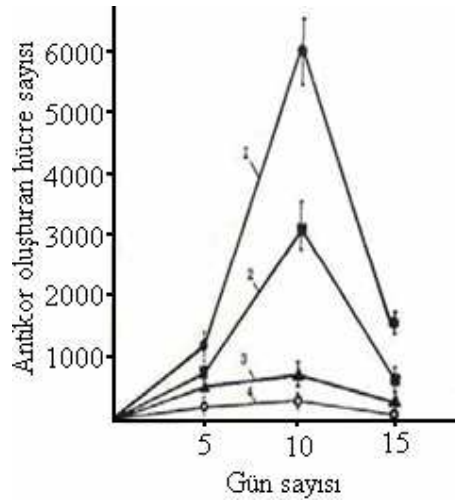


Şekil 2.17 Sığır Serum Albumin (BSA)'nin çeşitli PE'lerle karışımı ile immünize edilmiş farelerin dalak hücrelerindeki BSA'ya spesifik antijen oluşturan hücrelerin (AOH) nisbi miktarı; 1- Saf BSA; 2- PVP+BSA; 3- PVP-R<sub>16</sub>+BSA; 4- (PVP-R<sub>2</sub>+BSA) suda; 5- (PVP-R<sub>2</sub>+BSA) +0.15 M NaCl; 6- PVP(R<sub>2</sub>,R<sub>16</sub>)+BSA; 7- PVP(R<sub>0</sub>PVP(R<sub>0</sub>,R<sub>ac</sub>)+ BSA + Karbodiimid; 9- PAA + BSA; 10- (PAA + BSA) + Karbodiimid; 11- PSSNa + BSA; 12- CP(AA + MVP) + BSA. (PVP: Poli-4-vinilpiridin) (Mustafaev, 2004, 1996a).



Şekil 2.18 Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı (Mustafaev, 2004, 1996a).

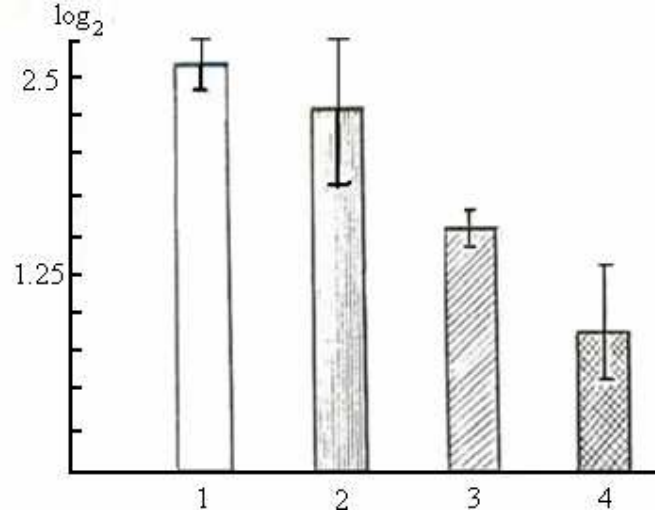
Poli-4-vinilpiridin (PVP) ve PAA polimeri ile BSA'nın kompleksleri oluşturup bu PE-Protein komplekslerinin immünojenliği incelenmiştir. Tüm bu deneylerden elde edilen sonuçlar immünojenliğin PE'lerin kimyasına bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar; PE-protein komplekslerinin organizma şartlarında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



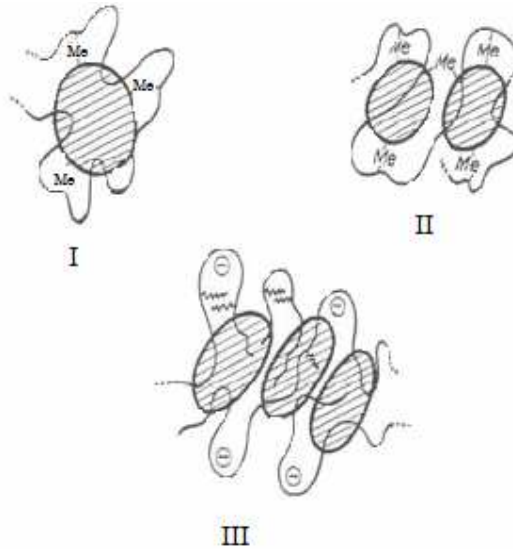
Şekil 2.19 BSA-PE kompleksleri ile immünize edilmiş fare dalak hücrelerinde BSA'ya karşı spesifik oluşan antikor oluşturan hücrelerinin oluşum kinetiği 1- BSA-PVP(R<sub>0</sub>, R<sub>ac</sub>); 2- BSA-PVP(R<sub>2</sub>, R<sub>16</sub>); 3- BSA-PVP-R<sub>2</sub>; 4- Saf BSA (Mustafaev, 2004, 1996a).

Şekil 2.19'den anlaşıldığı üzere PE-Protein kompleksleri fareye immünize edildikten 10 gün sonra AOH miktarı maksimum değere ulaşmıştır.

Şekil 2.20’de Bovine  $\gamma$ -globulinin (BGG) proteini ile akrilik asid-metil-vinil-piridin (MVP/AA) kopolimerlerinden (CP) oluşan komplekslerin immünojenliği gösterilmiştir. BGG proteini ile kararlı yapı oluşturan MVP/AA kopolimeri ve bunların kompleksi organizmada yüksek immün cevap oluşturmamaktadır. Bu etkinin nedenini anlamak için çeşitli supramoleküler yapılarda karakterize edilen PE kompleks partiküllerin yapısı incelenmiştir.



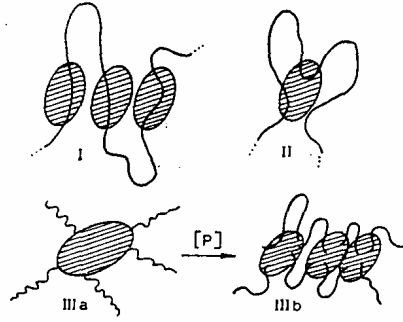
Şekil 2.20 Saf BGG (1) ve bunun MVP/AA kopolimeri ile kompleksleri 2- CP-3; 3- CP-2; 4- CP-1’lerle karışımları organizmaya immünize edildiğinde oluşan immün cevap (AOH miktarı) (Mustafaev, 2004, 1996a).



Şekil 2.21 Protein metal kompleksi-1 (I); Protein metal kompleksi-2 (II); Proteinlerin Kopolimerlerle (III) komplekslerinin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a).

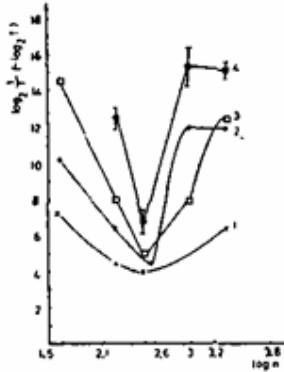
Polikompleksin yapısının, immonojenliğine etkisi, PVP-SA ve PAA-SA (B) karışımında karbodiimid ilavesiyle sistematik olarak araştırılmıştır. PVP’nin PVP-CH<sub>2</sub>COOH türevleri

PVP'nin  $\text{BrCH}_2\text{COOH}$ 'la kuaterleşme reaksiyonu yöntemiyle sentezlenmiştir.



Şekil 2.22 PAA-BSA konjugatının yapısının PAA'nın polimerleşme derecesine bağlı olarak şematik gösterimi  $P_n$  I 140 (I), 550 (II), 43 (III). III halinde BSA/PAA oranına bağlı olarak iki tür yapı oluşur (Mustafaev, 2004, 1996a).

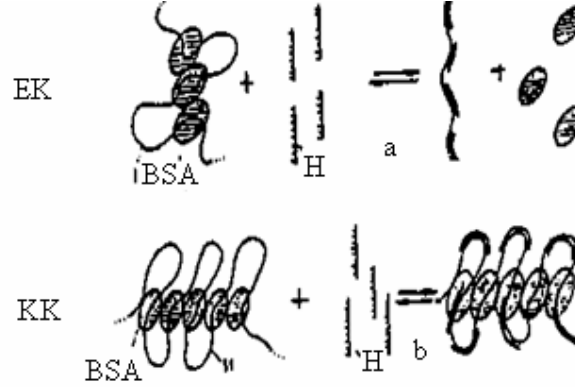
Şekil 2.23'deki grafik stokiometrik bileşimli PAA-BSA konjugatının minimum immünojenliğe sahip olduğunu göstermektedir. Molekül ağırlığına bağlı olmaksızın yüksek epitop yoğunluğuna sahip konjugatlar ise daha fazla immünolojik aktivite göstermektedirler.



Şekil 2.23 Kovalent PAA-BSA konjugatı enjekte edilmiş farelerin kanındaki antikor titrelerinin  $(-\log_2 7)$  (konsantrasyon) polimer zincirinin uzunluğuna ( $n$ ) bağlılığı: 1- Birinci immün cevap enjeksiyondan sona 13 günde; 2,3,4-ikinci immün cevap: 7(2), 11(3),10(4) günlerde maksimum olmuştur.  $N=43$  durumunda konjugatın yapısı yukarıdaki şekildeki III b'ye uygundur (Mustafaev, 1996a).

Kana verilen serbest PE'lerin veya antijenlerin PE komplekslerinin daha sonraki akıbeti, bunların plazma protein hücreleri veya diğer yüklenmiş biyokomponentlerle karşılıklı etkileşim karakterine bağlıdır. Buna göre model deneylerde, proteinlerin ve bunların immünolojik aktifliğinin amaca uygun şekilde düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bu sorunun çözümü için iki tür yapay immünojen seçilmiştir (Mustafaev, 1980). Bunlardan birisi BSA'nın PVP ( $R_2$ ) ile elektrostatik kompleksi (EK), diğeri ise bu proteinin karboksimetilleşmiş PVP ile kovalent konjugatıdır (KK).

Önce *in vitro* şartlarında EK ve KK'nın heparin ile birbirinden farklı şekilde karşılıklı etkileşimi olduğu gösterilmiştir. Heparin çözeltisi EK çözeltisine ilave edildiğinde heparin tam olarak proteini EK'dan çıkarır. Çözeltide serbest protein, çöküntü de ise heparin polikasyon kompleksi olur. Heparin çözeltisi KK çözeltisine ilave edildiğinde farklı bir durum gözlenir. Protein ile PE arasındaki kovalent bağ makromoleküller substitusyon reaksiyonunun oluşmasına imkan vermez. Çözeltide kovalent konjugatla heparinin polikompleksi oluşur. Şekil 2.24'te EK ve KK' nin heparin ile karşılıklı etkisinin mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.24 Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a).

İmmünolojik deneyler fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Farelere kuyruk veninden EK veya KK çözeltileri enjekte edilmiştir. Daha sonra hayvanlara çeşitli zamanlarda heparin çözeltisi verilmiştir. Kompleks veya konjugatla immünize olduktan sonra immün cevabının maksimum pikinden antikor miktarı tayin edilmiştir. Çizelge 2.1'de elde edilen sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi heparin, EK'nın hemen arkasından veya 30 dakika sonra enjekte edildiğinde vücudun yapay antijene cevabını tam olarak yok etmektedir. Yani heparin EK'sini vücutta "tutar" ve bunu parçalar, polikasyonla birleşerek proteini serbest hale geçirir. Bu zamanda polikomplekse yönelik immün cevabının başlaması mümkün olmaktadır. Ancak kontrole göre (yani heparin olmadığından) birkaç kat daha zayıftır. 24 saat sonra heparin enjekte ettiğimizde EK'nın immün cevabına hiçbir etkisi olmamaktadır. Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi zamana bağlı olmaksızın heparinin KK'nın immün cevabına hiçbir etkisi yoktur. Gerçekten de, heparin KK'yı vücutta "tutsa" bile onunla üçlü kompleks oluşturarak KK partiküllerinin immün hücrelerinin membranları ile karşılıklı etkileşimine bir etkisi olmamaktadır.

Çizelge 2.1 İmmünojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH'ların göreceli miktarı

Preparat	Verilme Zamanı, saat			
	0	0.5	2	24
Elektrostatik Kompleks	0	0	0.46	1.08
Kovalent Konjugat	0.96	1.04	0.94	1.0

Bu sonuçlar kompleksin ve konjugatın *in vitro* şartlarında heparin ilavesiyle alınmış sonuçları ile çok iyi uyum göstermektedir. Elde edilen sonuçlar iki açıdan önemlidir: Birincisi bunlar kanın çeşitli komponentleri varlığında organizma şartlarında makromoleküller arasında substitusyon reaksiyonlarının oluşma imkanının olduğunu göstermektedir. İkincisi, bunlar immün cevabının yapay veya timusa bağlı olmayan antijenlerle bırakıldığı zaman tayin etme yöntemini sağlamaktadır (Mustafaev, 1996a).

### 2.7.1.2 İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin çalışma modeli

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdır. İmmünolojik aktif (vaya "pasif") polielektrolit kompleksleri için aşağıdaki model gösterilmiştir (Şekil 2.25). Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz (Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1990, 1996a, 2004).

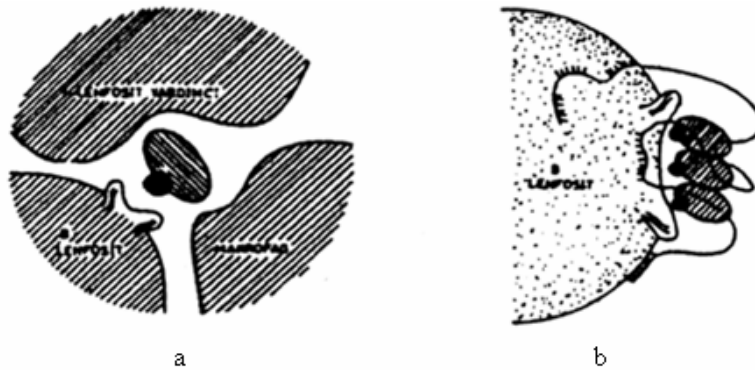


Şekil 2.25 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı.

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktali elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.

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

Şekil 2.26a'da scannig elektron mikroskobu ile sığır eritrositlerinin immünolojik etkiye sahip olan polimerlerle ve bunların protein kompleksleri ile karşılıklı etkisinden oluşan polimer-hücre komplekslerinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi hem polimerler hem de polimerlerin kompleksleri hücre ile interpolimer kompleks oluştururlar ve bunların agregasyonuna neden olurlar. Yukarıda açıkladığımız gibi hem saf polimer hem de polimer-protein kompleksleri T-hücrelerine bağlı olmadan immün cevap oluştururlar. Alınmış fizikokimyasal sonuçlar T-hücrelerine bağlı olmayan immün cevabın başlaması için antijen hücre kompleksinin sade hipotetik şemasını gösterme imkanı sağlamıştır (Şekil 2.26b).



Şekil 2.26 İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a)

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

### 2.7.1.3 Polielektrolit Kompleksleri ve Yapay Aşılar

Son yıllarda yapılmış araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin yüksek immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.2; 2.3). Örnek olarak tüberkülozun protein antijeni (PPD), H-antijeni, Salmonella, grip antijeni, menenjit mikrobuunun B-polisakkariti,  $\alpha$ -fetoprotein ile (kanser antijeni) polikatyonların kompleksleri, serbest antijenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek immünolojik aktiviteye sahiptirler (Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1990, 1996a, 2004). PEK'ler timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadırlar (Çizelge 2.4) ve bir kez enjekte edildikten sonra ilave yardımcıardan yararlanmadan güvenli immünolojik hafıza meydana getirirler (Çizelge 2.5). Böyle PEK'ler aynı zamanda yüksek koruyucu aktifliğe sahiptirler ve bunları temel alan yapay aşıların sentezlenmesinde büyük olanak sağlarlar.

Çizelge 2.2 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.

PREPARAT	AOH	FARE SAYISI
BGG	5000±5.35	18
PVP(R2, R16)-BGG	100000±15000	18
PPD	25±5.0	18
PVP(R2,R16)-PPD	25000±2000	18

Çizelge 2.3 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin titresi (miktar) (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler)

SAYISAL Oran N <sub>OA</sub> /N <sub>PE</sub>	IgE'nin titri (log-/T)	
	PVP (R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )-OA* $\beta \approx 5$ mol %	PVP (R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )-OA* $\beta \approx 7$ mol %
2.0	6.6	7.8
3.8	5.6	5.5
4.0	4.0	5.1
5.0	3.4	4.0
6.0	4.0	3.5
8.0	3.0	4.8

(x) serbest ovalbumin için Ig-E'nin titri 4.0'a eşittir.

Çizelge 2.4 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktivite (Mustafaev, 1996a).

Farelerin gen tipi	İmmunojen	Dalakta protein spesifik antikorların miktarı	Farelerin sayısı
C57BL/6(+/+)	BSA	25±10	6
C57BL/6(+/+)	BSA-PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )	2500±400	6
Nude (nu/nu)	BSA	-	3
Nude (nu/nu)	BSA-PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )	600±100	5
C57BL/6(+/+)	BGG	2500±400	6
C57BL/6(+/+)	BSA-PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )	3500±200	6
Nude (nu/nu)	BGG	200±20	5
Nude (nu/nu)	BSA-PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )	20000±2500	5

Çizelge 2.5 Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap (Mustafaev, 1996a)

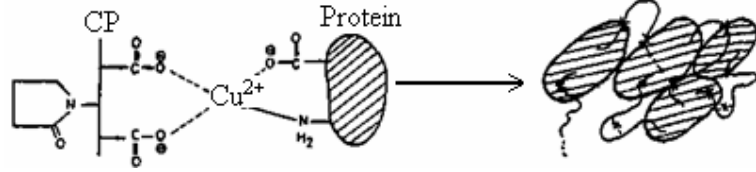
İmmünizasyon		Farelerin sayısı	Birinci veya ikinci immünizasyondan 7 gün sonra AOH miktarı Farelerin sayısı	
Birinci	İkinci		25IgM	IgG
BSA	-	18	23,5±2	5,5±2
BSA	BSA	11	20 ±4	6±2
PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )-BSA	-	15	3840±470	3990±300
PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )	-	14	5920±720	7450±680

#### 2.7.1.4 Üçlü polielektrolit kompleksleri

Yukarıdaki bilgilerden elde edilen sonuçlara göre stabil yapıli kompleksler (veya konjugatlar) en fazla immünolojik aktiviteye sahiptirler. Böyle sistemlere örnek olarak; PE ve antijen moleküllerinin (fragmentlerinin) kooperatif elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etkileşimleriyle stabilleşmiş kompleksleri veya fonksiyonel grupları kovalent bağla bağlanmış konjugatlarını göstermek mümkündür. Ancak PE'ler veya antijen molekülleri birbirleriyle bağlanmak için uygun fonksiyonel gruplara veya hidrofob bölgelere sahip değilse bunların kimyasal modifikasyon problemi ortaya çıkmaktadır, bu ise polimerlerin biyolojik etkisinin geniş boyutta değişmesine neden olur.

Mikroplar yoluyla oluşmuş hastalıkların tedavisinde polisakkarit-protein karışımları bazı metallerin katkısıyla kullanılabilir. Çeşitli protein antijenlerinin sentetik PE'lere metal

katılmasıyla oluşturulan üçlü kompleksleri yüksek immünojen özelliktedirler (Mustafaev ve Norimov, 1990). Bu sistemlerin önemi, PE-protein karışımına çok az miktarda metal iyonu ilave edilmesiyle stabil üçlü kompleks oluşmasıdır. Proses teknolojik açıdan çok basittir ve komponentlerin kimyasal yapısının değişmemesi açısından oldukça önemlidir.



Şekil 2.27 CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları iştiraki ile kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı (Mustafaev, 1996a).

Çizelge 2.6'da böyle sistemlerden birisi için örnek değerler verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi üçlü kompleksler serum albumine karşı hem birinci hem ikinci immün cevabını çok fazla miktarda arttırmaktadır.

Çizelge 2.6 Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap (Mustafaev, 1996a)

Preparat	Farelerin sayısı	İkinci cevap IgM	Anti SA miktarı IgG
BSA	18	23.5 ± 2.1	5.5 ± 2.3
BSA	11	20 ± 4.2	6 ± 2.1
BA-CP1	10	10 ± 4.0	5 ± 2.0
BSA- $\text{Cu}^{+2}$ -CP1	15	22400 ± 1570	14720 ± 1200
BSA-CP2	10	20 ± 4.0	6 ± 2.0
BSA- $\text{Cu}^{+2}$ -CP2	15	2400 ± 1670	10500 ± 750
BSA- $\text{Cu}^{+2}$	10	20 ± 4.0	5.5 ± 2.3
PVP( $\text{R}_2, \text{R}_{16}$ )-BSA	14	5960 ± 724	7446 ± 678

Çizelgeden görüldüğü gibi üçlü komplekslerin immün cevabı ikili elektrostatik komplekslere göre 2 yada 4 kat daha fazladır.

### 2.7.1.5 Polielektrolit Komplekslerinin Alerjik Özelliği

Yapay antijenlerden yapay aşılarla geçişte PE-Protein kompleksinin yapısındaki, antijen komponentinin alerjik etkisinin olup olmadığının incelenmesi için ovalbuminin (OA) ve PE ile üç tip kompleks sentezlenmiştir: PVP ( $\text{R}_2, \text{R}_{16}$ ) ve CP (MVP-AA) ile ikili kompleksler ve CP (MVP-AA)- $\text{Cu}^{2+}$ -OA üçlü kompleksi (Çizelge 2.7; 2.8).

Çizelge 2.7'de 0.5 pg/fare dozda OA ve PEK ile üç kez immünize edilen farelerin serumundaki

OA'ya karşı spesifik IgG ve IgE'ye karşı cevap alınmadığı gösterilmiştir. Çok önemlidir ki ikili komplekse CP(MVP-AA)-OA metal iyonları ilave edildiğinde yani CP(MVP-AA)Cu<sup>2+</sup>-OA üçlü kompleksi oluşturulduğunda IgE için immün cevap kaybolmaktadır. Yani OA hem polikasyonla, hem de metal iyon katılmasıyla poliamfolit ile kompleksleştirildiğinde proteinin alerjik etkisini yok eder. Bu ise söylediğimiz gibi yapay aşı yaratmak için çok önemlidir (Mustafaev, 1996a).

Çizelge 2.7 Farelerde serbest OA veya PE kompleksi ile immünize edildikten birinci ve üçüncü hafta sonra OA'ya karşı oluşan immün cevabının dinamiği (Mustafaev, 1996a).

Preparat	Birinci hafta		Üçüncü hafta	
	IgG <sup>(*)</sup>	IgE <sup>(*)</sup>	IgG <sup>(*)</sup>	IgE <sup>(*)</sup>
OA	0.430	6.6	0.385	5.6
PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )-OA	0.305	0	0.355	0
CP-OA	0.355	5.0	0.370	1.0
CP- Cu <sup>+2</sup> -OA	0.340	0	0.295	0
Al(OH) <sub>3</sub> karışımında				
OA	0.385	10.0	0.375	9.75
PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )-OA	0.275	9.8	0.310	9.5
CP-OA	0.300	9.0	0.490	9.0
CP- Cu <sup>+2</sup> -OA	0.345	10.0	0.320	9.75

(\*) OA veya PEK'in Al(OH)<sub>3</sub> ön karışımında OA/Al(OH)<sub>3</sub> gram miktarı olarak oranı "IgG" immün enzim reaksiyonunun ürününün optik olduğu sıklığının değeri "IgE"nin logaritmasının değeri.

Çizelge 2.8 Verilen preparatların dozuna bağlı olarak hayvanların OA veya bunun PEK ile bir kat immünize edildikten 10 gün sonra OA'ya karşı IgE cevabının seviyesi (Mustafaev, 2006).

Doz (pq/fare)	Antikor titri (Log <sub>2</sub> /T)			
	OA	PVP(R <sub>2</sub> ,R <sub>16</sub> )*-OA	CP-OA	CP- Cu <sup>+2</sup> -OA
0.5	0	0	0	0
5.0	0	0	0	0
50.0	4.3	3.5	0	0
500.0	3.0	7.7	0	0

\* β ≈ 4.6 mol %

## 2.8 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

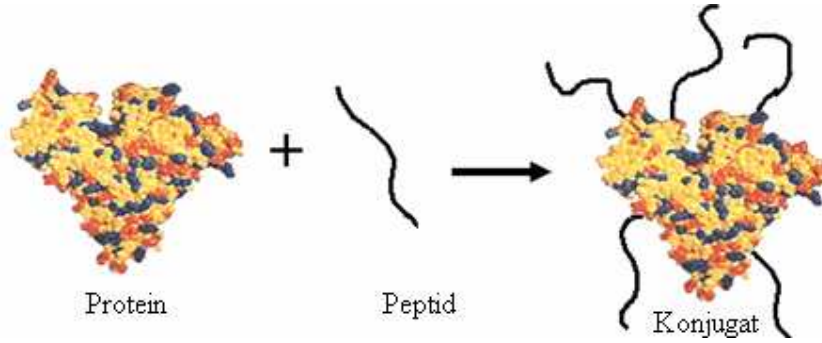
Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasid zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir (Deen vd., 1990). Büyük moleküler boyutlardaki BSA, KLH, OVA gibi globular proteinler, peptidler için taşıyıcı

olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar [10].

BSA ve KLH genel olarak en sık kullanılan taşıyıcı proteinlerdir ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar. Bağlanma (konjugasyon) bölgesi, peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki herhangi bir nokta olabilir. Peptidler içerdikleri aminoasid kompozisyonuna göre N- ucundan, C- ucundan ya da dizinin içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grubundan konjugasyona girebilirler. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Antijenik peptid dizilimi taşıyıcı proteine (BSA-Bovin Serum Albumin, KLH-Keyhole Limpet Hemocyanin, OVA-Ovalbumin vb.) bağlanacağı göz önünde bulundurularak sentezlenmelidir [11]. Antikor oluşumunda iyi sonuçlar elde etmek için uygun antijenik peptid dizilimini seçmek ve buna bağlı olarak konjugasyonun dizaynını yapmak oldukça kritik noktalardır. Peptidin taşıyıcı protein yüzeyinde konumlanması ve yerleşimi seçilen bağlanma yönteminden etkilenmektedir. Sisteine dayalı amino asid spesifik bağlanma yöntemleri genel olarak maleimidler ile yapılmakta ya da serbest -SH grubunun kovalent olarak etkileşmesine dayanmaktadır. Diğer bağlanma yöntemleri ise genel olarak serbest amino grupları için glutaraldehid ya da N-Hidroksisüksinimid reaktif grupları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Peptidler antikor oluşturmak amacı ile immünizasyon için proteinlerle bağlanacağı zaman konjugasyon için spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması, peptid dizilimine sistein eklenmesi gibi klasik yöntemlerden kaçınılması gerekmektedir (Deen vd., 1990).

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

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

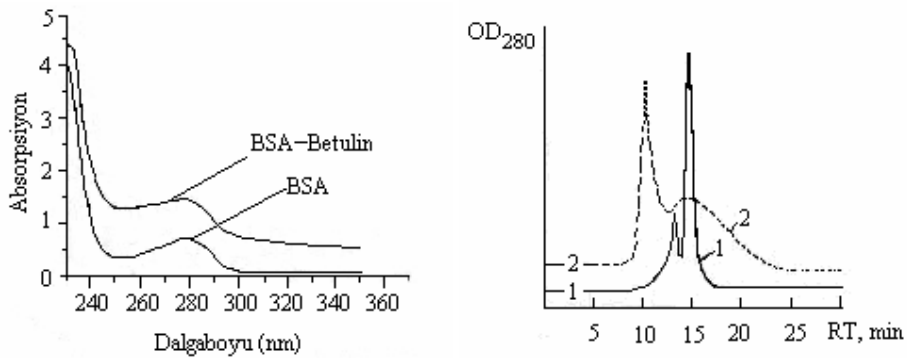


Şekil 2.28 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat

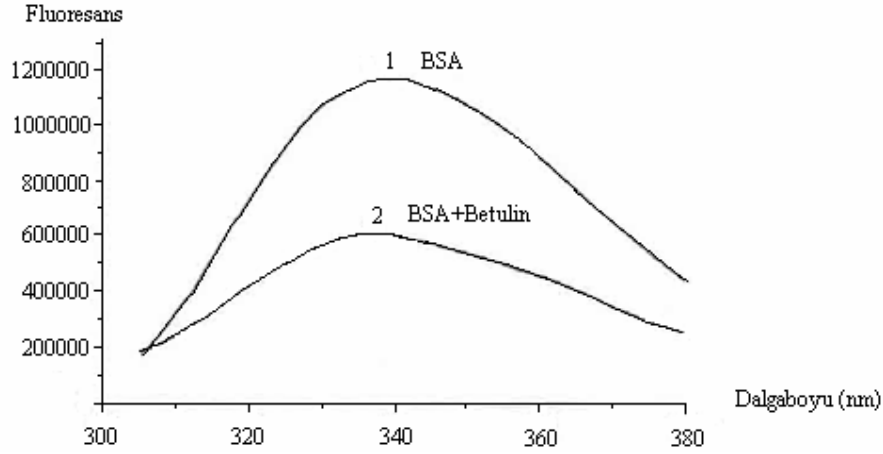
BSA'nın molekül ağırlığı  $66 \times 10^3$  Da olup diğer bir taşıyıcı protein olan Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)'e göre oldukça küçük ve ona göre hem daha yüksek çözünürlüğe sahip hem de daha immünojeniktir. BSA yapısında 60 adet lizin içeren ve 30-35 adet primer amin bölgesine sahip, zayıf antijenik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

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

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



Şekil 2.29 Saf BSA ve BSA\*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA\*B konjugatı) (Mustafaev vd., 2002)



Şekil 2.30 Saf BSA ve BSA\*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA\*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002)

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

### 2.8.3 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) Proteini

KLH bir deniz yumuşakçası olan *Megathura crenulata*'dan izole edilen ve yaklaşık olarak  $4.5 \times 10^5$ - $1.3 \times 10^7$  Da arasında değişen molekül ağırlığına sahip bir proteindir. KLH genel olarak antijenik özellikteki peptidler, haptentler ya da diğer immünojenik moleküllerin antijenik özelliklerini arttırmak için kullanılan taşıyıcı proteinlerden biridir. Yapısında yaklaşık olarak 2000 lizin (amino grubu), 700 sistein (sülfidril grubu) ve 1900 adet tirozin (fenolat grubu) olmasından dolayı konjugasyon reaksiyonları için oldukça fazla fonksiyonel grup içermektedir. Ancak KLH yüksek tuz konsantrasyonundaki çözeltilerinde stabil ve daha çözünür olduğundan konjugasyon reaksiyonlarının yüksek tuz konsantrasyonlarında yapılması gerekmektedir [10].

Zayıf antijenik özellikteki moleküller için taşıyıcı olarak KLH'ın kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur ve bunlardan bir tanesi de Ella Kagan ve arkadaşları (2005) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada kanser antijeni olan MUCI peptidinin m-Maleimidobenzoil-N-

hidroksisüksinimid ester (MBS) kullanarak KLH ile kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Saflaştırılan konjugatlar ile diğer kontrol gruplarının (taşıyıcı proteine bağlanmayan antijen vb.) farelere immünizasyonundan sonra en yüksek antikor miktarı KLH ile bağlanmış antijenik peptid verilen farelerde saptanmıştır (Kagan vd., 2005).

M. Chow ve arkadaşları (1985) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise; katı faz peptid sentez tekniği kullanılarak sentezlenen Poliovirüs VP1 kapsid proteini antijeni (sentetik peptidleri) taşıyıcı protein olarak KLH'ın kullanıldığı konjugasyon reaksiyonları ile taşıyıcı proteinlere bağlanmıştır. Peptidlerin içerdiği farklı aminoasidlere uygun olarak iki farklı konjugasyon yöntemi uygulanmıştır. Aminoasid diziliminde sistein içeren yani serbest sülfidril grubuna sahip peptid için m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid yöntemi (Liu vd., 1979), sistein içermeyen peptid için ise Glutaraldehid yöntemi kullanılmıştır (Baron ve Baltimore, 1982).

Boersma ve arkadaşları (1988) ise taşıyıcı protein olarak KLH'ın kullanıldığı konjugasyon reaksiyonunda 10 aminoasid zincirinden oluşan sentetik dekapeptidi, MBS yöntemi ile taşıyıcı proteine bağlanmıştır. Konjugasyon prosedüründe 10 mg/ml KLH çözeltisine dimetilformamitte çözülmüş olan 20 mg/ml MBS üç seferde 5'er dakika aralıklar ile ilave edilmiş buz üzerinde gerçekleştirilen inkübasyondan sonra aktive edilmiş protein MBS'nin fazlasından ayrılmış ve 20 mg/ml peptid çözeltisi ile reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu yöntemle paralel olarak araştırmacılar aynı sentetik peptidi (20 mg/ml) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür kullanılarak 10 mg/ml KLH'a 4 °C'de bir gece inkübe ederek bağlanmıştır. Elde edilen farklı dozlardaki konjugatlar farelere enjekte edilmiş ve farelerde oluşan antikor miktarları saptanarak yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmıştır (Boersma vd., 1988)

Ancak KLH'ın yüksek molekül ağırlığı, büyük molekül boyutları ve yapısında taşıdığı divalent katyonlar nedeni ile oldukça geniş yapıli agregat oluşturmaya meyilli olmasından dolayı çözeltilerinde tam çözünme gerçekleşmemekte bu da konjugasyon prosesinde zorluklara neden olmaktadır. Çözünmeyen KLH partiküllerinin çözeltiden uzaklaştırılması için santrifüj edilmesi gerekmekte bu ise protein miktarını saptama işini zorlaştırmaktadır [10].

#### **2.8.4 OVA (Ovalbumin) Proteini**

Ovalbumin proteini yumurta akında bulunan 45 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir ve izoelektrik noktası 4.6'dır [12]. OVA proteini de BSA ve KLH gibi



Liposomların bu eşsiz özellikleri biyoloji, tıp ve kozmetik alanında liposomlarla çok çeşitli yönlerde yapılan çalışmaların sayısını arttırmıştır. Bunlardan ilk akla gelen; liposomların tedavi edici özelliklerinden dolayı enzim, ilaç ya da antijen taşıyıcı olarak, çeşitli metabolik ya da fizyolojik bozuklukların in-vivo tedavilerinde kullanılmasıdır (Gregoriadis vd., 1971).

Liposom tarafından keseciklere kapatılan antijenlerle yapılan çalışmalarda antijenlere karşı oluşturulan antikor miktarlarının serbest antijenlere göre daha yüksek olduğu saptanmış ve bu ilgi çekici gözlem lipozomların taşıyıcı ve adjuvant (düşük immünolojik özellikteki moleküller ile birlikte verilerek konak hücrenin daha fazla antikor oluşturmaya yardımcı olan bileşen) özellikleri üzerine çalışma olanağı sunmuştur.

Liposomların adjuvant özellikleri ilk olarak Allison ve Gregoriadis (1974) tarafından Diphtheria toksoidi üzerine çalışılırken saptanmıştır ve diğer adjuvantlara göre liposomların daha üstün özelliklerinin olması bu moleküllerle yapılan çalışmaları arttırmıştır. İlerleyen zamanlarda yapılan araştırmalarda Protein (van Rooijen ve van Nieuwmegen, 1980; Heath vd., 1976), peptid (Liftshitz vd., 1981), şeker (Das vd., 1982 a,b) ve lipid (Alving, 1977) gibi geniş çeşitlilikteki antijenlerin liposomlar ile bir araya geldikten sonra immünojenliğindeki anlamlı artışlar birçok bilim adamının tarafından gösterilmiştir.

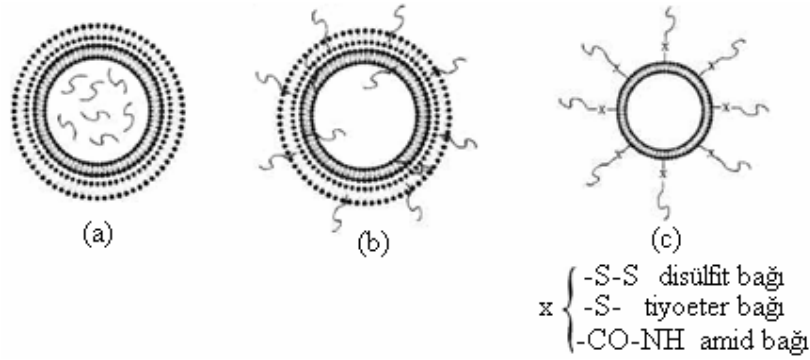
Hidrofilik peptid moleküllerinin liposomlara yerleştirilmesi keseciğin kapanırken suda çözünen peptidi keseciğin sulu kısmına hapsedilmesi ile gerçekleşir. Sanchez vd. (1980) tarafından yapılan çalışmada; Hepatid B yüzey antijeninden elde edilen polipeptidin büyük bir yüzde oranı ile liposomların sulu katmanları ile etkileştiği gösterilmiş ve Guinea domuzlarında yapılan çalışmalar sonucu antijenin liposomla verildiğinde, alüminyum jel adjuvantla verildiği formuna göre çok daha yüksek antikor oluşturduğu saptanmıştır.

Bununla birlikte makromoleküllerin sulu fazda hapsedilmesi sırasında, protein gibi moleküller elektrostatik ya da hidrofobik etkileşimlerle de liposomların yüzeyine bağlanabilmektedir (Tyrrell vd., 1976). Bu şekilde hazırlanan sistemlerde antijen liposomun yüzeyindedir. Daha spesifik antijenik özellik için ise önceden hazırlanmış liposomların peptidlerle inkübe edilmesi gerekmektedir (Raphael ve Tom, 1984). Sentetik peptidlerin yüzey aktifliğinin artırılması, daha önceden hazırlanmış liposomlara peptidlerin konjugasyon reaksiyonları ile kovalent olarak bağlanması sonucu gerçekleştirilmektedir (Latif ve Bachhawat, 1984).

Christophe Boeckler ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada sistein içeren peptidleri liposomların yüzeylerine disülfid ya da tiyoeter bağları üzerinden bağlamış ve zayıf immünojen özellikteki peptidlerin liposoma bağlanıp verildikten sonra oldukça yüksek miktarda antijenik özellik kazandığını göstermişlerdir (Haro ve Gomaro, 2000). Torchilin

(1978) ise karbodiimid ile amid bağı oluşturarak  $\alpha$ -kimotripsini liposomun yüzeyine stabil olarak immobilize etmiştir.

Liposomlarla yapılan diğer bir çalışmada ise Laserman ve arkadaşları (1980) liposomlarla hücrel hedefleme amaçlı olarak, heterobifonksiyonel özellikteki SPDP [N-hidroksisüksinimidil- $\beta$ -(2-piridilditiyopropiyonat)]'ı kullanarak liposoma, antikor (hücrel hedeflemeye gerçekleştirir) ve *S. Aureas*'a ait protein A molekülünü kovalent olarak bağlanmışlar (Latif ve Bachhawat, 1984). Ancak sonraları yapılan çalışmalarda daha verimli ve kolay bir yöntem olan antijenin tiyollenmesini ve maleimid kullanılarak liposomlara bağlanmasını kapsayan modifiye edilmiş konjugasyon prosesleri de geliştirilmiştir (Shek ve Heath, 1983).



Şekil 2.32 (a) Suda çözünebilir sentetik peptidler liposomlara direkt olarak hapsedilebilir, (b, c) Sentetik peptidler liposomlara kovalent olarak bağlanabilir (Haro ve Gómara, 2000)

## 2.10 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

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

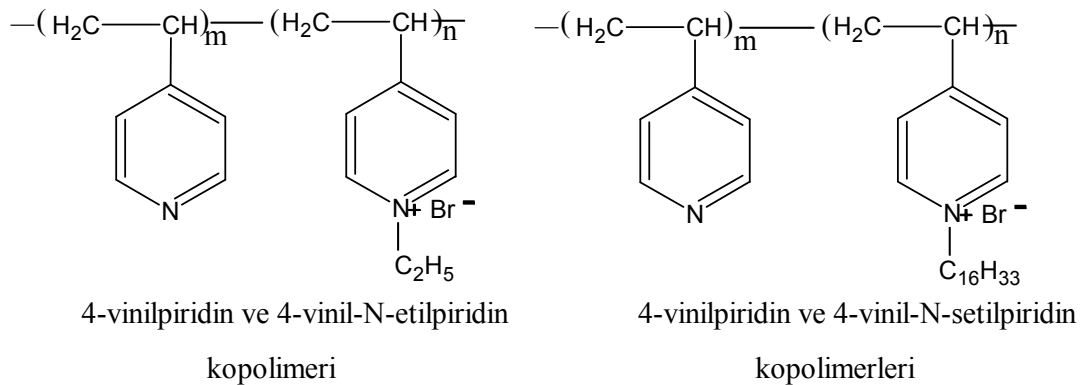
Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptener vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik

peptidlerin ya da haptenlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyoyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immünojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünebilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

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

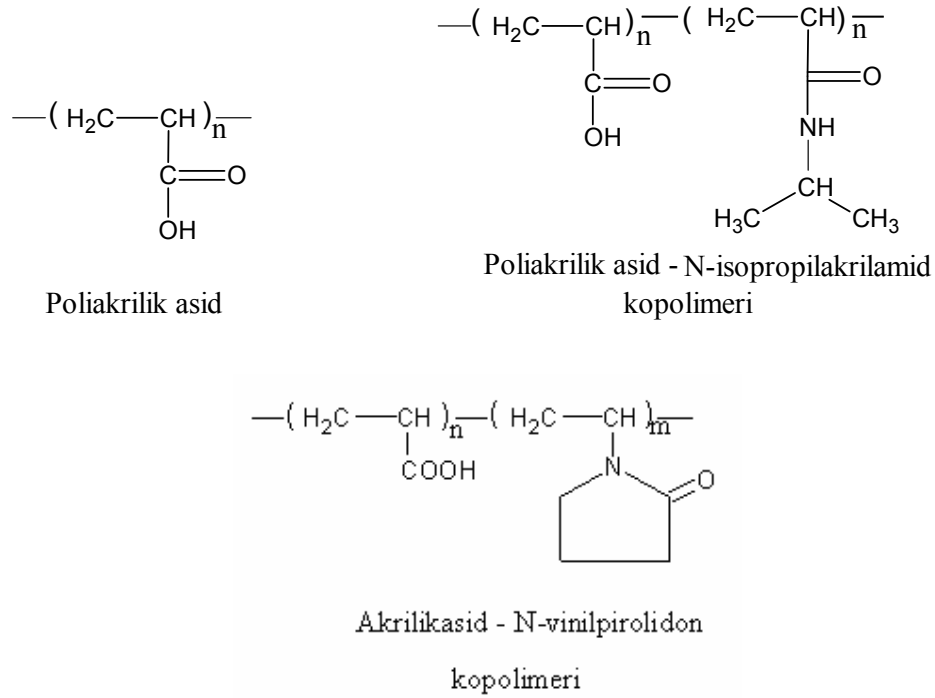
Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünojenik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımındır (Mustafaev, 1996a). Polimerik taşıyıcı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

#### → Katyonik Polielektrolitler



Şekil 2.33 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler

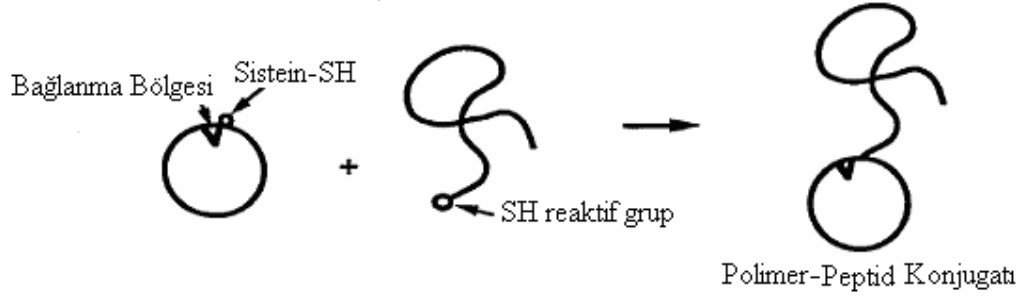
→ Anyonik Polielektrolitler



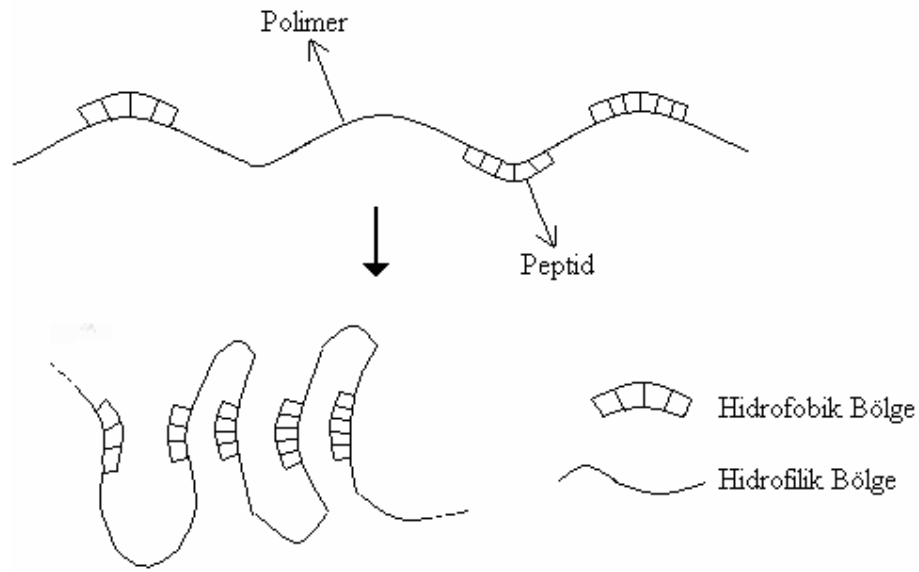
Şekil 2.34 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler

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

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



Şekil 2.35 Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000)



Şekil 2.36 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerlerle oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, Mustafaev, 2004)

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

## 2.11 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugasyon prosedürlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasal reaktiflerdir. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin

işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar (Hermanson, 1996).

Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 Å (1 Å=1x10<sup>-10</sup> m) uzunluğunda bir arabulucu (spacer) bulunmaktadır (arabulucu uzunluğu 0 Å olan bağlayıcılar özel bir alt bölüm olan Direkt Çapraz Bağlayıcılardır).

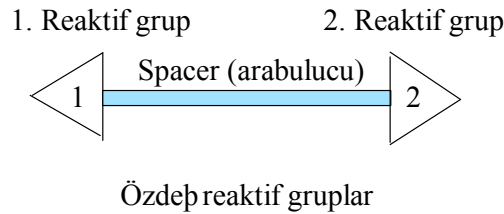
Arabulucu içeren bağlayıcıların bazı avantajları;

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

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

### 2.11.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanması ile oluşturulmuştur (Hermanson, 1996).



Şekil 2.37 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

Arabulucu moleküler bir ip gibi bir protein molekülünü diğer bir moleküle ortak reaktif gruplarına saldırarak kovalent olarak bağlamaktadır. Örneğin bir proteindeki lizine ait ε amino ya da N- ucundaki amino grubu diğer bir moleküldeki amino grubuna

homobifonksiyonel bağlayıcı aracılığı ile çapraz bağlanmaktadır. Bu şekilde iki proteini ya da diğer molekülleri birbirine bağlayabilme yetenekleri homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların farklı assay (deneme) ya da target (hedefleme) çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunun yanında homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazı dezavantajları da mevcuttur (Hermanson, 1996). Bunların başında;

- Genel olarak basit homobifonksiyonel bağlayıcıların kullanılması ile oluşturulan konjugatların yeteri kadar tanımlanamaması,
- Konjugasyon esnasında çapraz bağlayıcı tarafından aktive edilen ilk protein tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı cins protein ile çapraz bağlanabilmesi,
- Aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler konjugat oluşturabilmesi,
- Diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), üçlü (trimer) vb, oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi gelmektedir.

Bu şekilde homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında tam olarak tanımlanamayan konjugatların oluşumu önemli bir problemdir. Çünkü bu tip reaksiyonlarda tüm reaktiflerin aynı anda reaksiyon karışımına koyulması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz nedenlerden dolayı homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir (Hermanson, 1996).

Öncelikle ilk protein molekülü homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler (protein monomeri, dimeri, trimeri, vb.) uzaklaştırılarak aktive edilmiş protein saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci molekül ya da protein ile konjugat oluşumu için karıştırılır. Ancak burada da aktive edilmiş proteinin saflaştırılması sırasında hidroliz olması ya da ilk molekülün kendi arasında polimerize olması ve reaksiyon veriminin oldukça düşük kalması gibi sorunlar ile karşılaşmaktadır.

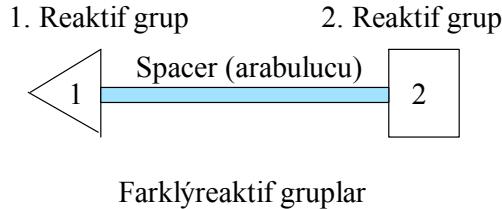
### **Seçici Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir (Aslam ve Dent, 1998).

- **Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
  1. NHS Esterleri
  2. Bis-imidoesterler
  3. Bis-aldehidler
  4. Bis-izosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar
  5. Diflorobenzen Türevleri
  6. Amino Gruplarının Yönlendirdiği Diğer Çapraz Bağlayıcılar
- **Sülfidril (Tiyol) Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
  1. Bis-maleimidler
  2. Disülfid Oluşturan Reaktifler
  3. Bis-alkil halojenürler
- **Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

### 2.11.2 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun iki ucuna farklı reaktif grupların bağlanması ile oluşturulmuştur (Hermanson, 1996).



Şekil 2.38 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

İki farklı reaktif grup, kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırarak bu moleküllerin çapraz bağlanmalarını sağlarlar. Örneğin çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon prosesinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır (Hermanson, 1996).

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu birkaç basamaktan oluşmaktadır. Tipik bir konjugasyon reaksiyonunda ilk protein (ya da peptid, makromelekül vb.) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının daha reaktif ve reaksiyona meyilli olan ucu tarafından modifiye edilir. Sonrasında modifiye protein, reaktiflerin fazlasının jel filtrasyon ya da diyaliz yoluyla uzaklaştırılması sonucu saflaştırılır. Konjugasyon için ikinci molekül ilave edilmeden aktive edilmiş ara ürünün saflaştırılması sırasında ara ürünün kararlılığını koruyabilmesi için birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, en az bir tane sulu ortamda uzun süre kararlı kalabilecek reaktif grup içerirler. Örneğin NHS-ester maleimid heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıları, aminlere karşı oldukça reaktif olan NHS ucu ile proteine bağlanıp molekülün modifikasyonunu gerçekleştirirken, maleimid fonksiyonel grubunun kararlılığından dolayı ara ürünün aktivitesi korunmaktadır. Çünkü maleimid grubu sulu çözeltilerde NHS esterlere göre daha karardır. Hızlı bir saflaştırma işleminden sonra ikinci molekül (sülfidril grubu içeren) ortama eklenerek maleimid ucu ile ilk moleküle çapraz bağlanması sağlanır. Bu şekilde çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat ürününün molekül boyutu ve çapraz bağlı üründeki bileşen oranları üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır. Konjugatın konfigürasyonu ve ya da yapısı ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak ikinci proteinin konjugasyon reaksiyonuna eklenecek miktarı ayarlanarak düzenlenebilmektedir (Hermanson, 1996). Bu şekilde kullanım amacına göre; düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar elde edilebilir.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar konjugasyon reaksiyonlarında hedef molekülün özel bir bölgesine karşı spesifik yönlendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan bağlanma gerçekleştiren ve UV ışınlama ile aktive edilen bir adet fotoreaktif gruba sahip olabilirler.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı fonksiyonel grubun yanı sıra bunları birbirine bağlayan bir adet de arabulucu (spacer) içerirler. Çapraz bağlayıcılar her zaman yalnızca reaktivitelerine göre değil bazen de sahip oldukları arabulucunun boyutuna ve özelliğine göre seçilip kullanılabilirler.

### **Seçici Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir (Aslam ve Dent, 1998).

- **Amino ve Süldifril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Karbonil ve Süldifril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Amino Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Süldifril Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Karbonil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Karboksil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Arjinin Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
- **Amino ve Karboksil Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

### **2.11.3 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar**

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

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

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

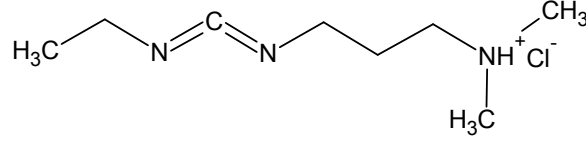
### 2.11.3.1 Karbodiimidler

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

### EDC

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

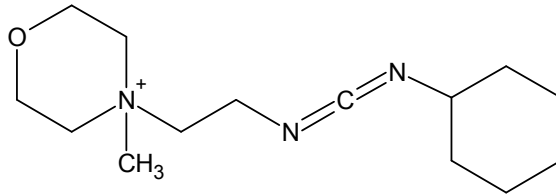
hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasalın aktivitesini kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir.



Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Yamada vd., 1981; Chase vd., 1983; Chu vd., 1976; Chu ve Ueno, 1977). Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu  $\delta^+$  yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisoüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir (Williams ve Ibrahim, 1981). Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örneğin sülfidril grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir.

### CMC

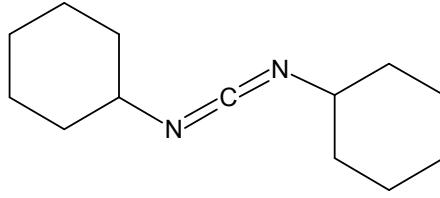
Suda çözünebilir özellikteki 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin konjugasyonunda kullanılmaktadır. Moleküle suda çözünebilme özelliğini sağlayan yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubudur (Hermanson, 1996).



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

### DCC

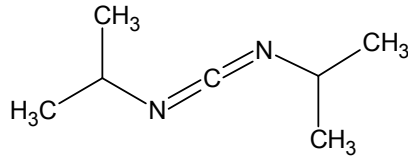
Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir ve 80 °C'a kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilir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



DCC = N,N' Disiklohegzil karbodiimid

**DIC**

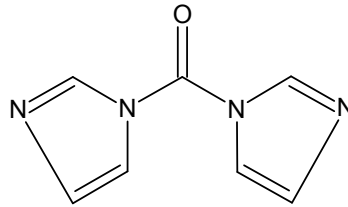
Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir (Hermanson, 1996).



DIC = Diizopropil karbodiimid

**N,N-Karbonildiimidazol**

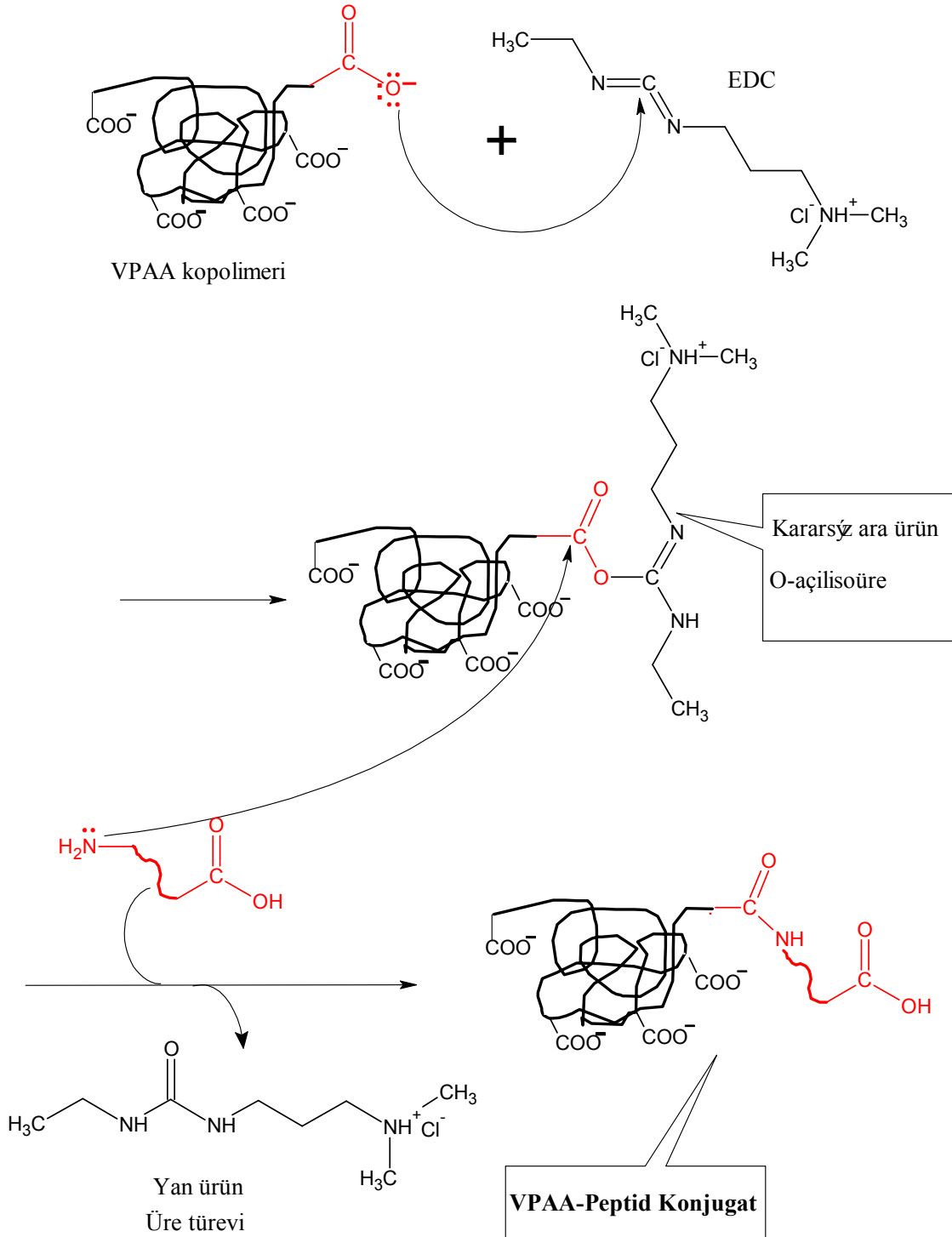
N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diğer bir direkt çapraz bağlama reaktifidir (Hermanson, 1996).



CDI = N,N'-Karbonildiimidazol

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

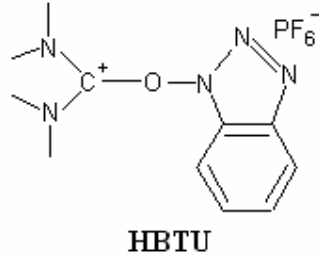
### EDC ile Konjugasyonun Genel Reaksiyon Mekanizması



Şekil 2.39 EDC kullanılarak sentezlenen VP/AA-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması

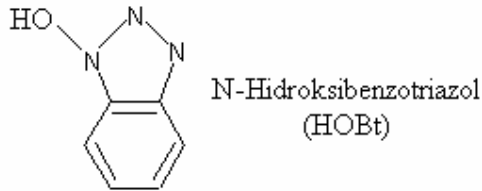
## 2.11.4 Organik Ortamda Konjugat Sentezinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar

### 2.11.4.1 *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uranyum heksaflorofosfat (HBTU)

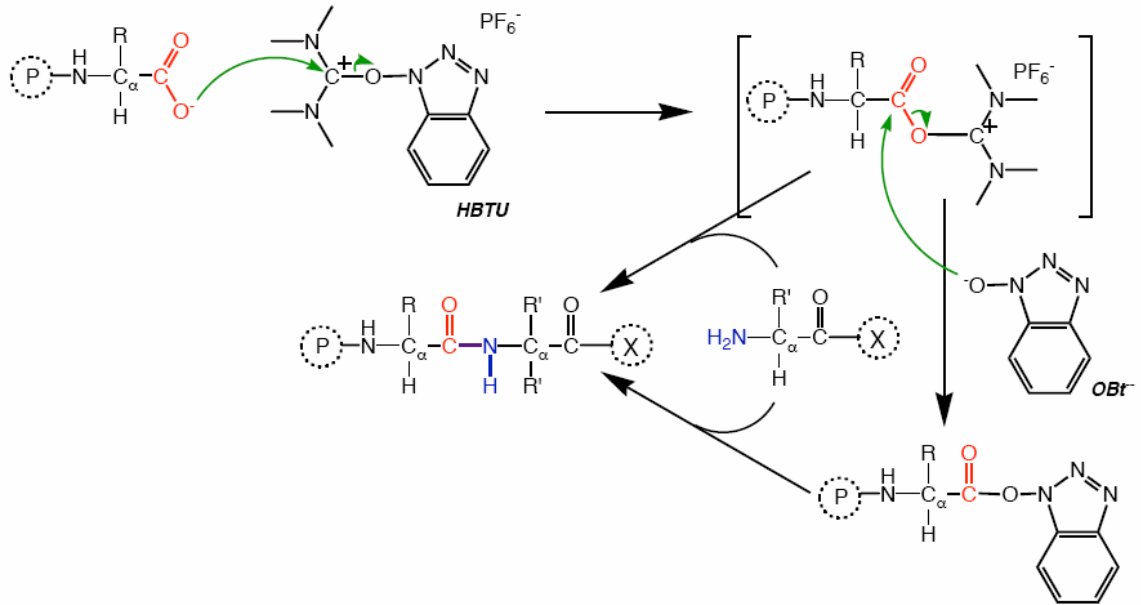


### 2.11.4.2 1-Hidroksilbenzotriazol hidrat ( $C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$ ) (HOBt)

HOBt reaktifi, iyi ayrılabilen bir aktif ester grubu oluşturduğu için, verimli bir bağlanma sağlar ve bu yüzden de daha çok tercih edilmektedir (Chang ve White, 2000).



### HOBt ile Konjugasyonun Genel Reaksiyon Mekanizması



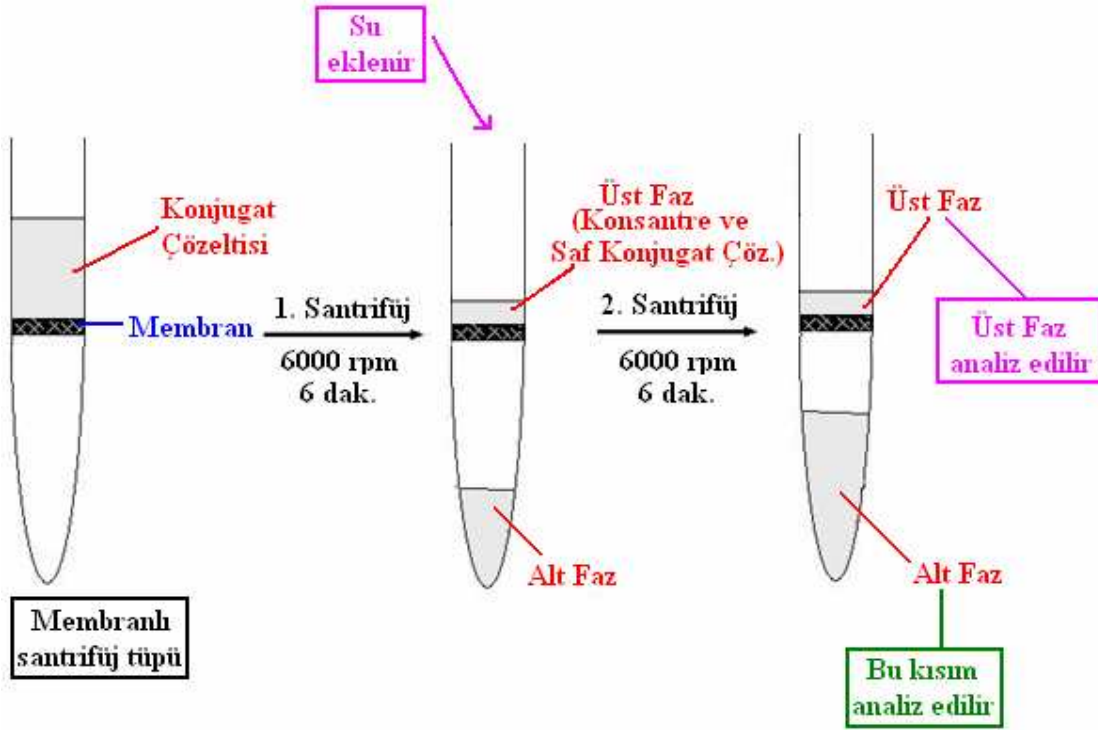
Şekil 2.40 HOBt kullanılarak VP/AA-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması

## 2.12 Konjugatların Saflaştırılması

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

### 2.12.1 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip mebranları içeren santrifüj tüpleri konjugatların istenmeyen küçük moleküllerden ayrılmasında kullanılmaktadır. Bunun için ayrılacak çözelti membranlı tüpe konulur ve tüpün değişen devir ve sürede santrifüjlenmesi sonucu membranın gözeneklerinden daha küçük moleküllerin geçerek alt fazda toplanması ile büyük moleküller (konjugat) üst fazda kalırlar. Böylelikle konjugat hem saflaştırmış hem de konsantre edilmiş olur [14].



Şekil 2.41 Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi

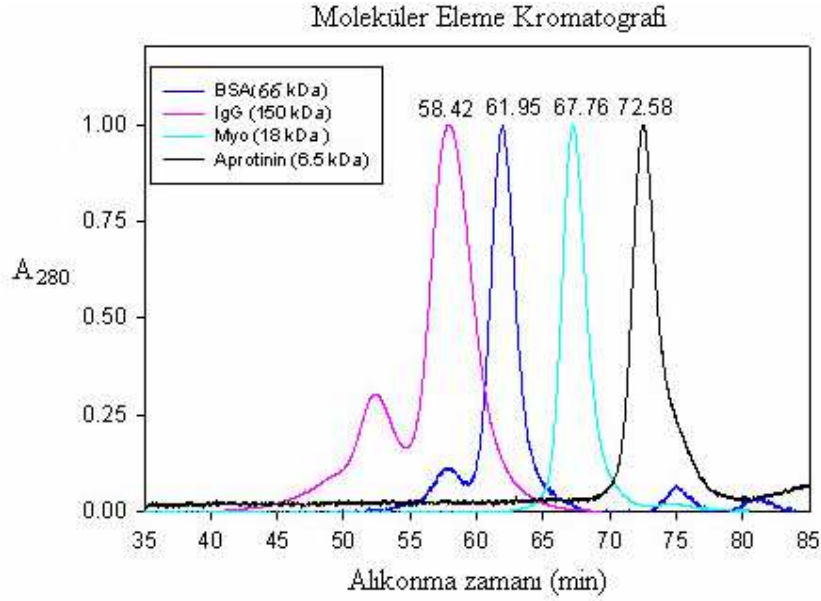
### 3. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

#### 3.1 Moleküler Eleme Kromatografisi

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

Moleküler Eleme Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak likit kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır [15]. Monomerik, oligomerik ya da polimerik çoklu bileşenli sistemler, mikro gözeneklere sahip jelde, moleküler eleme prensibine göre ayrılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan protein, peptid gibi biyolojik moleküllerin molekül boyutları birbirlerinden farklıdır. BSA çözeltilerinde; monomer, dimer ve trimer olarak bulunmaktadır. Çalıştığımız şap hastalığı peptidi ise BSA ya göre çok daha küçük bir molekül boyutuna sahiptir. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan serbest peptid, N-metilimidazol ya da üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan BSA gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır (Şekil 3.1) [16]. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Viskozite, Işık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.



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

### 3.2 Floresans Spektroskopisi

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

Çalışmamızda kullanılan Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin -N terminal uc kısmına eklenen tritofan amino asidi ile yapıya floresans özelliği kazandırıldı.

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

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

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

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

### 3.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

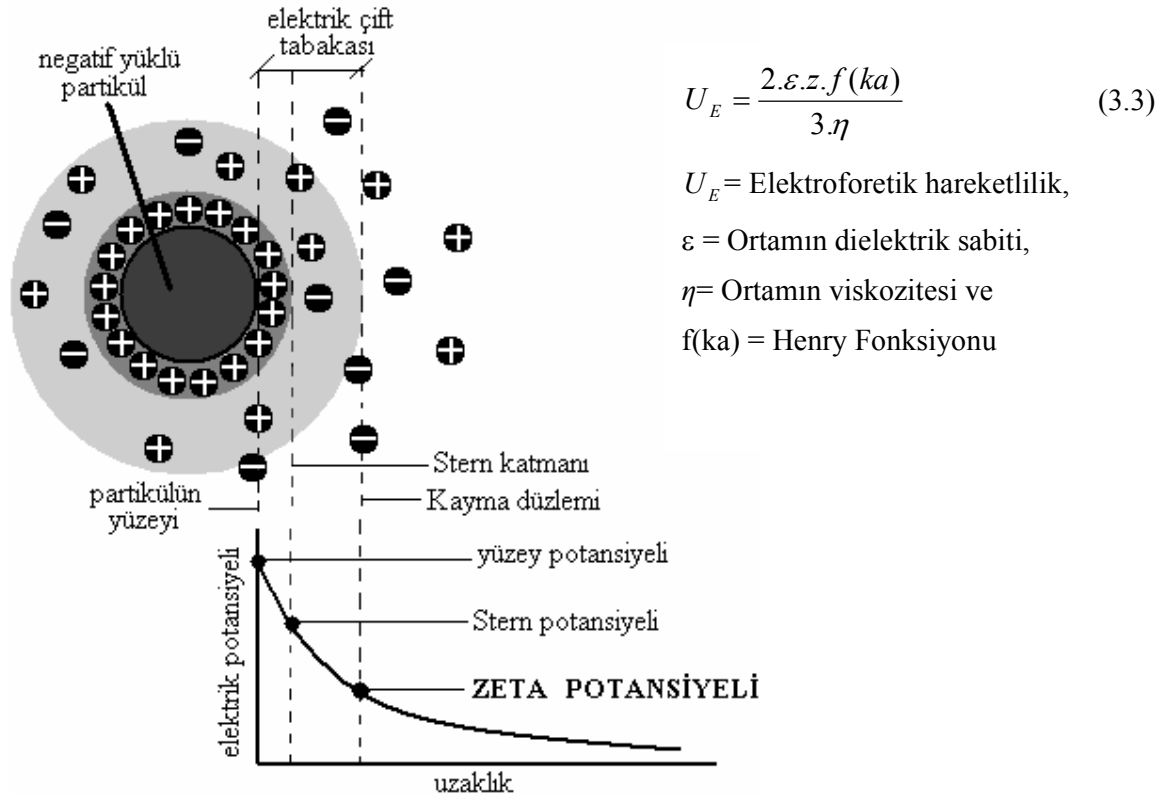
En az bir boyutu 1nm–1µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir.

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C'de Foton Kolerasyon Spektroskopisi Yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Viskozitenin 0.8872 cP ve kırılma indisinin 1.33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0.22 µm'lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden  $G_2(\tau)$  saçılma şiddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonksiyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidispersite sabiti hesaplanır. Boyut değeri, Stokes-Einstein denkleminde bulunur.

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad k = \text{Boltzman Sabiti, } T = \text{Mutlak sıcaklık, } \eta = \text{Çözücü viskozitesi} \quad (3.2)$$

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının Zeta Potansiyeli analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroforez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Viskozitenin 0.8872 cP, dielektrik sabitinin 79; f(ka)'nın 1.50 (Smoluchowski) olarak alındığı 25°C'de ki ölçümlerde tüm çözeltiler 0.22 µm lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir.

Çalışmamızda zeta potansiyel ölçümü için pH=7’de negatif yüklü olan VP/AA kopolimeri ve peptid molekülü temel alınmıştır. VP/AA-peptid biyokonjugat partikülleri ortamda bulunan iyonlarla girdiği elektrostatik etkileşim sonucu pozitif iyonları çekerken negatif iyonları da iterek partikül yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağlı olduğu ve Stern katmanı denilen bir tabaka oluşturmaktadır. Stern katmanından sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi mevcuttur. Difüz bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen bir **Kayma düzlemi** vardır ve bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte hareket etmeye zorlanırken, dışında kalanlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline **Stern potansiyeli**, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise **Zeta Potansiyeli** denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminde hesaplanmaktadır.



Şekil 3.2 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual)

## 4. DENEYSEL KISIM

### 4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

#### 4.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Liberty Peptid Sentez Cihazı (CEM)
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Viskotek 4 Dedektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viskotek TDA 302 üçlü dedektör dizisi, Viskotek Model 2501 UV dedektörü, Viskotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Zetasizer Nano ZS
- Precisa XB 220A Hassas Terazi
- Sartorius CP225D Hassas Terazi
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrometre
- ThermoLab System Mikroplaka Yıkayıcı 4MK2
- ThermoLab System Multiskan Ascent Mikroplaka okuyucu
- Heidolph MR 3001 Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvü
- Finnpiquette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Saf su Cihazı
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.22 µm
- WTW pH level 1 pH metre
- Hanna pH221 pH metre
- Heidolph Reax top Karıştırıcı

#### 4.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Kimyasal Maddenin Üretildiği Firma
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 170-188 dizilimli sentetik peptidi	
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 135-161 dizilimli sentetik peptidi	
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 40-60 dizilimli sentetik peptidi	
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 200-213 dizilimli sentetik peptidi	
Polivinil pirlidin akrilik asid kopolimeri (25/75) $M_w$ 80 000	
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropil) kardobodimid hidrasklorür (EDC)	Sigma E7750
4-nitrofenil Fosfat	Sigma 3254
Antimouse Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz	Sigma A0162
Borik Asid ( $BH_3O_3$ )	Applichem A2940
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma A 7030
Dimetilsülfoksid (DMSO)	Ambresco 0231
Floreskamin	Sigma F9015
Glukoz, Sigma Ultra %99,5 GC	Sigma G7528
Glycin	Applichem A 1067
Hidroklorik Asid (HCL)	Riedel-de Haen 07102
Magnezyum klorid ( $MgCl_2$ )	Applichem A 1036
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Fluka 71647
Oktan	Sigma O2001
Poliakrilik asid ( $M_w$ 100 000)	Aldrich 523925
Sitrik asid Monohidrat	Fluka 27490
Sodyum azid ( $NaN_3$ )	Applichem A1430

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haen 04361
Sodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka 71647
Sodyum klorür (NaCl)	Fluka 71376
Süt Tozu (Casein)	Sigma C 7078
tri-Sodyum sitrat	Merck 1,06431
Tween 20	Appllichem A1389
1-Hidroksilbenzotriazol hidrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O·xH <sub>2</sub> O)	Fluka 15440
<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uranyum hexafluorofosfat (C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> F <sub>6</sub> N <sub>5</sub> OP)	Fluka 12804
Dimetilformamid (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ON)	Merck 1,03034,2500
sodyum bis (2-etilheksil) sülfosüksinat (AOT; C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> NaO <sub>7</sub> S)	Acros Organics 577-11-7
Diizopropil etilendiamin (DIEA)	Fluka
N-Metil pirilidon (NMP)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-HAM F12)	Biological Ind. 01-170-1
Fetal Calf Serum (FCS)	Biological Ind. 04-007-1A
3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid	Sigma M5655

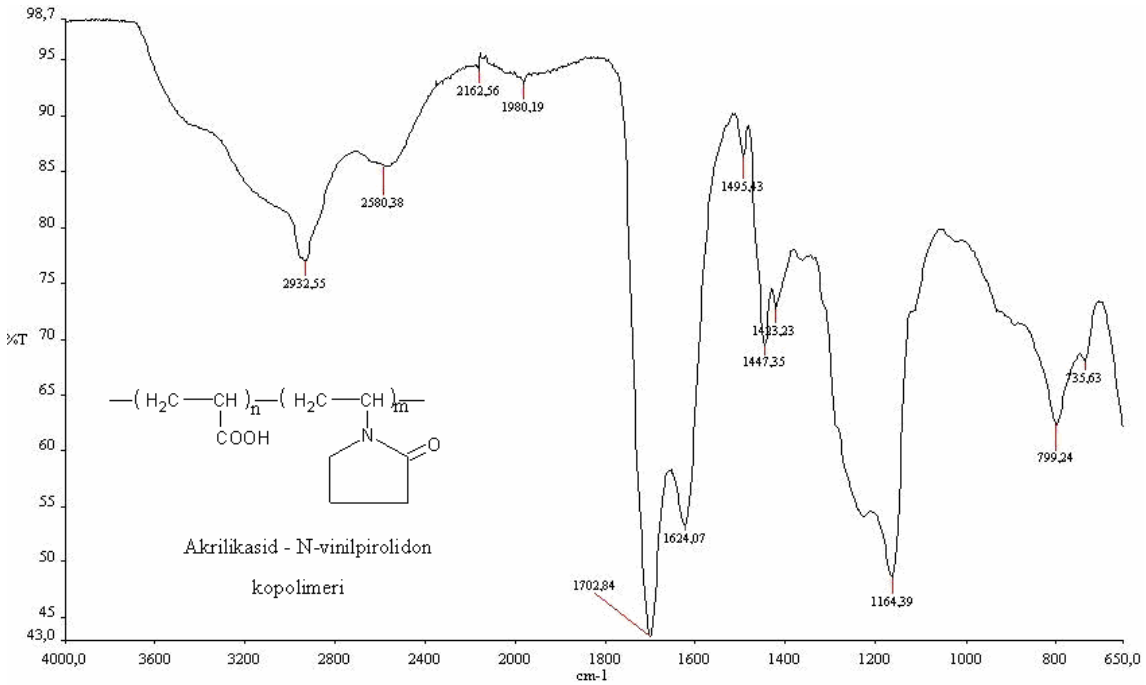
## 4.2 Vinil prilidon-Poliakrilik asid (VP/AA) Kopolimerleri

*Vinil prilidon-akrilik asid (25/75) Kopolimeri:* Molekül ağırlığı 80.000 olan bu kopolimer, bölümümüzde Uelzmann ve arkadaşlarının (1958) yöntemi ile sentezlenmiştir.

*Vinil prilidon-akrilik asid (50/50) Kopolimeri:* Molekül ağırlığı 80.000 olan bu kopolimer, bölümümüzde Uelzmann ve arkadaşlarının (1958) yöntemi ile sentezlenmiştir.

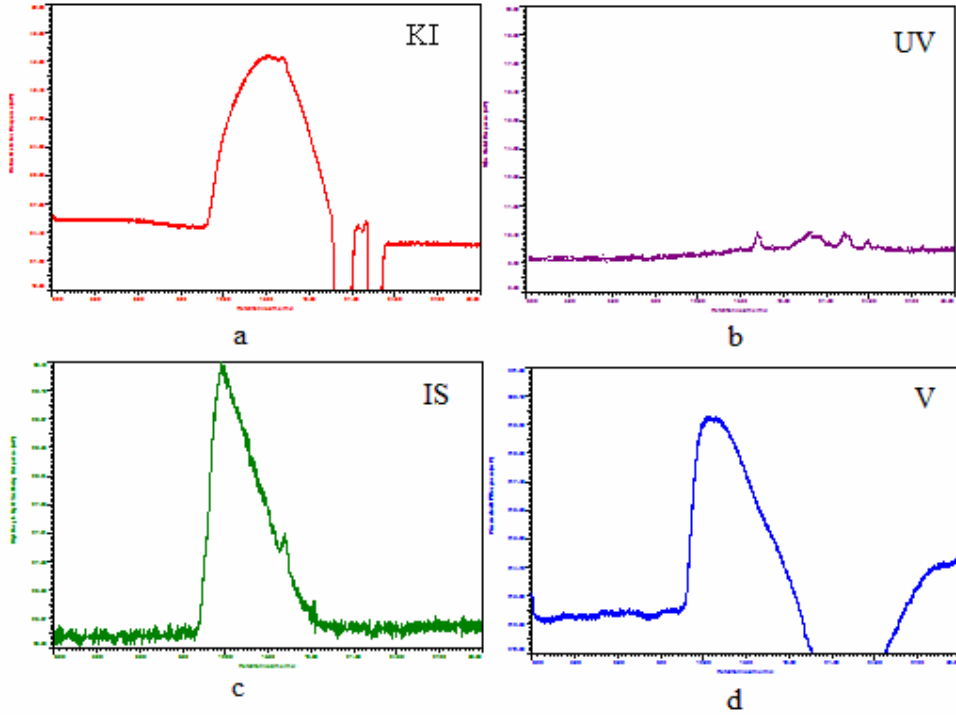
*Poliakrilik asid (PAA) :* Molekül ağırlığı 100.000'dir.

Molekül ağırlığı 80.000 olan vinil prilidon-akrilik asid (25/75) kopolimerinin Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) cihazından alınan infrared spektrumu:

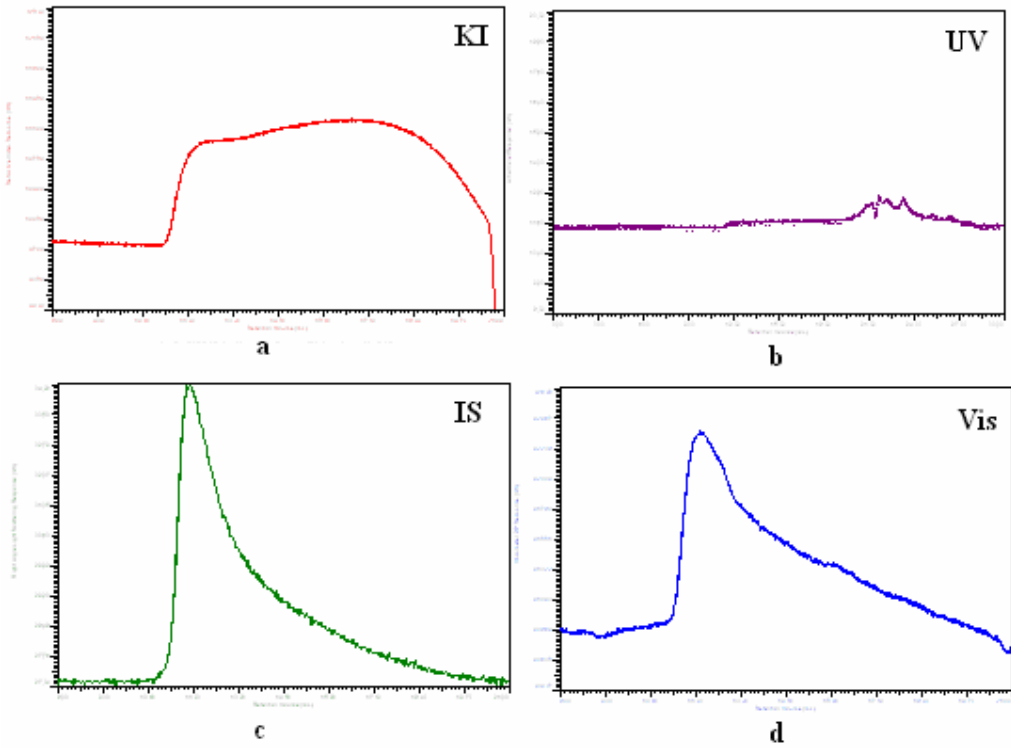


Infrared spektrumu incelendiğinde; 3300-2400  $\text{cm}^{-1}$  de C-H gerilme bandı ile çakışan O-H bandı görülmektedir. 1800-1650  $\text{cm}^{-1}$  de C=O şiddetli keskin piki görülmektedir. 1360-1180  $\text{cm}^{-1}$  de C-N kuvvetli gerilme bandı görülmektedir.

Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M fosfat tamponu (PBS), %0.05 sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen Viskotek cihazında yapılan analiz sonuçları:

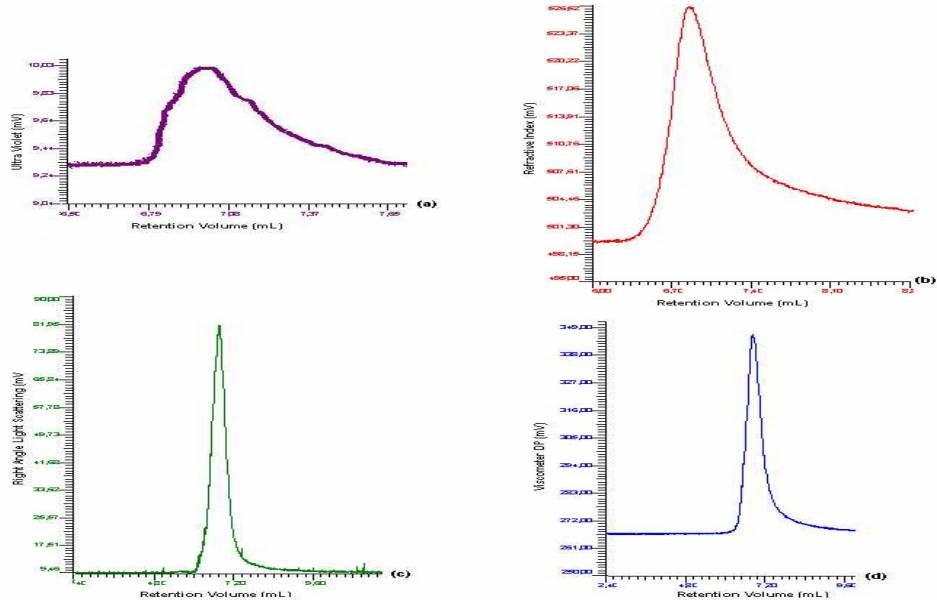


Şekil 4.2 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış % 0.05 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimerine ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



Şekil 4.3 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış % 0.05 VP/AA (50/50; Mw 80.000) Kopolimerine

ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



Şekil 4.4 0.01 M PBS pH 7 içerisinde hazırlanmış % 0.05 PAA çözeltisinin Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

VP/AA (25:75 ve 50:50; Mw 80 000) kopolimerinin ve PAA (Mw 100 000) polimerinin dört detektörlü Viskotek cihazından alınan sonuçlar incelendiğinde; bu kopolimer ve polimerin UV özelliğine sahip olmadığı görülmektedir.

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

Şap Hastalığı Virüsüne karşı sentetik aşı geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılan peptid dizileri Sigma Genosys firması tarafından Fmoc Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile % 91 saflıkta sentezlendi. Ayrıca, 25-DPT-07-04-01 'Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular' projesi kapsamında Büymühendislik Bölümü Laboratuvarlarına alınan Liberty Peptid Sentez Aleti (CEM) ile bu peptid dizileri yeniden sentezlendi. Bu peptid dizilerinin analizleri LC-MS cihazında yapıldıktan sonra Şap Hastalığına karşı sentetik aşı geliştirilmesi amaçlı çalışmalarımızda kullanıldı. A<sub>22</sub> serotip Şap hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin fonksiyonel antijen özelliği taşıyan 40-60. 135-161, 170-188, 200-213 peptid dizileri –N terminal ucunda hem triptofan (trp) amino asidi eklenerek, hem de triptofan

amino asidi eklenmeden sentezlendi. Peptid dizilerine eklenen triptofan amino asidi floresans verme özelliğine sahip olduğundan sentezlenen biyokonjugatların yapı ve karakterizasyonunun belirlenmesinde önemli bir rol oynadı.

Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 40 – 60 Peptid Dizisi:

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

Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135- 161 Peptid Dizisi

**Trp**-Ser-Lys-Tyr-Ser-Thr-Thr-Gly-Glu-Arg-Thr-Arg-Thr-Arg-Gly-Asp-Leu-Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Thr-Gln-Leu-Pro-Ala

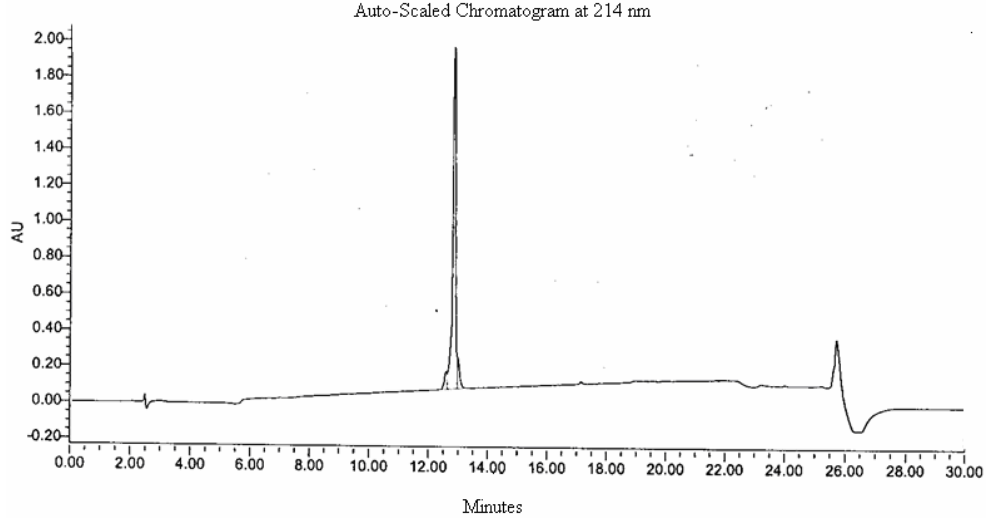
Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi:

**Trp**- Ala-Thr-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu-Tyr-Cys-Pro

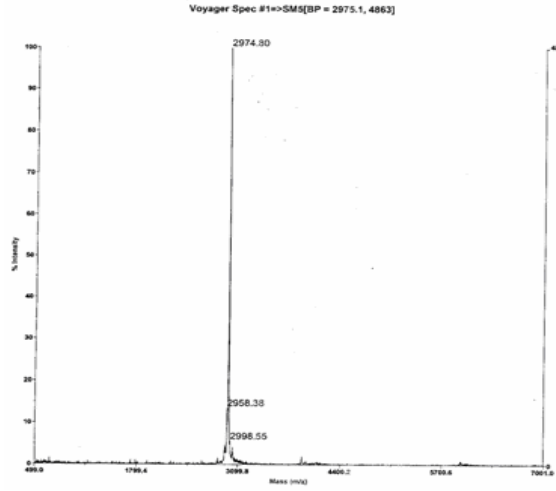
Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 200 -213 Peptid Dizisi:

**Trp**-Asp-Arg-Lys-Gln-Arg-Ile-Ile-Ala-Pro-Ala-Lys-Gln-Leu

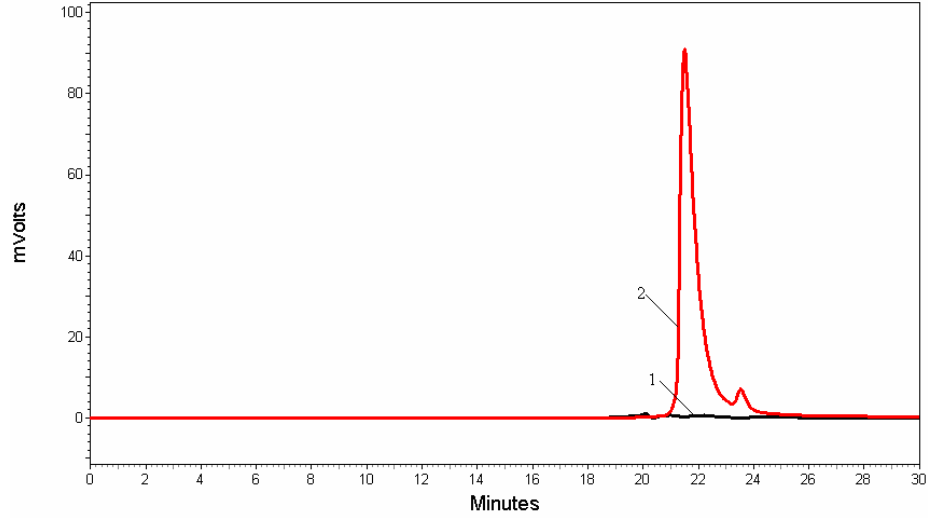
Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M PBS, %0.05 NaN<sub>3</sub> pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen serbest Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid proteininin 135-161 peptid dizisine (**Trp**-Ser-Lys-Tyr-Ser-Thr-Thr-Gly-Glu-Arg-Thr-Arg-Thr-Arg-Gly-Asp-Leu-Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Thr-Gln-Leu-Pro-Ala) ait HPLC, MS, Viskotek ve Floresans cihazlarına ait analiz sonuçları:



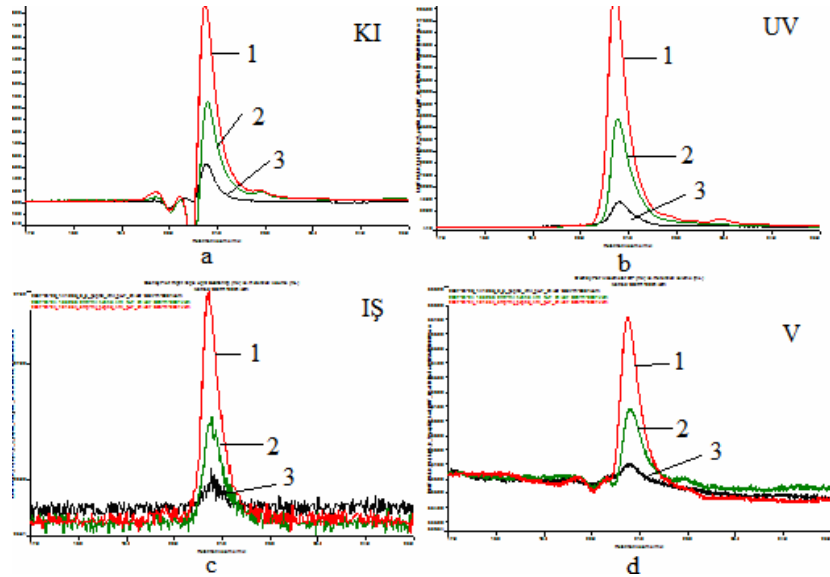
Şekil 4.5 Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı.



Şekil 4.6 Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1 mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı



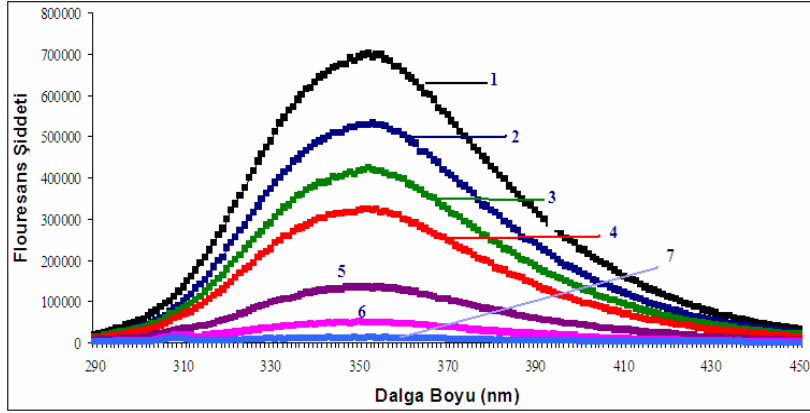
Şekil 4.7 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri **(2)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.8 Sigma Genosys tarafından sentezlenen **(1)** % 0.1, **(2)** % 0.05, **(3)** % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisine ait Viskotek Kırılma Indisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

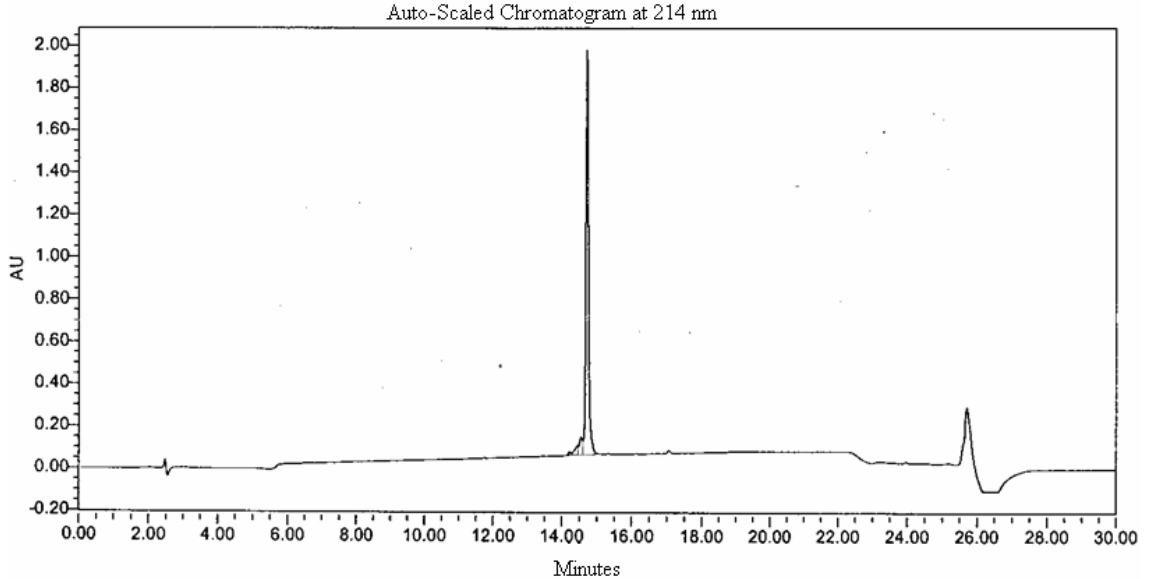
Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellik taşıyan 135-161 peptid dizisinin ters faz HPLC kromatogramı ile peptidin saflığı, MS kromatogramı (toplam iyon kromatogramı) ile de moleküler ağırlığı açıklandı. Ayrıca dört detektörlü (Kırılma Indisi, UV, Işık Saçılması ve Viskozite Dedektörleri) Viskotek cihazında farklı peptid konsantrasyonları incelendi. Aynı peptid dizisinin floresans spektrumunda

konsantrasyona bağlı floresans şiddet değişimi incelendi.

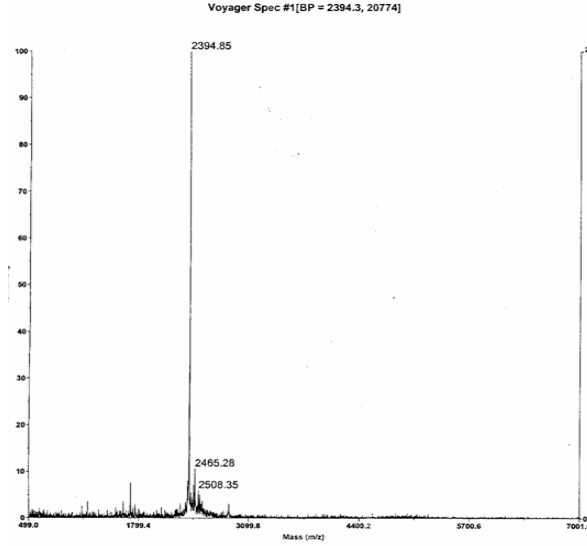


Şekil 4.9 Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen **(1)** % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm; **(2)** % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm; **(3)** % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 352$  nm; **(4)** % 0.008 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm; **(5)** % 0.004 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm; **(6)** % 0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm; **(7)** % 0.0002 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 Peptid Dizisi  $\lambda_{\max} = 353$  nm ait Floresans Spektrumu.

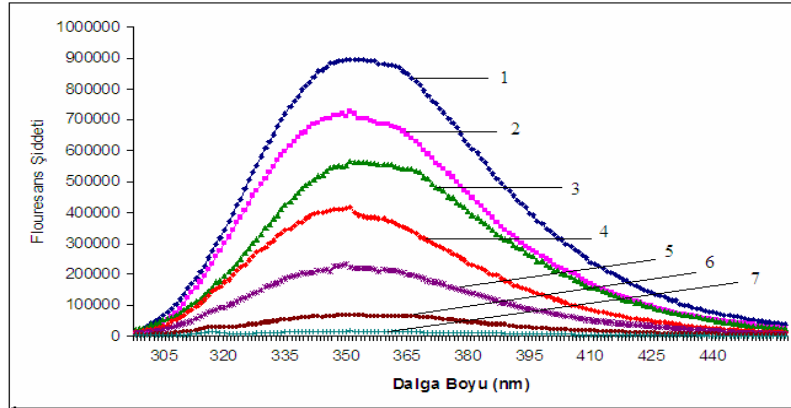
Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin fonksiyonel antijenik özellikli 170-188 dizisi (**Trp-Ala-Thr-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu-Tyr-Cys-Pro**) ait HPLC, MS ve Floresans cihazlarına ait analiz sonuçları:



Şekil 4.10 Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisinin 1mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC kromatogramı.



Şekil 4.11 Sigma Genosys tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisinin 1 mg/ml'sine ait Discovery Bio Wide Pore C-18 kolonda; Mobil faz A: %0.1 TFA/Su, Mobil Faz B: %0.1 TFA/Asetonitril; % 67.5 B Elüsyon Gradientinde yapılan toplam iyon kromatogramı

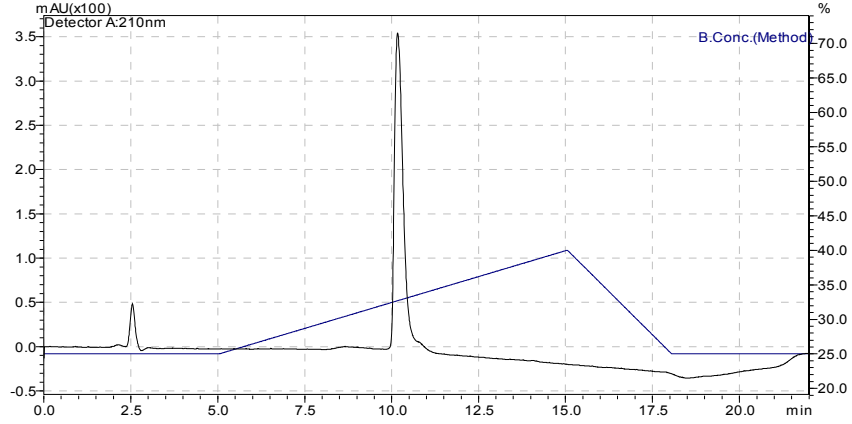


Şekil 4.12 Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen **(1)** % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(2)** % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(3)** % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(4)** % 0.008 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(5)** % 0.004 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(6)** % 0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm; **(7)** % 0.0002 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisi  $\lambda_{max} = 352$  nm ait Floresans Spektrumu.

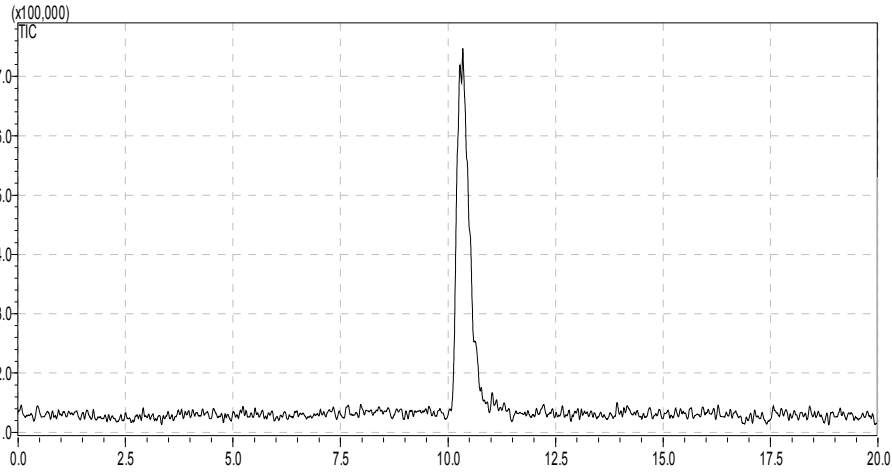
Sigma Genosys firması tarafından sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellik taşıyan 170-188 peptid dizisinin ters faz HPLC kromatogramı ile peptidin saflığı, MS kromatogramı (toplam iyon kromatogramı) moleküler ağırlığı açıklandı. Farklı peptid konsantrasyonları peptid dizisinin floresans spektrumunda konsantrasyona bağlı floresans

şiddet değişimi incelendi.

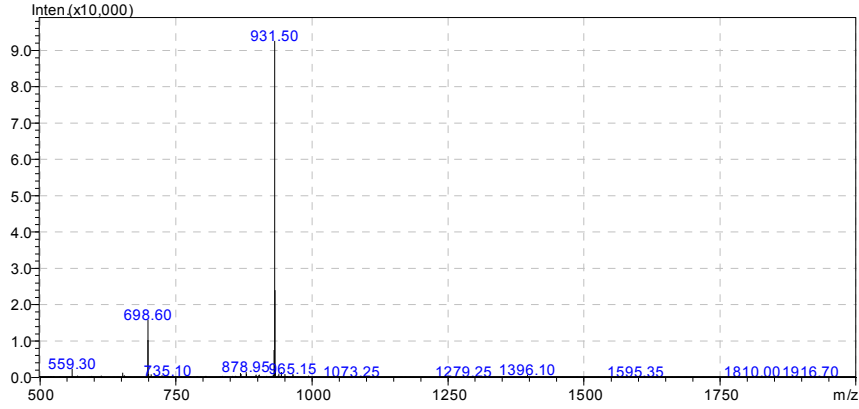
Biyomühendislik Bölümünün peptid laboratuvarlarında Liberty Peptid Sentez (CEM) Cihazı ile sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizisinin (-N terminal ucunda trp amino asidi içermeyen) LC-MS cihazı ile analizleri yapıldı. Analizler sonucunda iyon spektrumu sonucuna göre Mw 2791 olarak bulundu.



Şekil 4.13 Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5 µm, 20x0.21cm Kolon, 25°C Oda Sıcaklığı, 0.2 ml/dak Akış Hızı, Mobil faz A: Su, %0.1 TFA, Mobil faz B: Asetonitril, %0.1 TFA, %25-40 B Elüsyon Gradientinde yapılan Ters Faz HPLC Kromatogramı.



Şekil 4.14 Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5 µm, 20x0.21cm Kolon, 25°C oda Sıcaklığı, 0.2 ml/dak Akış Hızı, Mobil faz A: Su, %0.1 TFA, Mobil faz B: Asetonitril, %0.1 TFA, %25-40 B Elüsyon Gradienti, 1,5 kV Dedektör Voltajı, 1,5 L/dak Gas Akış Hızı, 300 °C CDL Sıcaklığında yapılan Toplam İyon (Kütle Spektrometri) Kromatogramı



Şekil 4.15 Toplam iyon kromatogramındaki 10-11. dakikalar arasındaki pikin kütle spektrumu. Spektrumdaki pikler  $931,50=(M+3H^+)$ ,  $698,60=(M+4H^+)$ ,  $559,30=(M+5H^+)$  iyonlarına aittir.

#### 4.4 Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlarının Sentezi

Sentetik polianyon VP/AA kopolimerinin, A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 yapısal kapsid proteininin peptid epitopları ile kovalent bağlanması sonucu immünoestimule edici (antijenik) ve koruyucu özellik taşıyabilen suda çözünebilir polimer-peptid biyokonjugatlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı yöntemle, bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında sentezlenen biyokonjugatların yapı ve karakterizasyonu kromatografik (HPLC, VİSCOTEK [Dört Dedektörlü-UV, Kırılma İndisi, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), florimetrik yöntemlerle araştırıldı. Bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında sentezlenen biyokonjugatların antijenik özelliklerini incelemek amaçlı farelere immünüzyasyonları yapıldı.

Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren biyokonjugatların sentezinde kullanılan metotlar 3 başlık altında toplanmıştır:

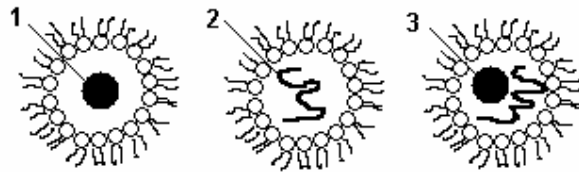
1. Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) sentetik polianyon VP/AA kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren biyokonjugatların sentezi
2. Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrator (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında sentetik polianyon VP/AA kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren

biyokonjugatların sentezi

3. Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak, organik ortamda sentetik polianyon VP/AA kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren biyokonjugatların sentezi

#### 4.4.1 Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezi

Polimer-peptid, protein-protein, protein-peptid kovalent konjugasyon reaksiyonlarında geleneksel metodlar kullanıldığında karşılaşılan çeşitli problemlerden ve sınırlamalardan dolayı farklı sistemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi de; suyun, organik çözeltilerde yüzey aktif maddelerle kararlaştırılmış mikroemülsiyonlarında yani hidratlanmış dengeli misel sistemlerinde (hydrated reversed micelle systems-HRM) konjugasyonun gerçekleştirilmesidir (Volkov vd 2003; Valdez vd., 1993; Armando vd., 1992; Kumar vd., 1992). Bu yöntemde dayanarak insuline karşı monoklonal antikorların, kimotripsinin, sığır serum albuminin vb., polielektrolitler (alkilleştirilmiş polivinilpiridin ve bunların farklı kopolimerleri) ile kovalent biyokonjugatları sentezlenmiş ve yaklaşık %90'a yakın verim elde edilmiştir. HRM sisteminde stafilokok enterotoksin A ile insulin antikorları arasındaki kovalent biyokonjugasyon reaksiyonu yüksek verimle sonuçlanmıştır (Morris vd., 1994). Bu tez çalışmasında, Şap hastalığı virüsünün farklı peptid epitoplarının PE'lerle kovalent biyokonjugatlarının HRM sistemlerinde sentez teknolojisinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 4.16 HRM şematik gösterimi, peptid molekülü (1), suda çözünebilir lineer Polielektrolit (2) ve peptid- lineer polimer konjugat (3)

##### 4.4.1.1 Kullanılan Çözeltiler

###### ❖ 0.3 M Sodyum bis (2-etilhekzil) sülfosüksinat (Aerosol OT) Hazırlanması

5.33 g sodyum bis (2-etilhekzil) sülfosüksinat ( $C_{20}H_{37}NaO_7S$ ; Fw=444.55) tartılarak 40 ml n-oktan ( $C_8H_{18}$ ; Fw=114.2) içerisinde çözünür. Çözelti 0.22  $\mu m$  çapa sahip polietersülfon (PES)

membranlı filtreden geçirildi.

❖ **PAA Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

Deneylerde % 35'lik Mw=100.000 olan PAA çözeltisi kullanıldı. Ara stok çözelti hazırlandı.

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

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

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

Ana stoktan 2 ml PAA alındığında;

$$\begin{array}{rcl} 2.85 \text{ } \mu\text{l'sinde} & 1 \text{ mg PAA varsa,} & \\ 2000 \text{ } \mu\text{l'sinde} & \mathbf{X} & \\ \hline \end{array}$$

$$\mathbf{X} = 701.75 \text{ mg PAA vardır.}$$

Bu 2 ml (701.75 mg) PAA çözeltisini 2 ml saf su ile dilue edersek ( $V_T = 4 \text{ ml}$ );

$$\begin{array}{rcl} 701.75 \text{ mg PAA} & 4 \text{ ml'deyse} & \\ 1 \text{ mg PAA} & \mathbf{X} & \\ \hline \end{array}$$

$$\mathbf{X} = 5.7 \text{ } \mu\text{l'sinde } 1 \text{ mg PAA bulunur.}$$

Böylece, elimizde 5.7  $\mu\text{l'sinde}$  1 mg PAA olan 4 ml ara stok çözeltimiz olur. Deneylerimizde kullanılan bütün PAA'lar bu ara stok çözeltiden uygun miktarlar hesaplanarak kullanıldı.

❖ **% 0.1 BSA Çözeltisi**

10 mg BSA tartılarak 10 ml 0.01 M PBS pH 7 içerisinde çözülür. pH 7'ye ayarlanır.

#### 4.4.1.2 Hesaplamalar

$$W_0 = \frac{\frac{n_{H_2O}}{V_T}}{\frac{n_{AOT}}{V_T}} = 5,10,15,20,25,30,35,40$$

Wo= Hidratasyon Derecesi

$$W_0 = \frac{\frac{55 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 55 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 55 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 5$$

$$W_0 = \frac{\frac{108 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 108 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 108 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 10$$

$$W_0 = \frac{\frac{162 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 162 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 162 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 15$$

$$W_0 = \frac{\frac{216 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 216 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 216 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 20$$

$$W_0 = \frac{\frac{270 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 270 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 270 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 25$$

$$W_0 = \frac{\frac{324 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 324 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 324 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 30$$

$$W_0 = \frac{\frac{378 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 378 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 378 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 35$$

$$W_0 = \frac{\frac{432 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \times \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 432 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 432 \cdot 10^{-3}) \text{ ml}}} = 40$$

$$W_0 = \frac{\frac{486.10^{-3} \text{ ml} \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 486.10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 486.10^{-3}) \text{ ml}}} = 45$$

$$W_0 = \frac{\frac{540.10^{-3} \text{ ml} \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 540.10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 540.10^{-3}) \text{ ml}}} = 50$$

$$W_0 = \frac{\frac{594.10^{-3} \text{ ml} \left(\frac{1 \text{ gr}}{\text{ml}}\right)}{\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2 + 594.10^{-3}) \text{ ml}}}{\frac{\frac{0.3 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}}{(2 + 594.10^{-3}) \text{ ml}}} = 55$$

#### 4.4.1.3 Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Hazırlanması

İlk aşamada; sodyum bis(2-etilhekzil)sülfosüksinat ( $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{S.Na}$ ) (AOT) oktan ( $\text{C}_8\text{H}_{18}$ ) içerisinde çözüldürülerek misel sistemleri oluşturuldu. 0.3 M 2 ml AOT misel sistemine artan hacimde (54  $\mu\text{L}$ , 108  $\mu\text{L}$ , 162  $\mu\text{L}$ , 216  $\mu\text{L}$ , 270  $\mu\text{L}$ ) su eklendi ve 4 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldıktan sonra AOT misel iç çapının hidrasyon derecesine ( $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Surfaktant}]$ ) bağlı hidrodinamik boyut değişimi incelendi.

Çizelge 4.1  $W_0 = 5-55$  değerleri arasında  $[\text{H}_2\text{O}]$  ve  $[\text{AOT}]$ 'nin konsantrasyon değerleri

$W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$	$[\text{H}_2\text{O}]$	$[\text{AOT}]$
5	1.5	0.3
10	3	0.3
15	4.5	0.3
20	6	0.3
25	7.5	0.3
30	9	0.3
35	10.5	0.3
40	12	0.3
45	13.5	0.3
50	15	0.3
55	16.5	0.3

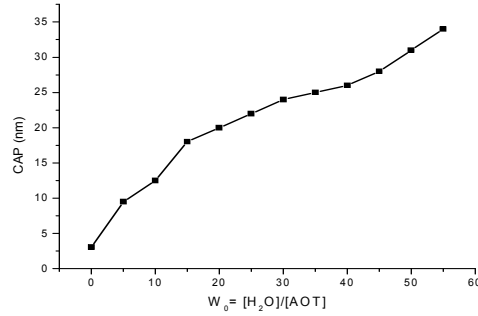
10 mg poliakrilik asit polimeri (PAA) (Mw100.000) 10 ml saf suda içerisinde çözüldü. 0.1 N NaOH ile pH 4.8 ve 1 N NaOH ile pH 7'ye çekildi. PAA polimerinin karboksil grupları pH 4.8 ve 7 değerlerinde 26.6 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraklorür (EDC) ile aktive edildi. Karboksil grupları aktifleştirilmiş PAA polimerlerinden (pH 4.8 ve 7 değerlerinde) artan hacimde (55 µL, 108 µL, 162 µL, 216 µL, 270 µL) 0.3 M 2 ml AOT hidratlanmış misel (HRM) sistemine eklendi ve 4 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Analiz öncesi 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve 0.22 µm çapa sahip polietersülfon (PES) membranlı filtreden geçirildi. Sonrasında örneklerin zetasizer cihazında misel boyutları ölçüldü.

0.3 M 2 ml AOT HRM sistemi içerisine 7 ve 8 pH değerlerinde % 0.1'lik BSA çözeltisi artan hacimde (54 µL, 108 µL, 162 µL, 216 µL, 270 µL) eklendi ve 4 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Örnekler 17 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve 22 µm çapa sahip polietersülfon (PES) membranlı filtreden geçirilip zetasizer cihazında misel boyutları ölçüldü.

Yapılan ön çalışmalar sonrasında; A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı virüsünün immünojenik VP1 kapsid proteininin sentetik 200-213 amino asit dizisi ile sentetik VP/AA kopolimerinin (25/75, Mw 80.000) kovalent konjugasyon işlemi Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde gerçekleştirildi. 1.59 mg A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 yapısal kapsid proteininin 200-213 dizilimli sentetik peptid (Mw 1857) 0.01 M 1,59 ml PBS (pH 9) içerisinde çözülerek 0.3 M 30 ml AOT HRM sistemi içerisine eklendi, 30 dakika manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışım sonrasında 1 ml örnek alındı 22 µm çapa sahip polietersülfon (PES) membranlı filtreden geçirilip zetasizer cihazında bu örneğin misel boyutu ölçüldü. 1.59 mg VP/AA Kopolimeri [(27/75); Mw 80.000] 1.59 ml saf suda çözüldü. pH değeri 3.6'dan 4.8'e 0.1 NaOH ile çekildi ve 0.3 M 30 ml AOT HRM sistemine içerisine eklendi, 30 dakika manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. AOT HRM sistemi içerisindeki VP/AA kopolimerinin karboksil grupları 3.6 mg EDC eklenerek aktive edildi. 45 dakika karıştırıldıktan sonra karışımdan 1 ml örnek alındı ve 22 µm çapa sahip polietersülfon (PES) membranlı filtreden geçirilip zetasizer cihazında AOT miselinin iç çapının boyutu ölçüldü. Bu iki AOT misel sistemleri birbirlerine eklenerek önce 30 dakika düşük hızda sonra 18 saat boyunca yavaş hızda manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Bu işlem sonrasında 1 ml örnek alındı 22 µm çapa sahip polietersülfon (PES) membranlı filtreden geçirilip zetasizer cihazında AOT misel boyutları ölçüldü.

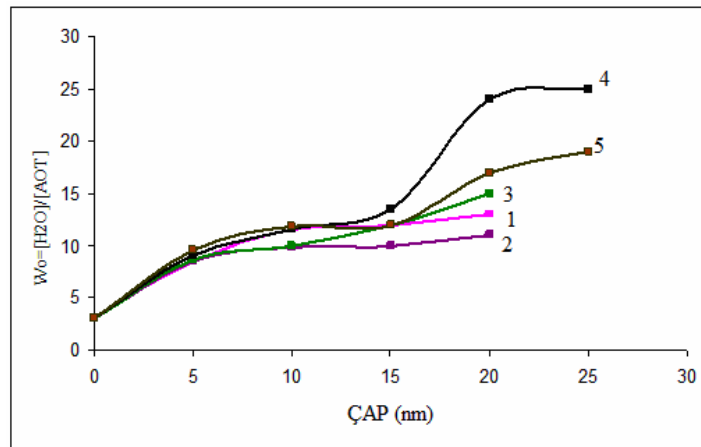
#### 4.4.1.4 Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlarının Zetasizer Cihazına ait Analiz Sonuçları

AOT hidratlanmış misel sistemine (HRM) artan hacimlerde (54  $\mu\text{L}$ , 108  $\mu\text{L}$ , 162  $\mu\text{L}$ , 216  $\mu\text{L}$ , 270  $\mu\text{L}$ ) su eklenmesi ile  $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$  oranına bağlı misel iç çapının değişimi gösterilmiştir.



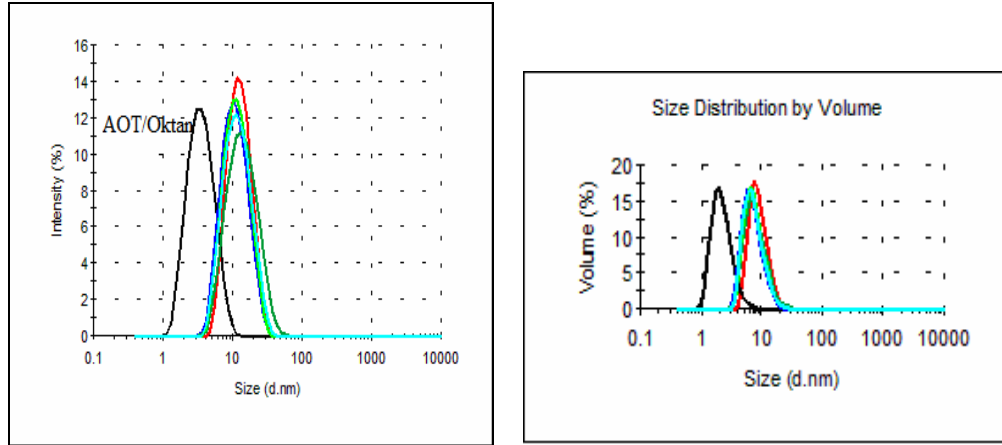
Şekil 4.17 Serbest AOT misel iç çapının  $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$  oranına bağlı boyut değişimi

HRM misel sistemine artan hacimlerde (54  $\mu\text{L}$ , 108  $\mu\text{L}$ , 162  $\mu\text{L}$ , 216  $\mu\text{L}$ , 270  $\mu\text{L}$ ) karboksil grupları aktifleştirilmiş PAA polimeri (pH 4.8 ve pH 7) ve BSA eklenmesi sonucu HRM çapının boyut değişimi zetasizer cihazında ölçüldü.



Şekil 4.18 (1)  $W_0 = [\text{PAA}]/[\text{AOT}]$  (PAA pH 4.83), (2)  $W_0 = [\text{BSA}]/[\text{AOT}]$  (BSA pH 7), (3)  $W_0 = [\text{BSA}]/[\text{AOT}]$  (BSA pH 8); (4)  $W_0 = [\text{PAA} + \text{BSA}]/[\text{AOT}]$  (BSA pH 7); (5)  $W_0 = [\text{PAA} + \text{BSA}]/[\text{AOT}]$  (BSA pH 8)  $W_0$  değerine bağlı misel boyutu.

A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı virüsünün immünojenik VP1 kapsid proteininin sentetik 200-213 amino asid dizisi ile sentetik VP/AA kopolimerinin (25/75, Mw 80.000) kovalent konjugasyon işlemi Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) gerçekleştirildi. Bu sistem içerisinde sentezi yapılan biyokonjugatın, reaksiyonun her basamağında zetasizer cihazında hidrodinamik boyut (nm) ölçümleri yapıldı.



Örnekler	Hacime Bağlı Boyutu (nm)	Şiddete bağlı Boyutu (nm)
0.3 M AOT	2.33	3.80
0.3 M AOT + % 0.5 VP/AA (25/75; Mw 80.000)	9.05	13.3
Reaksiyon 1= % 0.1 Şap Hastalığı virüsünün sentetik 200-213 amino asid dizisi + 0.3 M 30 ml AOT Karışımı	7.34	11.7
Reaksiyon 2 = % 0.1 VP/AA Kopolimeri + 0.3 M 30 ml AOT Karışımı	8.33	15.3
Reaksiyon 1 + Reaksiyon 2 Karışımı ( 18 saat sonrası)	7.70	12.8

Şekil 4.19 Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde hazırlanan ve sentezin her basamağında yapılan ölçümlere ait boyut değerleri

#### 4.4.2 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı varlığında Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini içeren Biyokonjugatların Sentezi

A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 yapısal kapsid proteininin 135-161, 170-188 peptid dizilerinin VP/AA kopolimerleri ile kovalent konjugasyonu suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrasklorür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında gerçekleştirildi. Bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında yüksek verimli biyokonjugatların sentezlenmesi amacıyla, kopolimerin karboksil gruplarının

aktivasyonun yapıldığı reaksiyon basamağında değişiklikler yapılmıştır. Bu amaçla farklı yöntemlerle çalışıldı ve bu bunlar Yöntem 1 ve Yöntem 2 olarak adlandırıldı.

#### 4.4.2.1 Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Sentezi

Yöntem 1'e göre biyokonjugat sentezinde VP/AA kopolimerinin (25/75; Mw=80.000) konsantrasyonu sabit tutularak, peptid konsantrasyonu artırıldı. Bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 3, 8, 16, 25, 33$  oranlarında VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 ve 170-188 peptid dizilerini içeren fiziksel kompleksler hazırlandı ve biyokonjugatlar sentezlendi.

Aynı yöntem kullanılarak poliakrilik asit polimer (Mw=100.000) konsantrasyonu sabit tutulup, peptid konsantrasyonu artırıldı.  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 4, 10, 20, 31, 40$  oranlarında PAA polimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizilerini içeren fiziksel kompleksler hazırlandı ve biyokonjugatlar sentezlendi.

#### 4.4.2.2 Kullanılan Çözeltiler

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

1.1998g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Mw=119.98 g/mol) tartılarak 500ml saf suda çözülür. Aynı zamanda 2.6807g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Mw=268.07 g/mol) tartılarak yine 500ml saf suda çözülür. Bu iki çözeltiden  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinin üzerine eklenir ve karışıma 8.766 g NaCl ilave edilerek, tekrar karıştırılır. Çözeltinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7'ye ayarlanır.

#### 4.4.2.3 Hesaplamalar

VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin peptid dizilerini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

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

$N_A$  = Avagadro sayısı

$C_{\text{pep}}$  = Peptid konsantrasyonu

$C_{pol}$ = Polimer konsantrasyonu

$M_w$ = Molekül ağırlığı

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{VP/AA} = 80\ 000\ Da$

VP/AA Kopolimerinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.05 dir.

170-188 için  $\Rightarrow M_{pep} = 2395$

$$\frac{n_{peptid}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{peptid} \cdot M_{VP/AA}}{c_{VP/AA} \cdot M_{peptid}} = 3; 8; 16; 25; 33$$

- 1)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{3}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.005g/100ml = 0.05mg/ml = 0.15mg/3\ ml$
- 2)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{8}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.0125g/100ml = 0.125mg/ml = 0.375mg/3\ ml$
- 3)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{16}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.025g/100ml = 0.25mg/ml = 0.75mg/3\ ml$
- 4)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{25}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.0375g/100ml = 0.375mg/ml = 1.125mg/3\ ml$
- 5)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{33}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.05g/100ml = 0.5mg/ml = 1.5mg/3\ ml$

VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizilerini (-N terminal ucunda triptofan amino asidi taşımayan) içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

VP/AA Kopolimerinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.05 dir.

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{VP/AA} = 80\ 000\ Da$

135-161 için  $\Rightarrow M_{peptid} = 2791$

$$\frac{n_{peptid}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{peptid} \cdot M_{VP/AA}}{c_{VP/AA} \cdot M_{peptid}} = 3, 7, 14, 21, 29$$

- 1)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = \mathbf{3}$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{Peptid} = 0.005g/100ml = 0.05mg/ml = 0.15mg/3\ ml$

- 2)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 7$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0125\text{g}/100\text{ml} = 0.125\text{mg}/\text{ml} = 0.375\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 3)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 14$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.025\text{g}/100\text{ml} = 0.25\text{mg}/\text{ml} = 0.75\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 4)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 21$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0375\text{g}/100\text{ml} = 0.375\text{mg}/\text{ml} = 1.125\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 5)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 29$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.05\text{g}/100\text{ml} = 0.5\text{mg}/\text{ml} = 1.5\text{mg}/3 \text{ ml}$

PAA polimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizilerini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

PAA polimerinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.05 dir.

PAA polimeri  $\Rightarrow M_{\text{PAA}} = 100\,000 \text{ Da}$

170-188 için  $\Rightarrow M_{\text{pep}} = 2395$

$$\frac{n_{\text{peptid}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{peptid}} \cdot M_{\text{PAA}}}{c_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{peptid}}} = 4, 10, 20, 31, 40$$

- 1)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 4$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.005\text{g}/100\text{ml} = 0.05\text{mg}/\text{ml} = 0.15\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 2)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 10$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0125\text{g}/100\text{ml} = 0.125\text{mg}/\text{ml} = 0.375\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 3)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 20$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.025\text{g}/100\text{ml} = 0.25\text{mg}/\text{ml} = 0.75\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 4)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 31$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0375\text{g}/100\text{ml} = 0.375\text{mg}/\text{ml} = 1.125\text{mg}/3 \text{ ml}$
- 5)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 40$  olan 3 ml PAA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.05\text{g}/100\text{ml} = 0.5\text{mg}/\text{ml} = 1.5\text{mg}/3 \text{ ml}$

#### 4.4.2.4 Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks Hazırlanması

$n_{peptid}/n_{VP/AA} = 3$  oranına ait fiziksel kompleksin hazırlanması: 1.5 mg VP/AA kopolimeri (25/75; Mw=80.000) 1.5 ml saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH ile pH 7'ye ayarlandı. 0.15 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170–188 peptid dizisi (Mw=2394) 125 µL DMSO içerisinde çözüldükten sonra üzerine 1375 µL 0.01 M PBS (pH 7) eklendi ve 30 dakika +4 °C'de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışan kopolimer çözeltisi üzerine peptid çözeltisi eklendi ve 2 saat boyunca +4 °C'de karıştırılmaya devam edildi. Bu süre sonunda pH değeri 7'ye ayarlandı. Fiziksel karışım yolu ile oluşan fiziksel kompleksin yapı ve karakterizasyonu HPLC, Viskotek [Dört Dedektörlü (UV, Kırılma İndisi, Viskozite ve Işık saçılması)] kromatografik sistemleri ve florimetrik yöntemlerle incelendi.

#### 4.4.2.5 Yönteme 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan Yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatların Hazırlanması

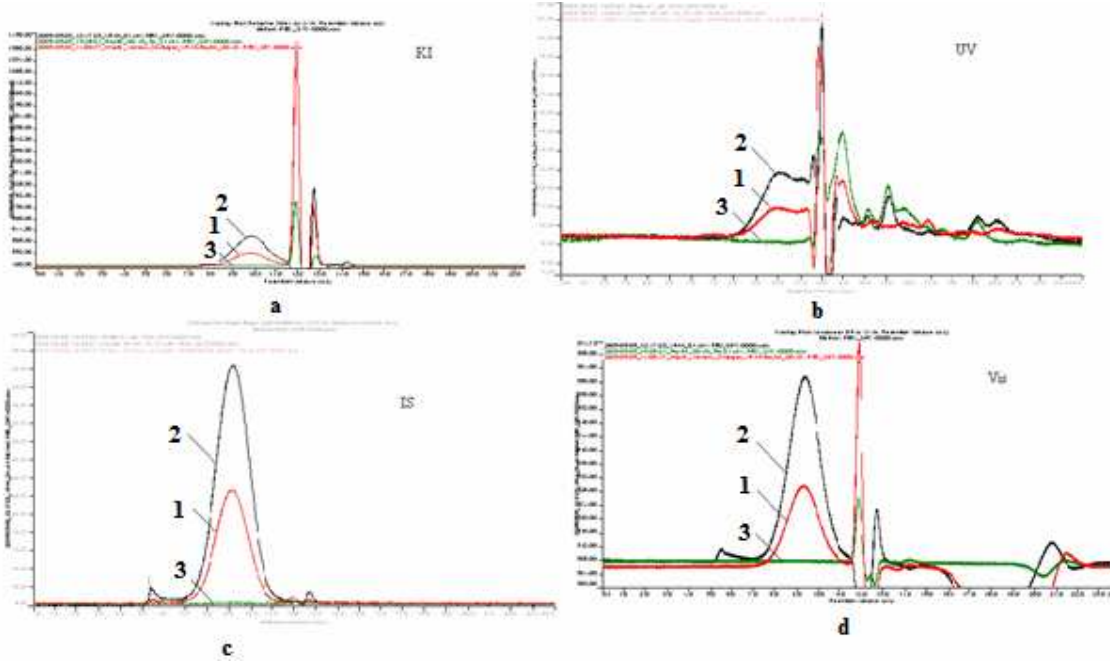
$n_{peptid}/n_{VP/AA} = 3$  oranına ait biyokonjugatın hazırlanması: 1.5 mg VP/AA kopolimeri (25/75; Mw=80.000) 1.5 ml saf su içerisinde çözüldü. 0.1 N NaOH ile pH 5'e ayarlandı. VP/AA kopolimerinin karboksil gurupları 6 mg EDC eklenerek aktive edildi ve 1 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra pH değeri 0.1 N NaOH ile 7'ye çekildi. 0.15 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisi (Mw=2394) 125 µL DMSO içerisinde çözüldükten sonra üzerine 1375 µL 0.1 M PBS (pH 7) eklendi ve 30 dakika +4 °C'de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışan kopolimer çözeltisi üzerine peptid çözeltisi eklendi ve gece boyunca +4 °C'de karıştırılmaya devam edildi. İşlem sonunda biyokonjugatın pH'sı 7'ye ayarlandı. Sentezlenen biyokonjugatın yapı ve karakterizasyonu HPLC, Viskotek [Dört Dedektörlü (UV, Kırılma İndisi, Viskozite ve Işık saçılması)] kromatografik sistemleri ve florimetrik yöntemlerle incelendi.

#### 4.4.2.6 Yöntem 1'e göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizilerini İçeren Biyokonjugat ve Fiziksel Komplekslerin HPLC-Viskotek ve Floresans Cihazları ile Yapılan Analiz Sonuçları

Yöntem 1'e göre  $n_{peptid}/n_{VP/AA}=30$  oranında VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 kapsid proteininin 170-

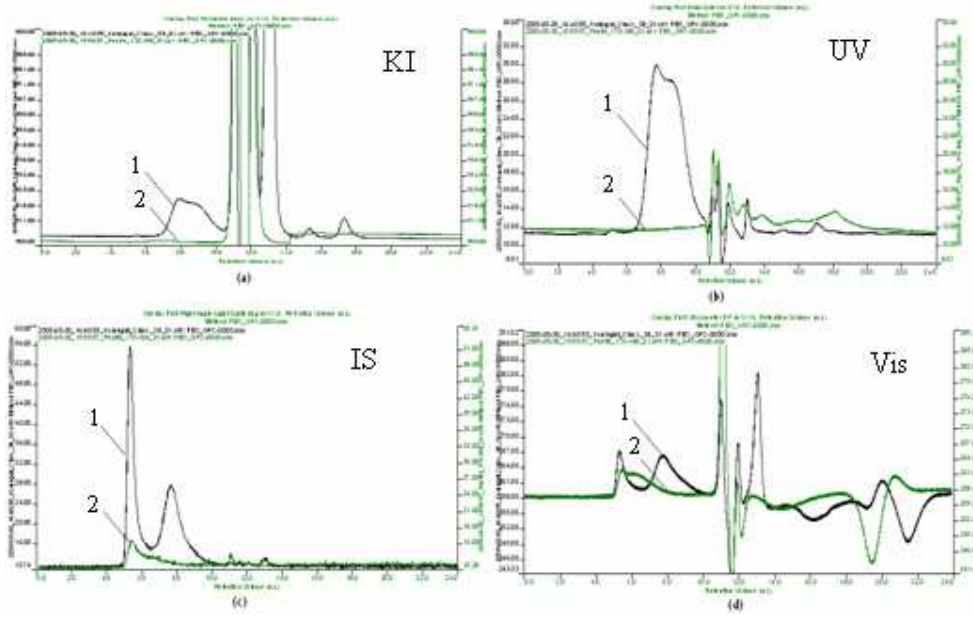
188 pizisini içeren (VP/AA-Peptid) biyokonjugatı 0.01 M PBS (pH 7) içerisinde hazırlandı. Yöntemle 1'e göre hazırlanan biyokonjugatın yapı ve karakterizasyon tayininde optimum kromatografik analiz sonuçlarının elde edilmesi amacıyla farklı kolonlar, farklı pH değerleri ve farklı mobil faz kullanılarak Viskotek cihazında analizler yapılmıştır.

❖ Viskotek cihazında, TSK Gel G5000PWXL kolonda, 0.8 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M PBS (pH=7) mobil fazında gerçekleştirilen Viskotek cihazı Analiz Sonuçları:



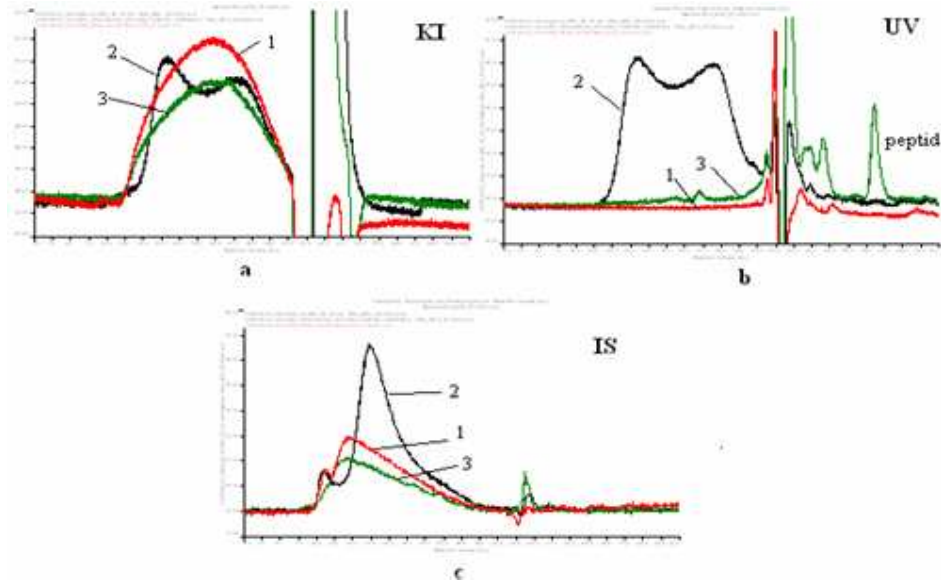
Şekil 4.20 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.5 VP/AA- Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), **(2)** % 0.2 VP/AA (25/75;  $M_w= 80.000$ ) Kopolimeri **(3)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

❖ Viskotek cihazında TSK Gel G5000PWXL kolonda, 0.8 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.025 M Sodyum Bikarbonat tamponu pH 10.6 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen Viskotek cihazı analiz sonuçları:

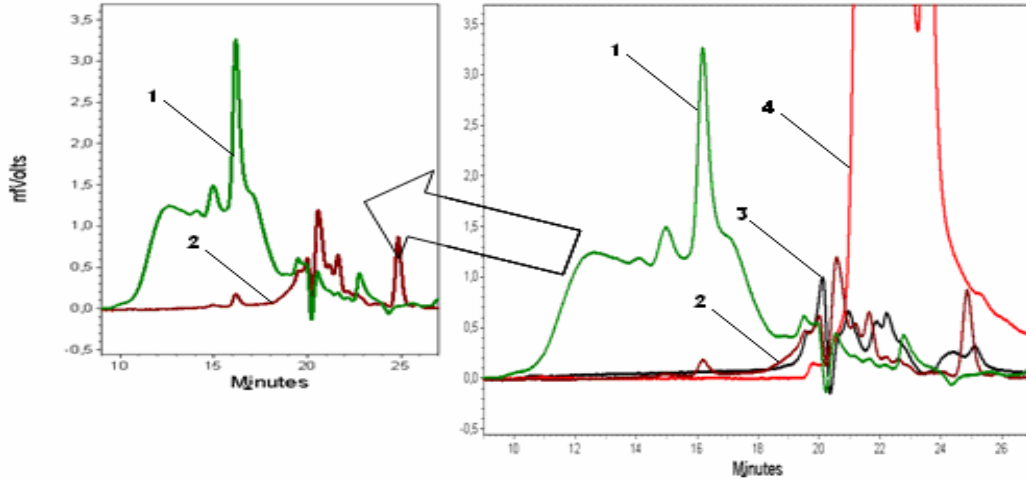


Şekil 4.21 0.025 M Sodyum Bikarbonat tamponunda pH 10.6 'da hazırlanmış **(1)** % 0.1 VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), **(2)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ait Viskotek Kırılma İndisi (a), UV (b), Işık Saçılması (c), Viskozite (d) kromatogramları

❖ Viskotek cihazında Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M PBS, %0.05  $\text{NaN}_3$  pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilen Viskotek cihazı analiz sonuçları:



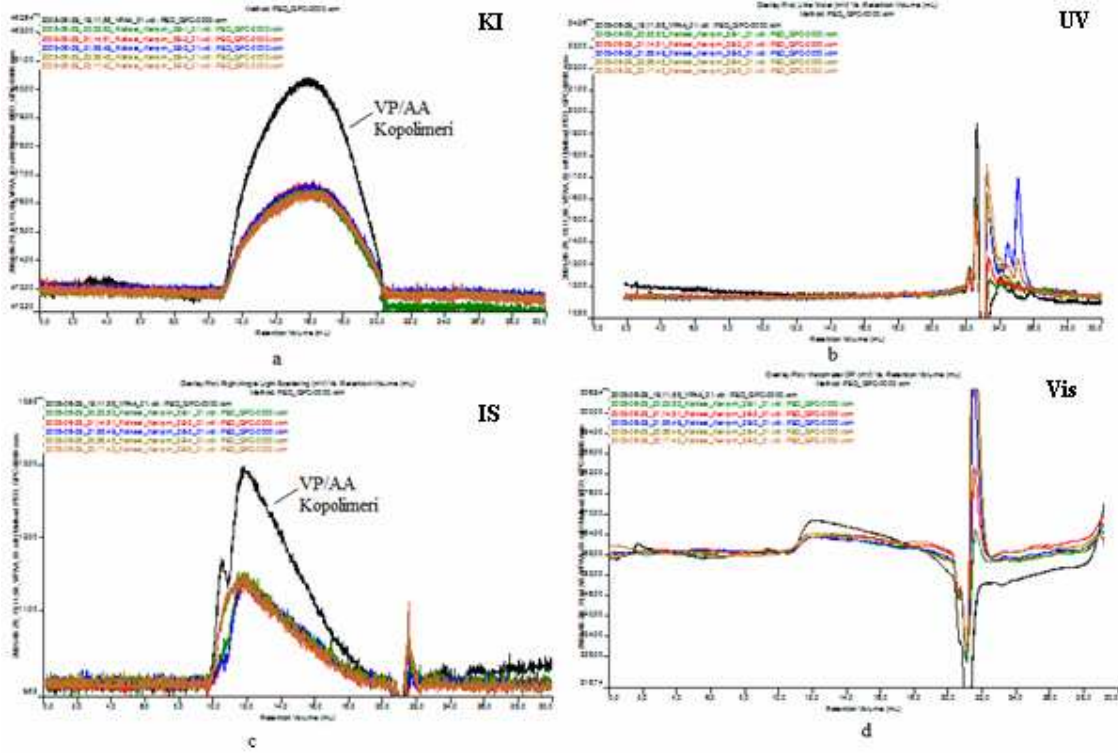
Şekil 4.22 0.01 M PBS pH 7 'de hazırlanmış **(1)** VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c) kromatogramları



Şekil 4.23 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=30$ ), **(3)** % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, **(4)** % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 Peptid Dizisine ait HPLC kromatogramları

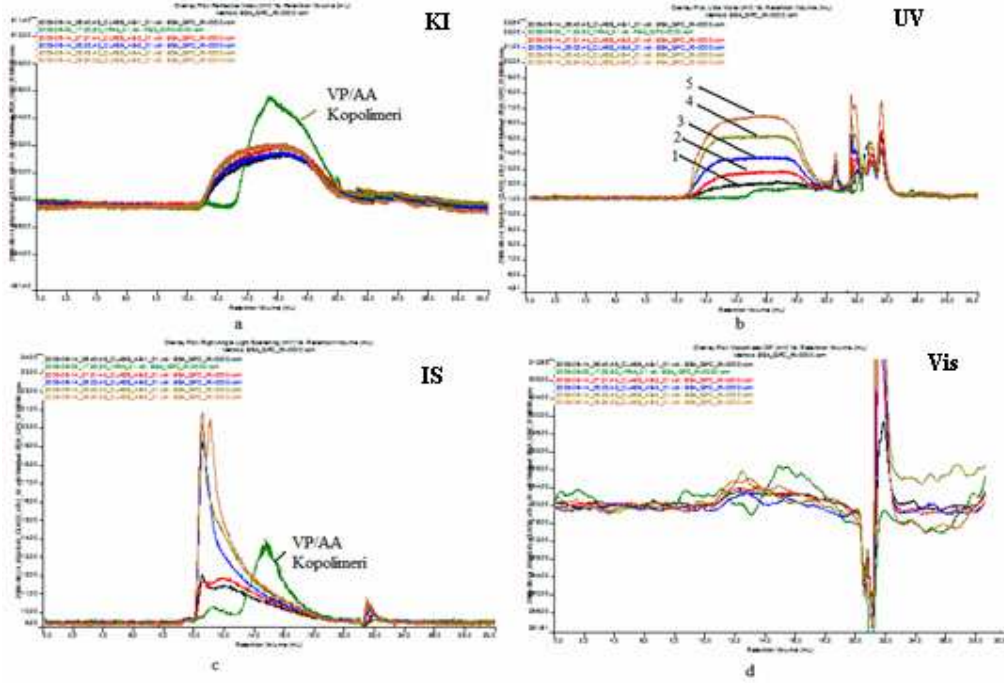
Serbest peptid, kopolimer ve VP/AA-Peptid biyokonjugatının yapı ve karakterizasyon tayininde en uygun koşulların Shim-Pack Diol 300 kolon, 1.0 ml/dak akış hızı, 25 °C sıcaklıkta ve 0.01 M PBS (pH=7) mobil fazda olduğu görülmüştür. Çeşitli koşullarda yapılan analizle sonucunda kromatografik analizler için en uygun şartlar Viskotek aletinde belirlendikten sonra, sentezlenen biyokonjugatların ve hazırlanan fiziksel komplekslerin, Viskotek, HPLC ve floresans cihazları ile yapı ve karakterizasyonu incelendi.

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3; 8; 16; 25; 33$  oranlarında sentezlenen VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisini içeren fiziksel kompleksin fizikokimyası hakkında daha fazla bilgi edinmek amacıyla VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) kopolimer konsantrasyonu sabit tutulup, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında (0.15, 0.375, 0.75, 1.125, 1.5 mg) fiziksel kompleksler sentezlendi. Bileşenlerinin farklı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid fiziksel komplekslerinin yapı ve karakterizasyon tayini Viskotek cihazında kromatografik olarak yapıldı.

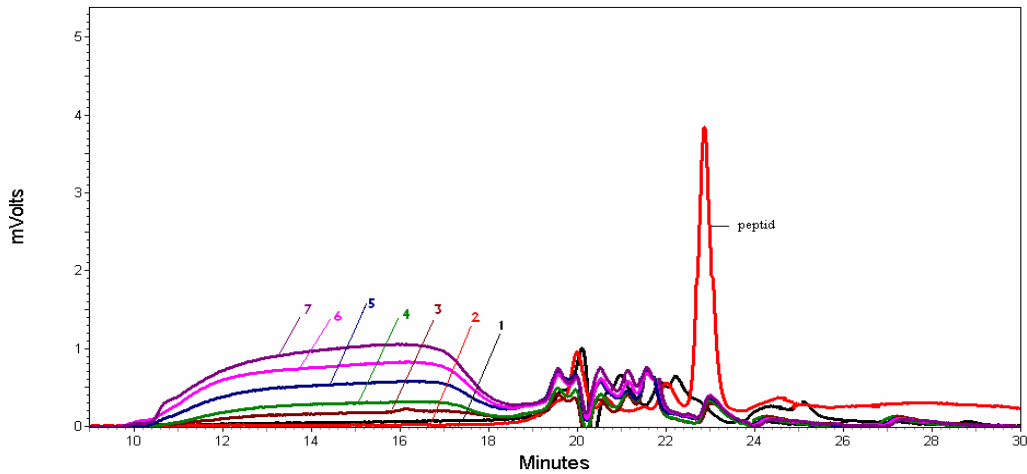


Şekil 4.24 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1)VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (2) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (4) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi, ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (5)VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (6) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramı.

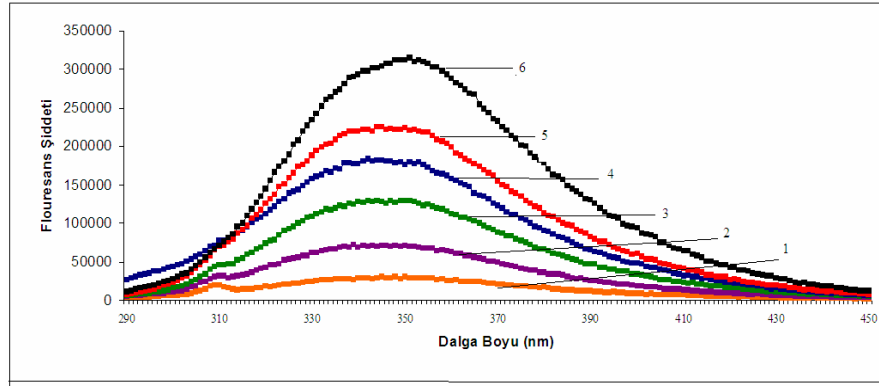
VP/AA (25/75; Mw=80.000) kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 kapsid proteininin 170–188 peptid dizisini içeren (VP/AA-Peptid) biyokonjugatın fizikokimyası hakkında daha fazla bilgi edinmek amacıyla VP/AA (25/75; Mw=80.000) kopolimeri konsantrasyonu % 0.05 sabit tutulup, peptidin artan miktarlarında (0.15, 0.375, 0.75, 1.125, 1.5 mg) VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyon tayini Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ile incelendi.



Şekil 4.25 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (2) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ), (6) % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) kopolimerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramı.

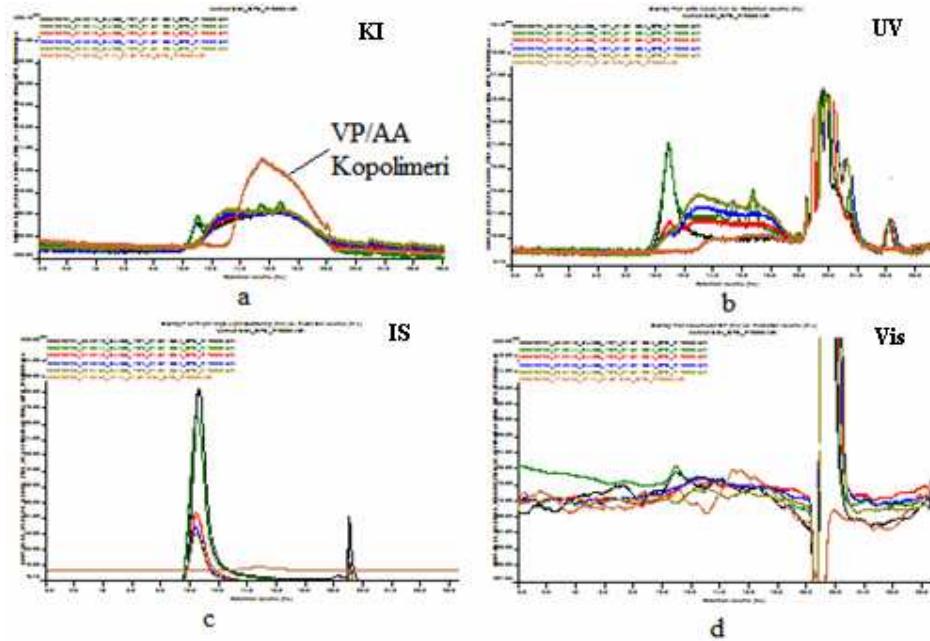


Şekil 4.26 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, (2) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (6) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (7) VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait HPLC Kromatogramı

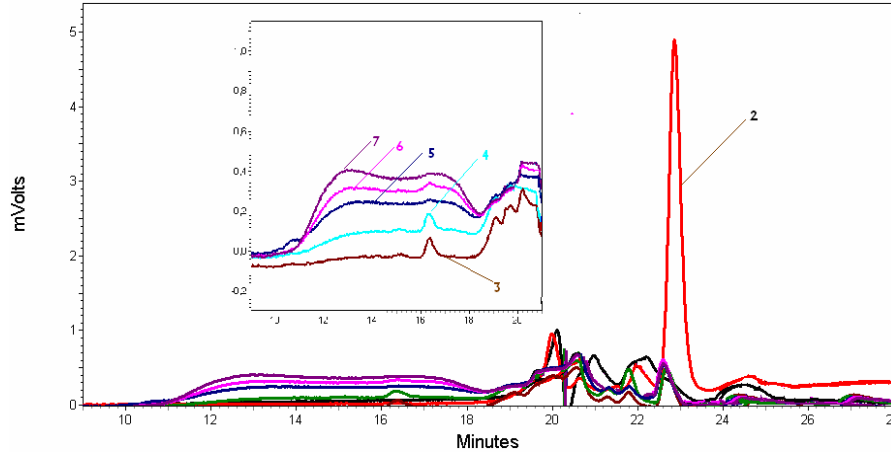


Şekil 4.27 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}}346$  nm), **(2)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ;  $\lambda_{\text{max}}346$  nm), **(3)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ;  $\lambda_{\text{max}}346$  nm), **(4)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ;  $\lambda_{\text{max}}345$  nm), **(5)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ;  $\lambda_{\text{max}}345$  nm), **(6)** %0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün VP1 kapsid proteininin 170–188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}352$  nm) ait Floresans Spektrumları

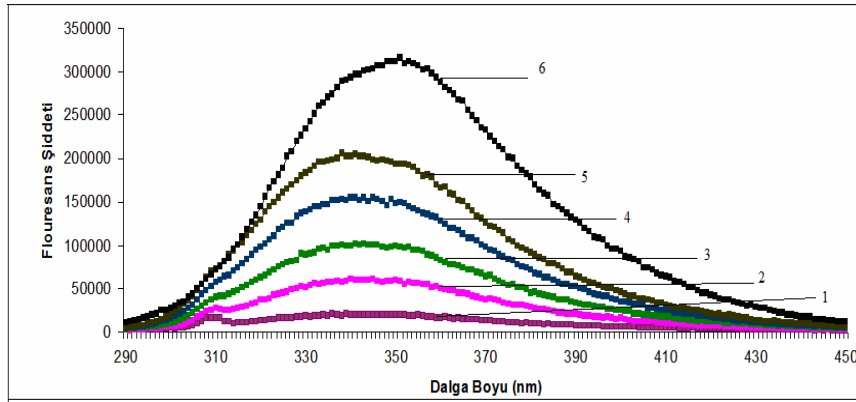
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ; 8; 16; 25; 33 oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına 0.154 M NaCl eklenerek NaCl’ün VP/AA-Peptid biyokonjugatına olan etkisi incelendi.



Şekil 4.28 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, **(2)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), **(4)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), **(5)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), **(6)** VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

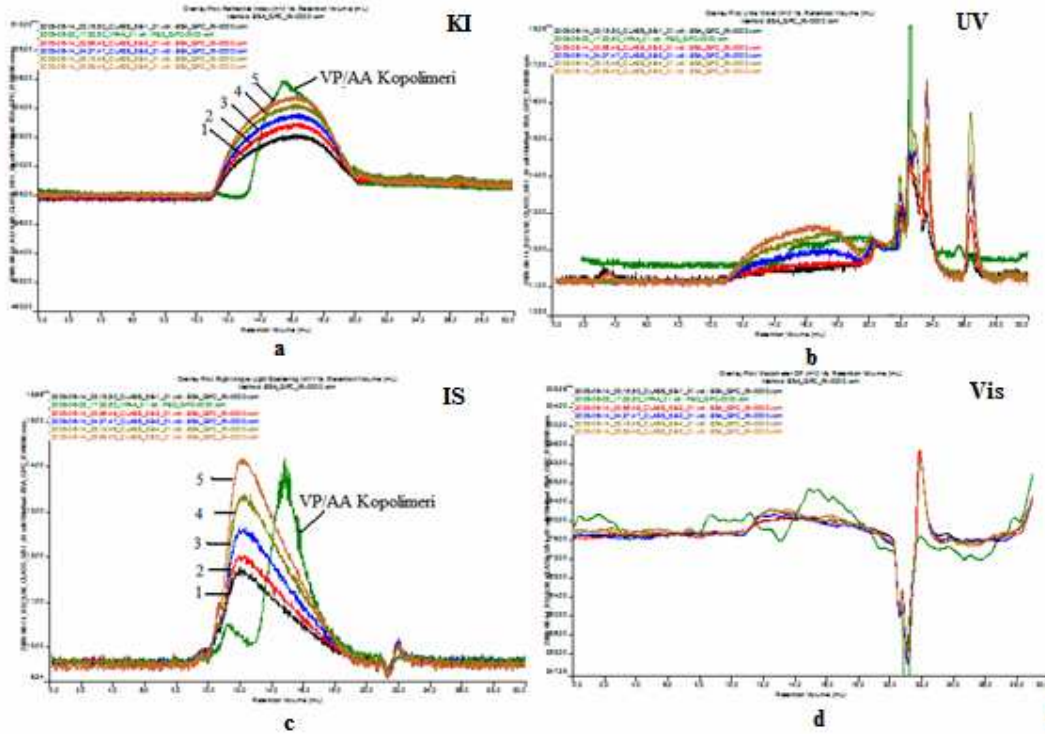


Şekil 4.29 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) % 0.1 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, (2) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Dizilimli Peptidi, (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ), (6) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ), (7) VP/AA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ) ait HPLC Kromatogramı

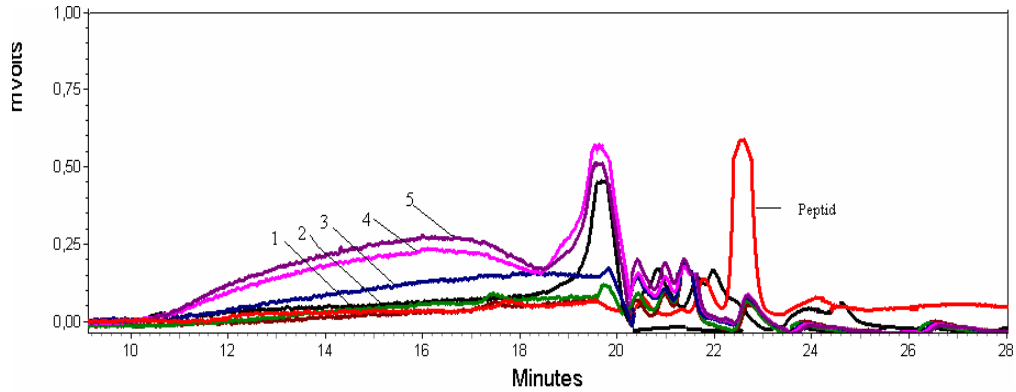


Şekil 4.30 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}}=344$  nm), (2) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ;  $\lambda_{\text{max}}=344$  nm), (3) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=16$ ;  $\lambda_{\text{max}}=344$  nm), (4) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=25$ ;  $\lambda_{\text{max}}=343$  nm), (5) VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=33$ ;  $\lambda_{\text{max}}=343$  nm), (6) %0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün 170-188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}=352$  nm) ait Floresans Spektrumları

VP/AA (25/75; Mw=80.000) kopolimeri konsantrasyonu % 0.05 olarak sabit tutulup, artan miktarda (0.15, 0.375, 0.75, 1.125, 1.5 mg) 135-161 Peptid dizisi (–N terminal ucunda triptofan amino asidi içermeyen) içeren VP/AA-Peptid biyokonjugatı sentezlendi. Bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ; 7; 14; 21; 28 oranlarında sentezlenen biyokonjugatların bir önceki biyokonjugatlardan farklı hidrofilik özellikli peptid dizisinin kullanılmasıdır. VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyonu Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ve floresans spektrofotometre kullanılarak yapıldı.

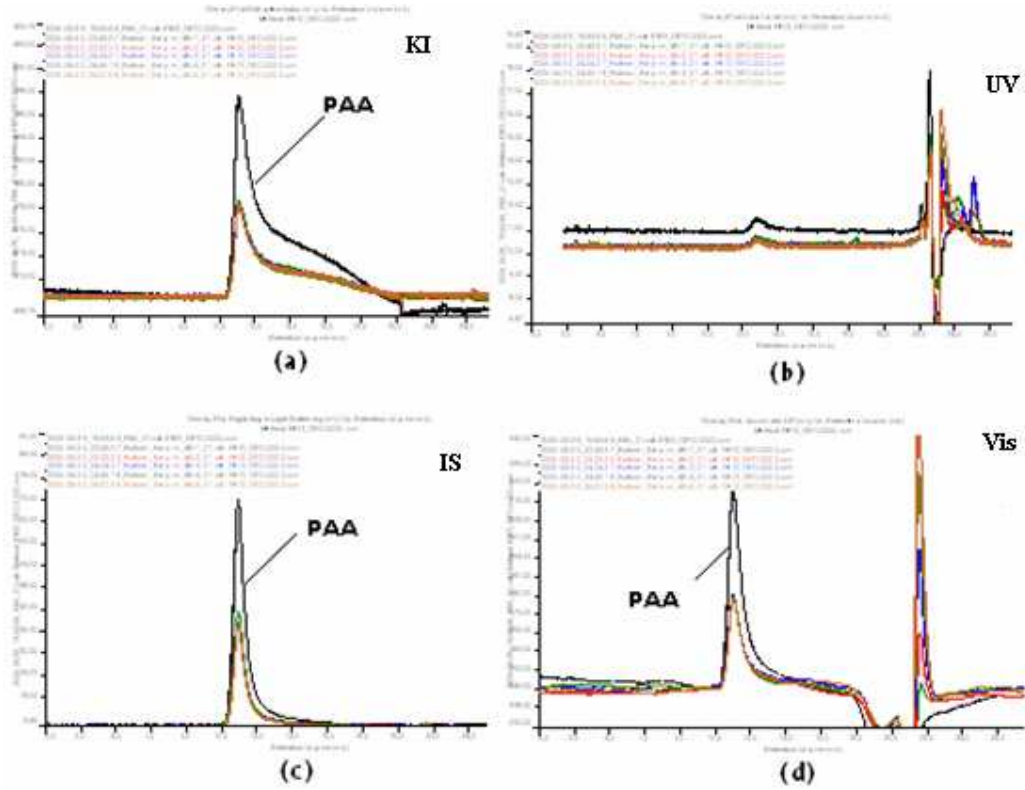


Şekil 4.31 0.01 M PBS pH 7' de hazırlanmış (1)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (2)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (3)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=14$ ), (4)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=21$ ), (5)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=28$ ), (6) % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



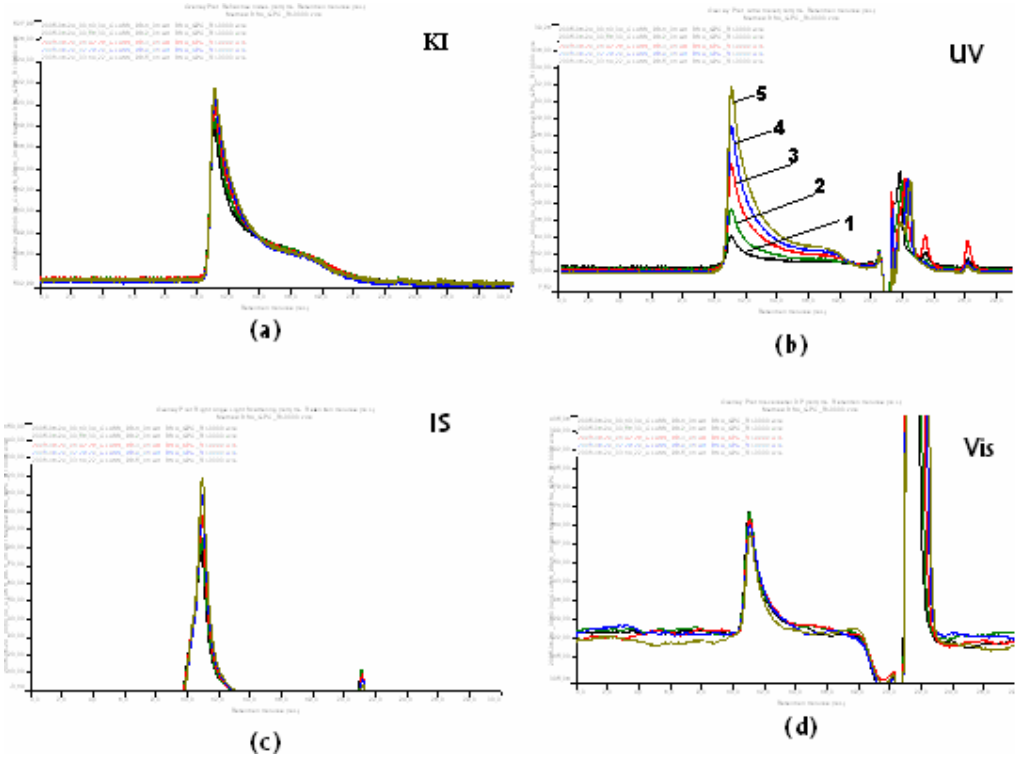
Şekil 4.32 0.01 M PBS pH 7' de hazırlanmış (1)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (2)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (3)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=14$ ), (5)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=21$ ), (4)VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=28$ ), (5) % 0.1 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, (6) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine (-N terminal uc kısmında trp amino asidi içermeyen) ait HPLC Spektrumu

Aynı koşullar altında, VP/AA kopolimerine oranla daha fazla sayıda karboksil gruba içeren poliakrilik asit (PAA) ( $M_w=100.000$ ) polimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid dizisini içeren fiziksel kompleksleri hazırlandı. PAA polimer konsantrasyonu % 0.05 olarak sabit tutulup, peptid artan (0.15, 0.375, 0.75, 1.125, 1.5 mg) miktarlarında hazırlanan fiziksel komplekslerin yapı ve karakterizasyonu Viskotek cihazında kromatografik olarak yapıldı.

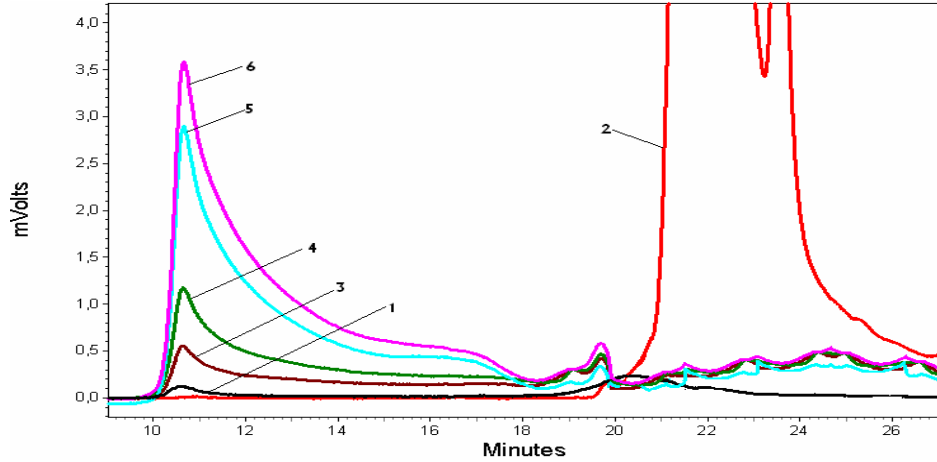


Şekil 4.33 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (♦) %0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ) (◆) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=4$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), (◆) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), (◆) PAA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=31$ ), (♦) PAA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=41$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

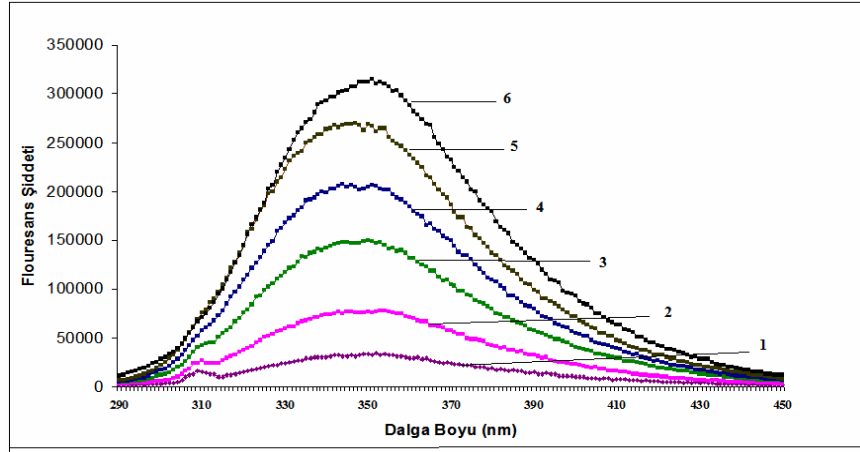
EDC çapraz bağlayıcısı varlığında poliakrilik asit (PAA) ( $M_w=100.000$ ) polimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170–188 Peptid dizisi kullanılarak PAA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. PAA polimer konsantrasyonu % 0.05 olarak sabit tutulup, peptid artan miktarlarında (0.15, 0.375, 0.75, 1.125, 1.5 mg) ve bileşenlerinin farklı oranlarında ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}= 4; 10; 20; 31; 41$ ) sentezlenen PAA-Peptid biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyonu Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ve floresans spektrofotometre kullanılarak yapıldı.



Şekil 4.34 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), (2) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), (3) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), (4) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=31$ ), (5) PAA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=41$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



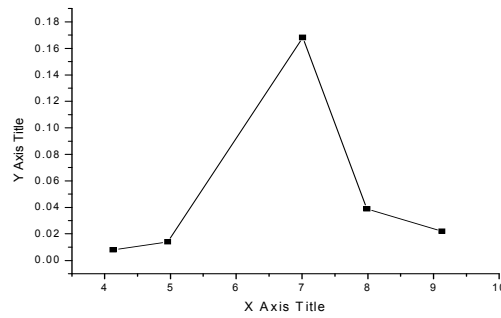
Şekil 4.35 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), (2) %0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, (3) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=4$ ), (4) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=10$ ), (5) PAA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=31$ ), (6) PAA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=41$ ) ait HPLC Spektrumu



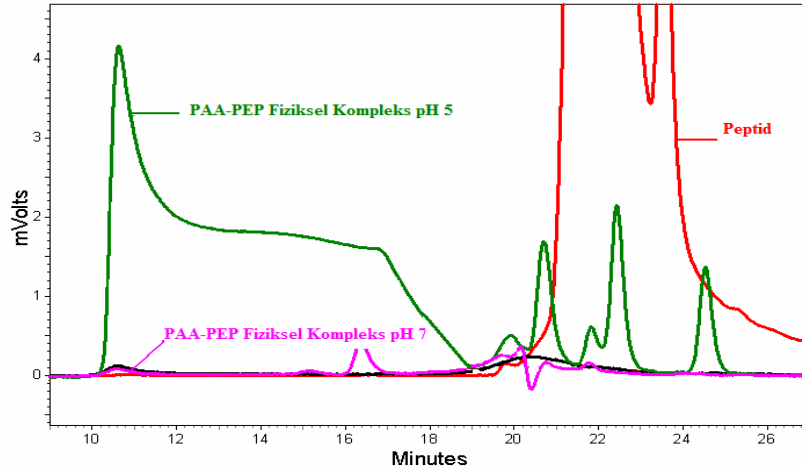
Şekil 4.36 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(2)** PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=10$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(3)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=20$ ;  $\lambda_{\text{max}}348$  nm), **(4)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=31$ ;  $\lambda_{\text{max}}347$  nm), **(5)** VP/AA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=41$ ;  $\lambda_{\text{max}}347$  nm), **(6)** % 0.008 Şap Hastalığı Vürüsünün 170-188 peptid dizisine ( $\lambda_{\text{max}}352$ ) ait Floresans Spektrumları

PAA polimeri ( $M_w=100.000$ ) ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170–188 peptid dizisini içeren  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$  oranında hazırlanan fiziksel karışım ve aynı oranda sentezlenen biyokonjugatın pH 5 ve 7 değerlerindeki yapı-karakterizasyon tayini Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ve floresans spektrofotometre kullanılarak yapıldı.

PAA polimeri ( $M_w=100.000$ ) ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170-188 peptid dizisini içeren fiziksel karışımın pH 4, 5, 7, 8, 9 değerlerinde 280 nm’deki absorban değerleri ölçüldü.

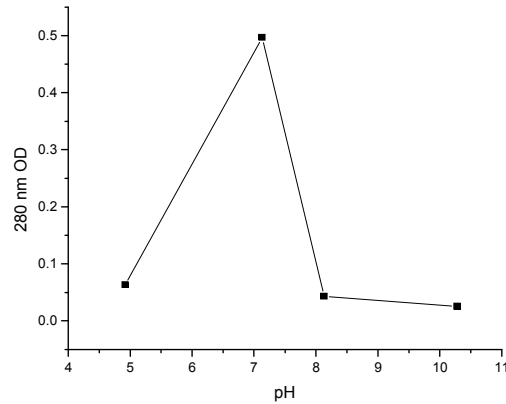


Şekil 4.37 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait pH değişimine bağlı 280 nm absorban değerleri

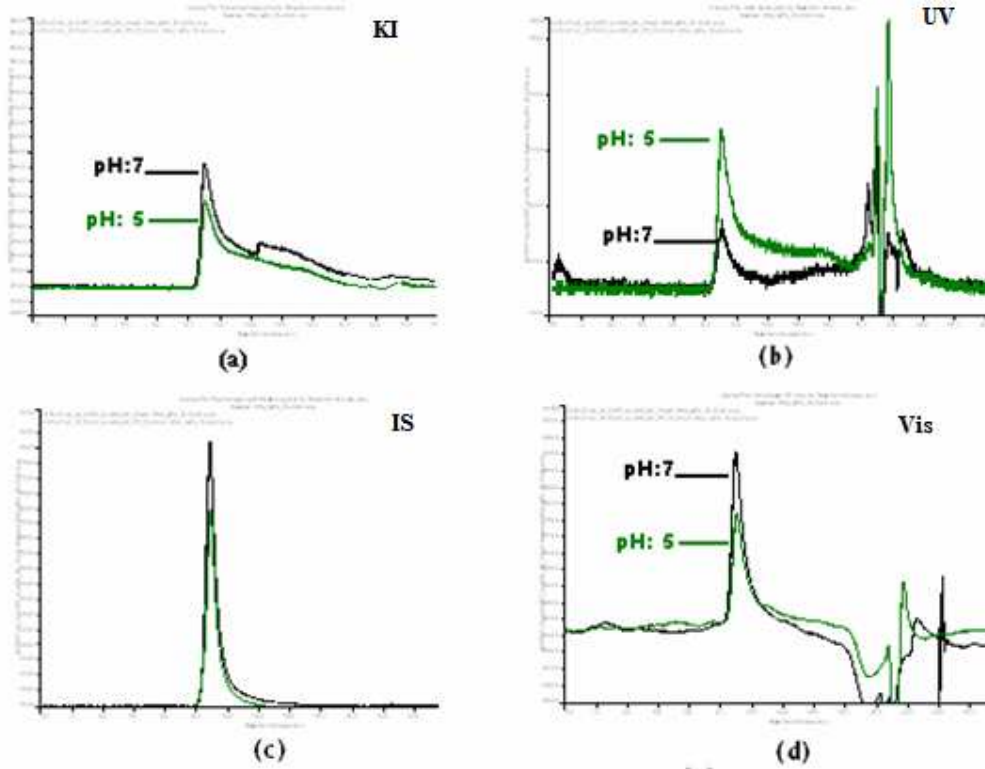


Şekil 4.38 (1) % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), (2) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Peptid Dizisi, (3) pH 5 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), (4) pH 7 PAA-Peptid fiziksel kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait HPLC kromotogramları

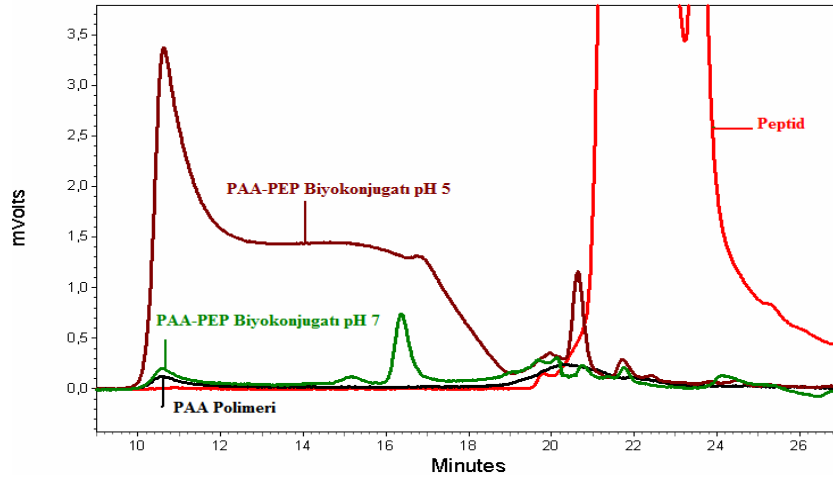
PAA polimeri ( $M_w=100.000$ ) ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid proteininin 170–188 Peptid dizisini içeren biyokonjugatın pH 4, 5, 7, 8, 10 değerlerinde 280 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 4.39 PAA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait pH değişimine bağlı 280 nm absorbans değerleri



Şekil 4.40 0.01 M PBS pH 5 ve 7’de hazırlanmış PAA-Peptid biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



Şekil 4.41 (1) % 0.1 PAA Polimeri ( $M_w=100.000$ ), (2) % 0.2 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170–188 Peptidi, (3) pH 5 PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ), (4) pH 7 PAA-Peptid biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=20$ ) ait HPLC Spektrumları

#### 4.4.2.7 Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin Peptid Dizilerini içeren Fiziksel Komplekslerin Hazırlanması ve Biyokonjugatların Sentezi

Yöntem 2'ye göre bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135–161 ve 170–188 peptid dizilerini içeren fiziksel kompleksler hazırlandı ve biyokonjugatlar sentezlendi.

#### 4.4.2.8 Hesaplamalar

VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135–161 peptid dizilerini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

VP/AA Kopolimerinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.05'ir.

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{\text{VP/AA}} = 80\ 000\ \text{Da}$

135-161 için  $\Rightarrow M_{\text{pep}} = 2974$

$$\frac{n_{\text{peptid}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{peptid}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{c_{\text{VP/AA}} \cdot M_{\text{peptid}}} = 1, 3, 5, 7, 9$$

1)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 1$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{Peptid}} = 0.00186\text{g}/100\text{ml} = 0.018\text{mg}/\text{ml} = 0.093\text{mg}/5\ \text{ml}$$

2)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 3$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{Peptid}} = 0.0055\text{g}/100\text{ml} = 0.055\text{mg}/\text{ml} = 0.27\text{mg}/5\ \text{ml}$$

3)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 5$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{Peptid}} = 0.0092\text{g}/100\text{ml} = 0.092\text{mg}/\text{ml} = 0.46\text{mg}/5\ \text{ml}$$

4)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 7$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{Peptid}} = 0.0130\text{g}/100\text{ml} = 0.13\text{mg}/\text{ml} = 0.63\ \text{mg}/5\ \text{ml}$$

5)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 9$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{Peptid}} = 0.0167\text{g}/100\text{ml} = 0.167\ \text{mg}/\text{ml} = 0.83\ \text{mg}/5\ \text{ml}$$

VP/AA Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizilerini içeren biyokonjugatlara ait hesaplamalar şu şekildedir:

VP/AA Kopolimerinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.05 dir.

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{VP/AA} = 80\ 000\ \text{Da}$

170-188 için  $\Rightarrow M_{\text{pep}} = 2395$

$$\frac{n_{\text{peptid}}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{\text{peptid}} \cdot M_{VP/AA}}{c_{VP/AA} \cdot M_{\text{peptid}}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15$$

6)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 1$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0017\text{g}/100\text{ml} = 0.017\text{mg}/\text{ml} = 0.34\text{mg}/20\ \text{ml}$

7)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 3$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0045\text{g}/100\text{ml} = 0.045\text{mg}/\text{ml} = 0.90\text{mg}/20\ \text{ml}$

8)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 5$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.075\text{g}/100\text{ml} = 0.75\text{mg}/\text{ml} = 1.5\text{mg}/20\ \text{ml}$

9)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 7$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0105\text{g}/100\text{ml} = 0.10\text{mg}/\text{ml} = 2,1\text{mg}/20\ \text{ml}$

10)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 9$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0135\text{g}/100\text{ml} = 0.135\text{mg}/\text{ml} = 2,7\ \text{mg}/20\ \text{ml}$

11)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 11$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0165\text{g}/100\text{ml} = 0.165\text{mg}/\text{ml} = 3.3\text{mg}/20\ \text{ml}$

12)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 15$  olan 20 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{\text{Peptid}} = 0.0225\text{g}/100\text{ml} = 0.225\text{mg}/\text{ml} = 4.5\text{mg}/20\ \text{ml}$

Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.0134' dir.

1)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 3$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 0.154\text{g}/100\text{ml} = 1.54\text{mg}/\text{ml} = 0.67\text{mg}/5\ \text{ml}$

2)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 5$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 0.09\text{g}/100\text{ml} = 0.9\text{mg}/\text{ml} = 4,5\text{mg}/5\ \text{ml}$

3)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 7$  olan 5 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 0.065\text{g}/100\text{ml} = 0.65\text{mg}/\text{ml} = 3,25\text{mg}/5\ \text{ml}$

4)  $n_{\text{peptid}}/n_{VP/AA} = 9$  olan 3 ml VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 0.05\text{g}/100\text{ml} = 0.5\text{mg}/\text{ml} = 2,50\text{mg}/5\ \text{ml}$

#### 4.4.2.9 Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170-188 Dizisini içeren Fiziksel Komplekslerin Hazırlanması

*n<sub>peptid</sub>/n<sub>VP/AA</sub>=3 oranına ait fiziksel kompleksin hazırlanması:* 10 mg VP/AA kopolimeri (25/75; Mw=80.000) 19.850 ml saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH ile pH 5'e ayarlandı. 0.90 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 170–188 peptid dizisi (Mw=2394) 150 µL DMSO içerisinde çözüldü. Peptid çözeltisi, manyetik karıştırıcı üzerinde karışan polimer çözeltisi üzerine eklendi. 2 saat boyunca +4 °C'de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı ve pH'sı 7'ye ayarlandı. Hazırlanan fiziksel kompleksin yapı-karakterizasyon tayini Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ve floresans spektrofotometre kullanılarak yapıldı.

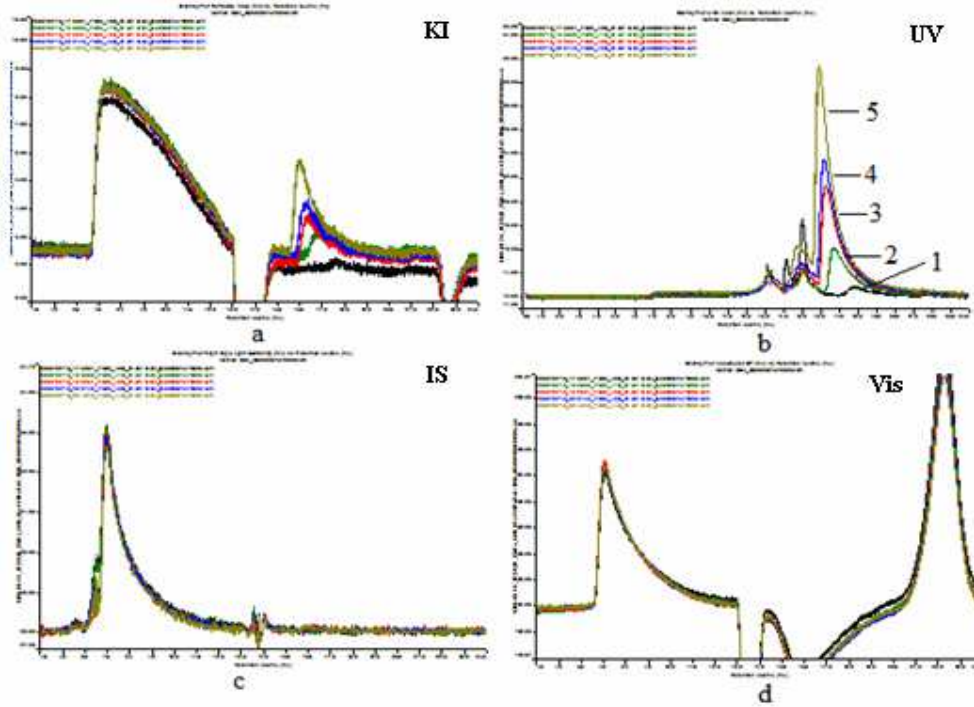
#### 4.4.2.10 Yönteme 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizisini içeren Biyokonjugatların Sentezi

*n<sub>peptid</sub>/n<sub>VP/AA</sub>=3 oranına ait biyokonjugatın sentezi:* 10 mg VP/AA kopolimeri (25/75; Mw=80.000) 19.850 ml saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH ile pH 5e çekildi. 0.89 mg Şap Hastalığı Virüsüne ait 170-188 Peptid dizisi (Mw=2394) 150 µL DMSO içerisinde çözüldü. Peptid çözeltisi, manyetik karıştırıcı üzerinde karışan polimer çözeltisi üzerine eklendi. 2 saat boyunca +4 °C'de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Bu süre sonunda pH değeri 5'ye ayarlandı. Fiziksel kompleks oluştuktan sonra VP/AA kopolimerinin karboksil gurupları 21.27 mg EDC eklenerek aktive edildi ve bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. pH değeri 7'ye ayarlandı ve bir saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Sentezlenen biyokonjugatın yapı-karakterizasyon tayini Viskotek ve HPLC kromatografik sistemleri ve floresans spektrofotometre kullanılarak yapıldı.

#### 4.4.2.11 Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri – Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 ve 170-188 Dizilerini içeren Biyokonjugatların ve Fiziksel Komplekslerin HPLC-Viskotek ve Floresans Cihazlarına ait Analiz Sonuçları

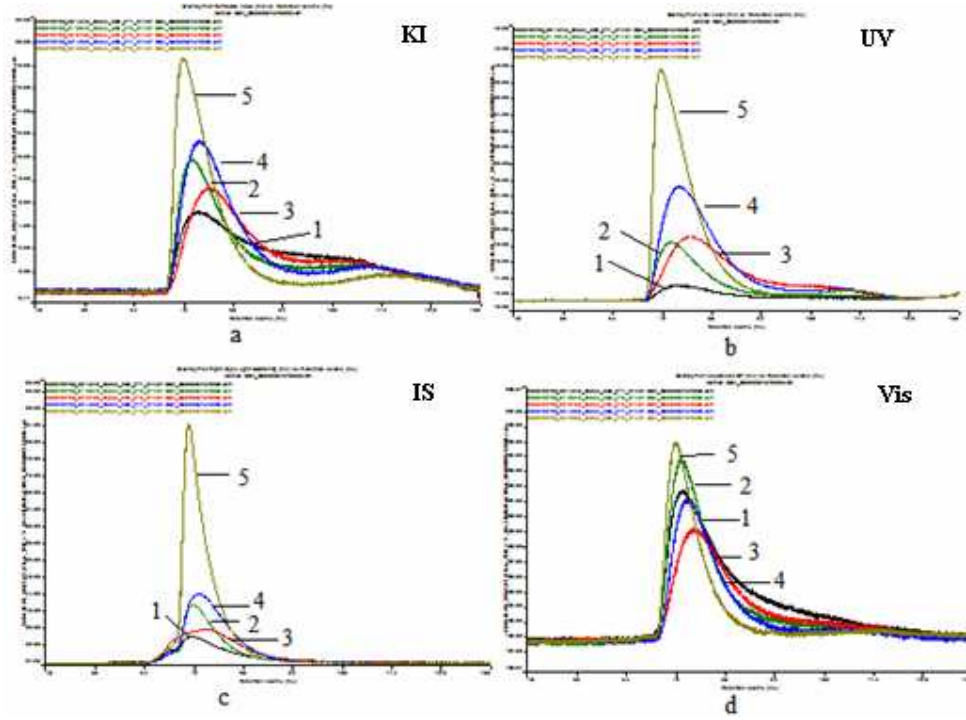
Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135–161 peptid dizisini içeren VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri hazırlandı ve biyokonjugatları sentezlendi. VP/AA (25/75;

Mw=80.000) Kopolimeri konsantrasyonu % 0.05 olacak şekilde sabit tutulup; peptid miktarı artırılarak  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1, 3, 5, 7, 9$  oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid fiziksel komplekslere ait Viskotek, HPLC ve floresans analiz sonuçları:

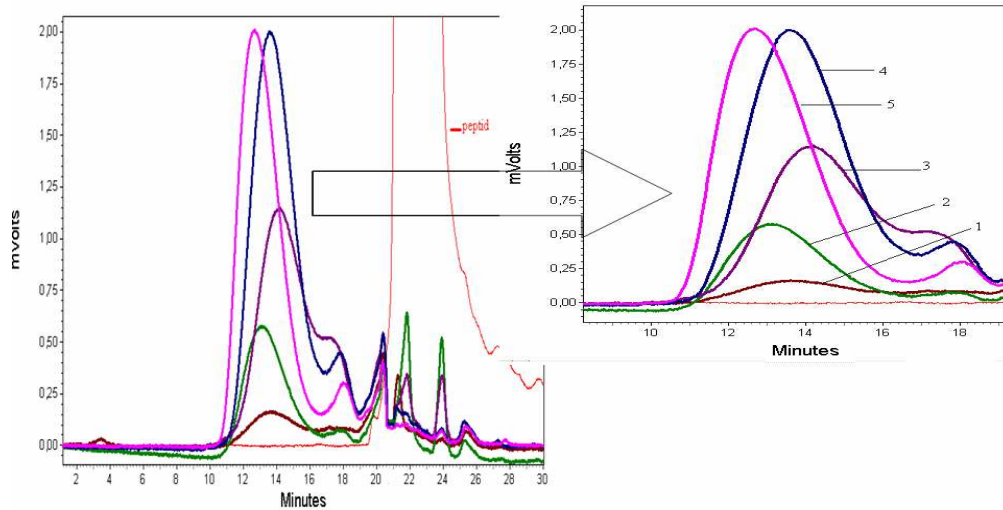


Şekil 4.42 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksine ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

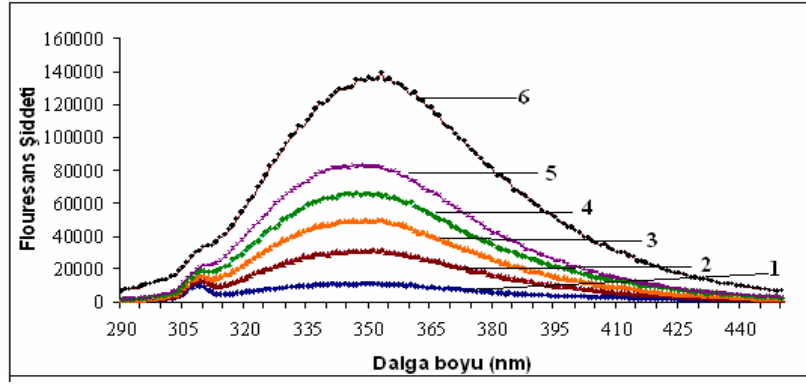
Yöntem 2’ye göre VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri konsantrasyonu % 0.05 olacak şekilde sabit tutulup; peptid miktarı artırılarak  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1, 3, 5, 7, 9$  oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait Viskotek, HPLC ve floresans analiz sonuçları:



Şekil 4.43 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

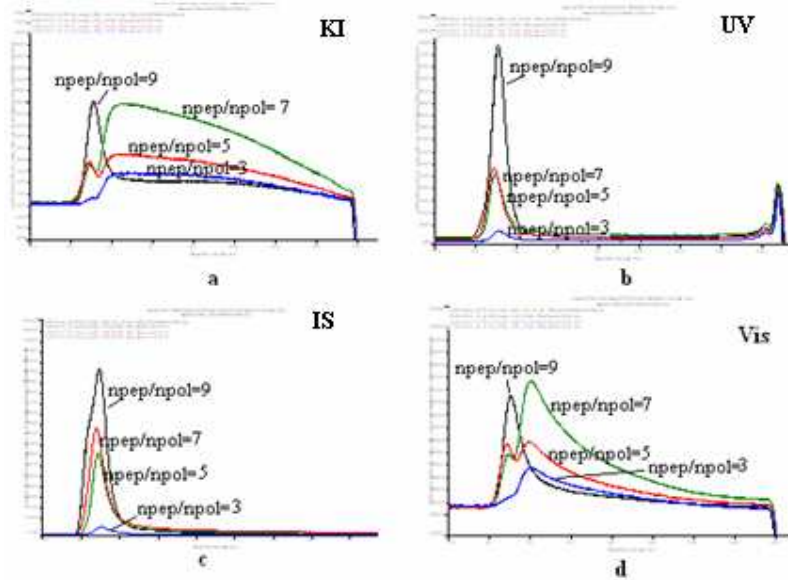


Şekil 4.44 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait HPLC kromatogramı

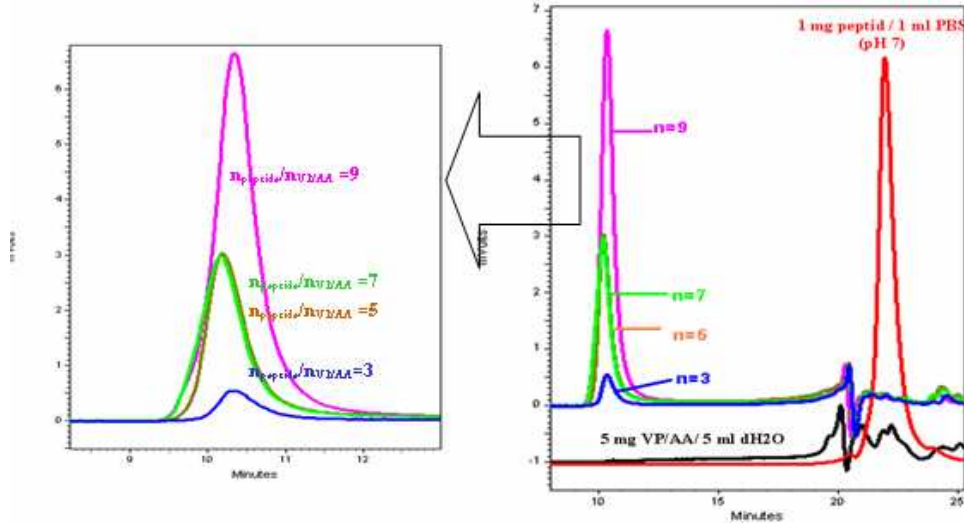


Şekil 4.45 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ;  $\lambda_{\text{max}} 350$  nm), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}} 350$  nm), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ;  $\lambda_{\text{max}} 350$  nm), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ;  $\lambda_{\text{max}} 350$  nm), **(5)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ;  $\lambda_{\text{max}} 349$  nm), **(6)** %0.004 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizine ( $\lambda_{\text{max}} 353$  nm) ait floresans spektrumu

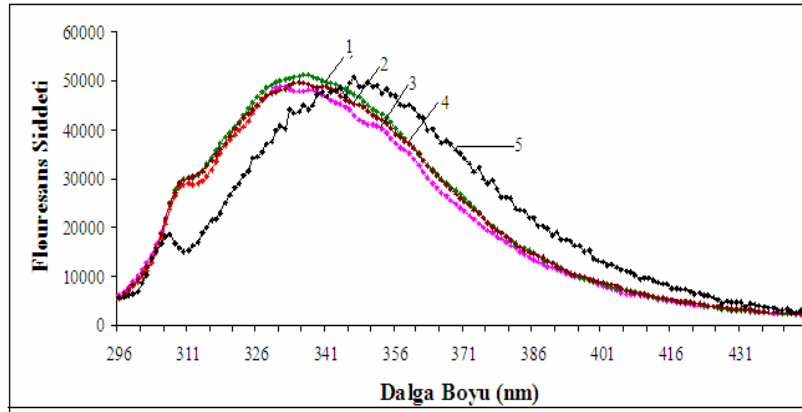
Yöntem 2’ye göre Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 170–188 peptidisinin konsantrasyonu % 0.0134 değerinde sabit tutulup; VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) kopolimeri konsantrasyonu artırılarak  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}= 3, 5, 7, 9$  oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait Viskotek, HPLC ve Floresans analiz sonuçları:



Şekil 4.46 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

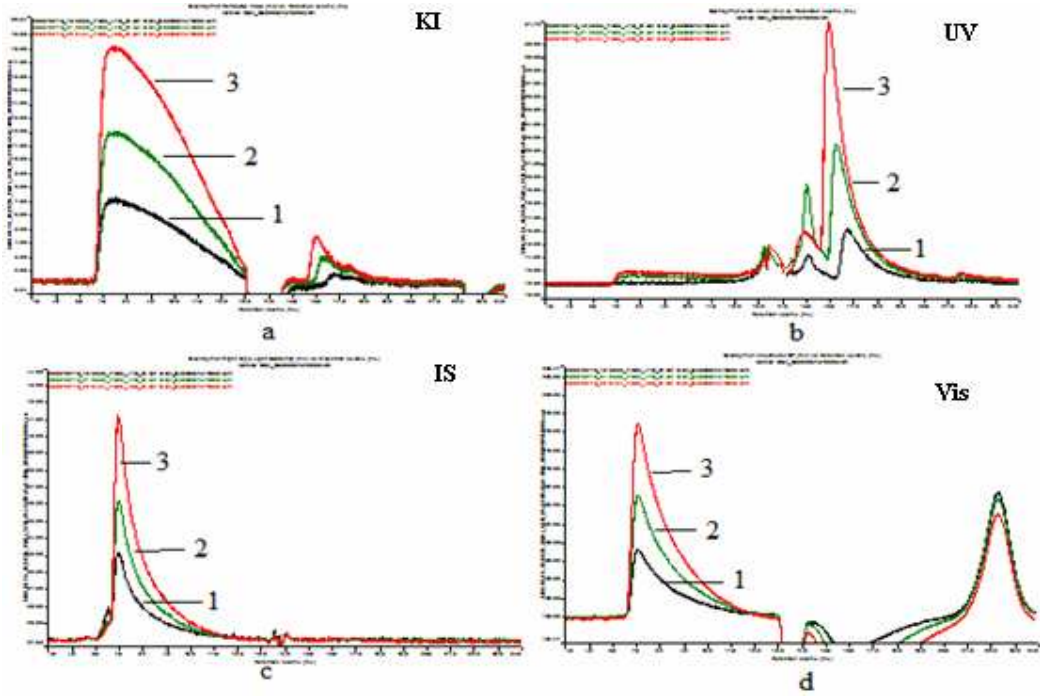


Şekil 4.47 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (4) VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ) ait HPLC kromatogramları

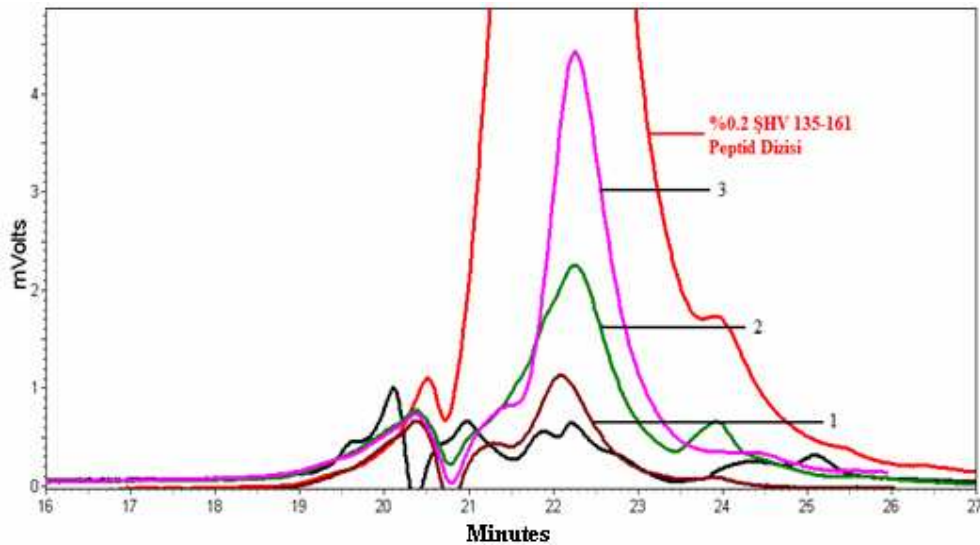


Şekil 4.48 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}}335$  nm), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ;  $\lambda_{\text{max}}337$  nm), (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ;  $\lambda_{\text{max}}337$  nm), (4) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ;  $\lambda_{\text{max}}335$  nm), (5) %0.001 Şap Hastalığı Virüsünün 170-188 Peptid Dizisine ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm) ait floresans spektrumları

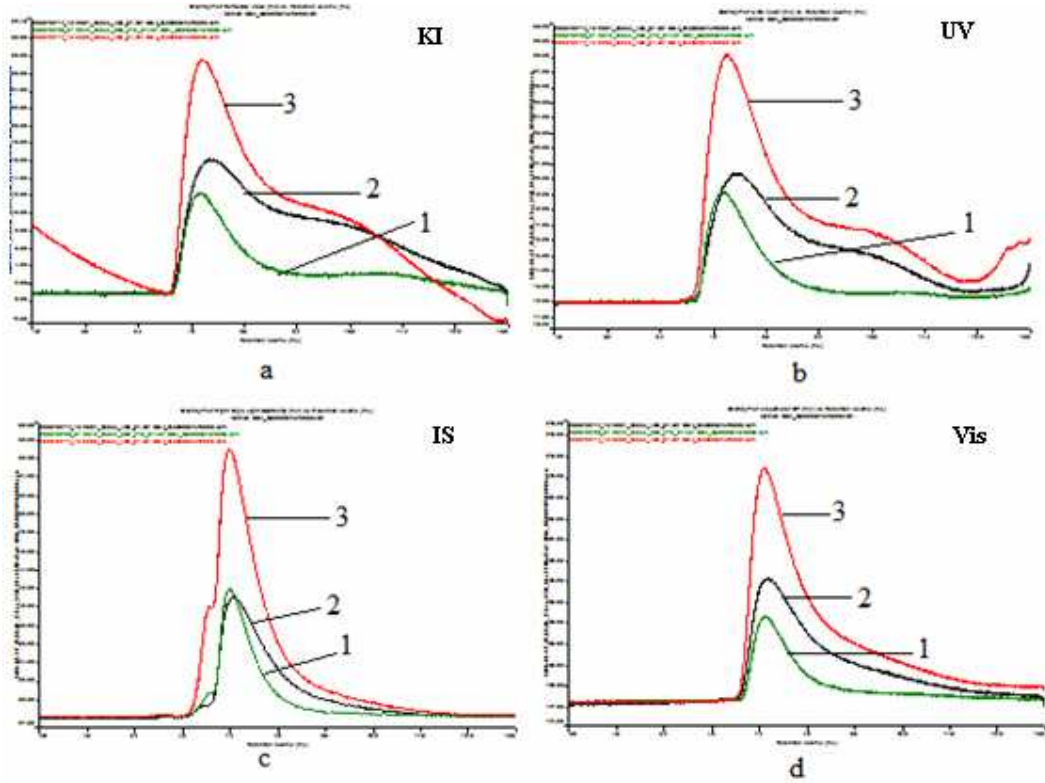
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranı sabit tutularak, bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarında (% 0.5 VP/AA kopolimeri-% 0.05 135–161 peptidi; % 0.1 VP/AA kopolimeri-% 0.01 135–161 peptidi; % 1.5 VP/AA kopolimeri-% 0.15 135–161 peptidi) fiziksel kompleksler hazırlandı ve biyokonjugatlar sentezlendi. Bunların yapı karektrizasyonu Viskotek ve HPLC aletinde kromatografik olarak yapıldı.



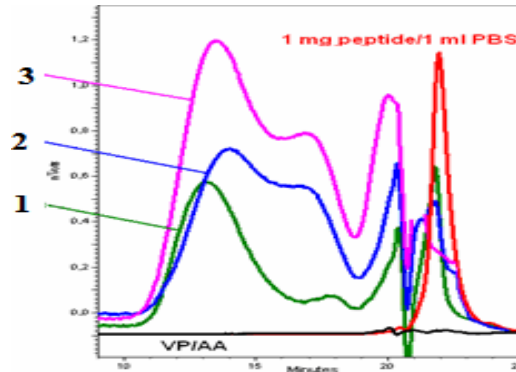
Şekil 4.49  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranı sabit; **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel komplekslerine ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



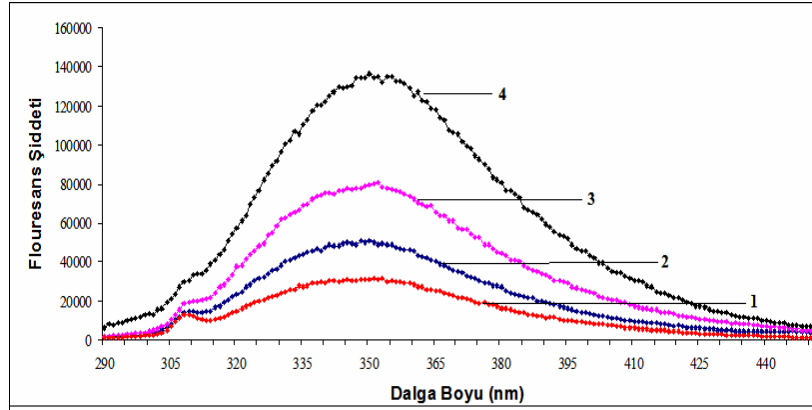
Şekil 4.50  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel komplekslerine ait HPLC kromotogramı



Şekil 4.51  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugata ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

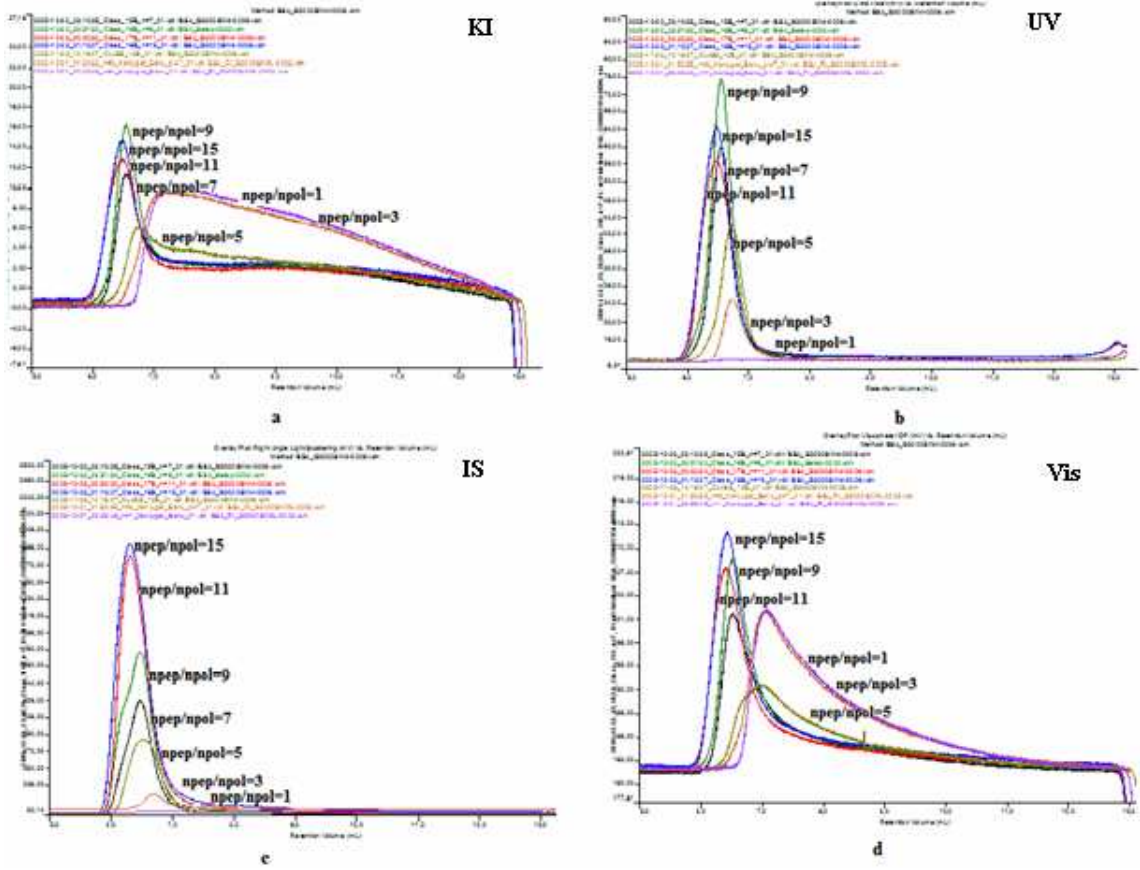


Şekil 4.52  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren, **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugatlarına ait HPLC Kromatogramları

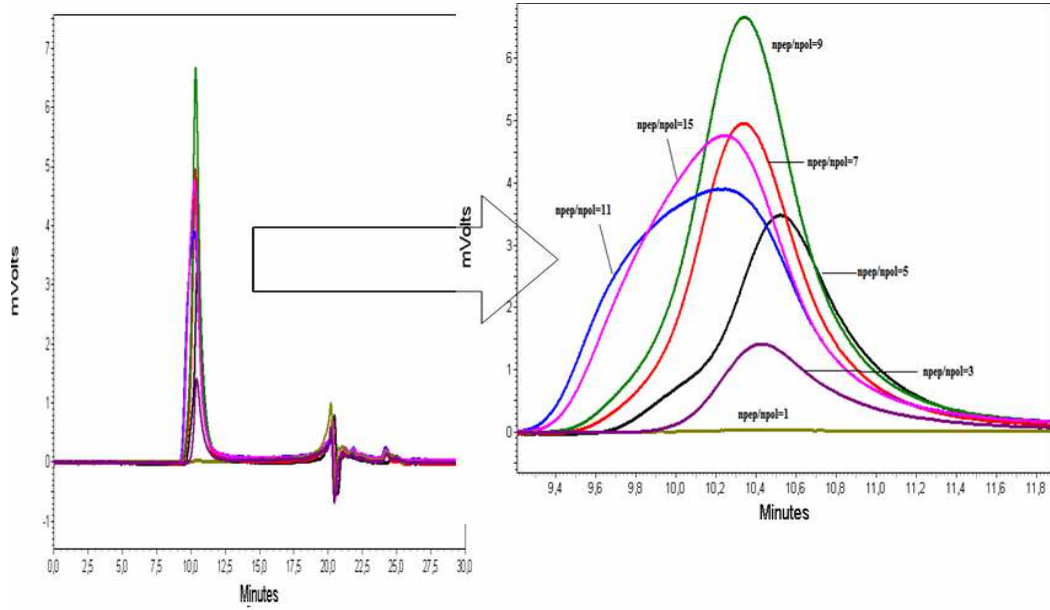


Şekil 4.53  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında **(1)** % 0.5 VP/AA kopolimeri, % 0.05 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm), **(2)** % 0.1 VP/AA kopolimeri, % 0.01 Şap Hastalığı VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}352$  nm), **(3)** % 1.5 VP/AA kopolimeri, % 0.15 Şap Hastalığı Virüsünün yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm), **(4)** % 0.004 Şap Hastalığı Virüsüne ait 135-161 peptid dizisi ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm) ait Floresans Spektrumu

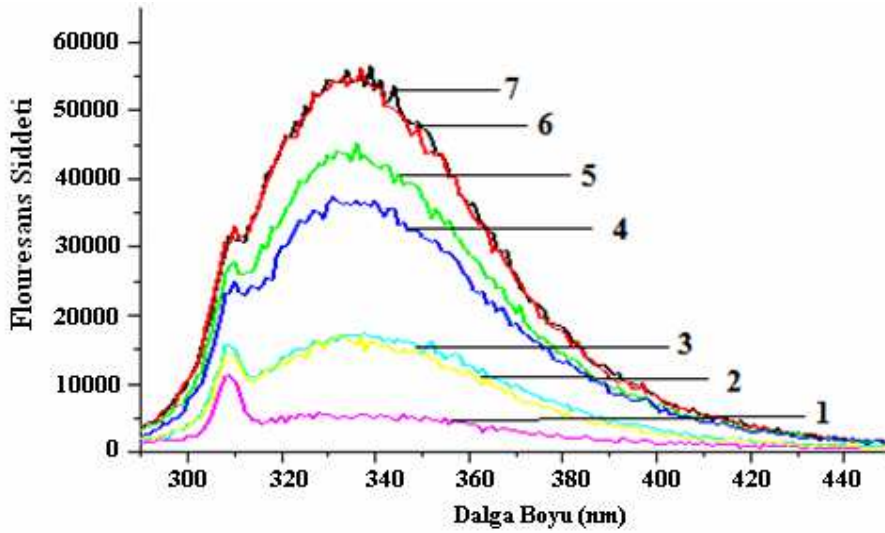
Yöntem 2'ye göre VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) kopolimeri konsantrasyonu % 0.05 olacak şekilde sabit tutulup; peptid miktarı artırılarak  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1, 3, 5, 7, 9, 11, 15$  oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait Viskotek, HPLC ve floresans analiz sonuçları:



Şekil 4.54 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), (4) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), (5) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), (6) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ), (7) VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



Şekil 4.55 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ), **(3)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(4)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ), **(5)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), **(6)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ), **(7)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ) ait HPLC kromotogramları



Şekil 4.56 0.01M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1$ ;  $\lambda_{\text{max}}=328$  nm), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$ ;  $\lambda_{\text{max}}=338$  nm), **(3)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ;  $\lambda_{\text{max}}=332$  nm), **(4)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$ ;  $\lambda_{\text{max}}=332$  nm), **(5)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ;  $\lambda_{\text{max}}=336$ ), **(6)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=11$ ;  $\lambda_{\text{max}}=337$ ), **(7)**VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ;  $\lambda_{\text{max}}=339$ ) ait floresans spektrumları

#### 4.4.3 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrakerör (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranında Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid dizisini içeren Biyokonjugatın Sentezi

##### 4.4.3.1 Kullanılan Çözeltiler

- ❖ 0.5 M 1-metil imidazol Çözeltisi (pH=5.65)

Hesaplama :  $d=1.03 \text{ g/mL}$   $M_w=82.1 \text{ g/mol}$

0.5 M 200 mL çözelti için;

$$M = \frac{n}{V} \Rightarrow 0.5 = \frac{n}{0.2} \Rightarrow n = 0.1 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_w} \Rightarrow 0.1 = \frac{m}{82.1} \Rightarrow m = 8.21 \text{ g}$$

$$d = \frac{m}{V} \Rightarrow 1.03 = \frac{8.21}{V} \Rightarrow V = 7.97 \text{ mL}$$

$d=1.03 \text{ g/mL}$  ( $M_w=82.1 \text{ g/mol}$ ) olan 1-metil imidazol çözeltisinden 7.97 mL alındı üzerine 180 mL saf su ilave edildi. pH ölçüldü (10.3) ve pH 2M NaOH kullanılarak 5.65'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

##### 4.4.3.2 Hesaplamalar

BSA-Peptid biyokonjugatına ait hesaplama aşağıdadır:

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 3$  olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{peptid}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{peptid}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{peptid}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{12 \text{ ml}} \cdot 66000}{2975 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{12 \text{ ml}}}$$

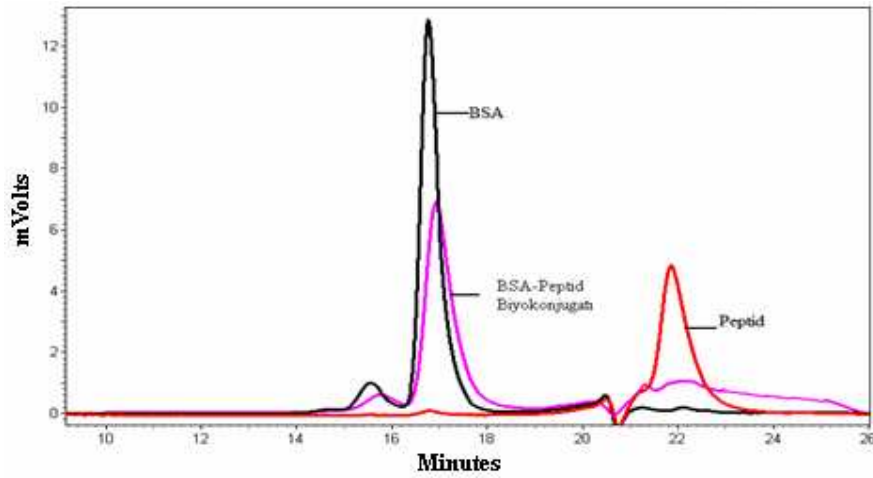
$$\Rightarrow x = 0.81 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

#### 4.4.3.3 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrakerör (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranında Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Biyokonjugatın Hazırlanışı

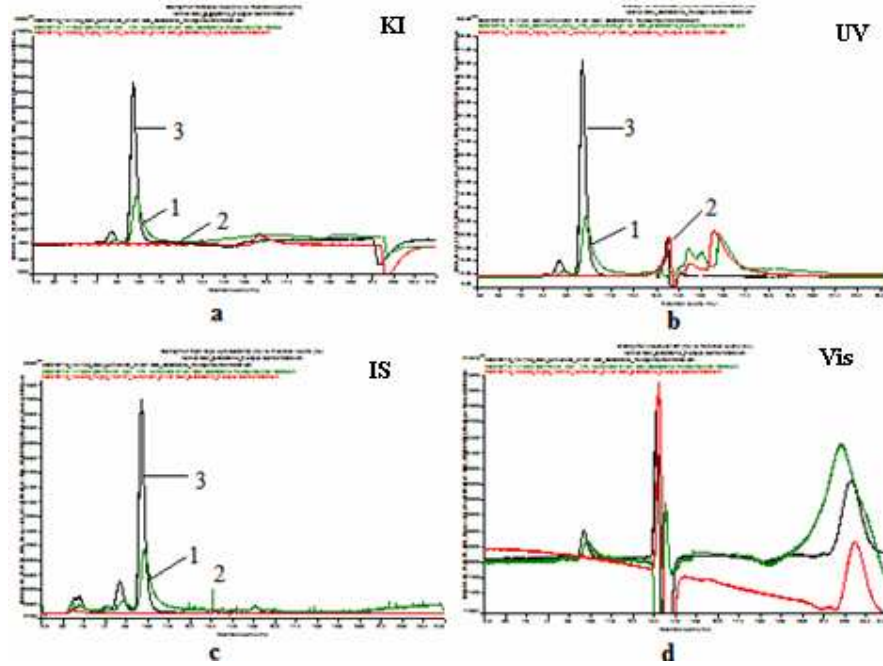
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 3$  oranına ait biyokonjugatın sentezi: 6 mg BSA 4mL 0.1 M PBS (pH 7) içerisinde

çözüldü. 0.81 mg Şap Hastalığı Virüsüne ait 135–161 dizilimli Peptid ( $M_w=2556$ ) 2 mL 0.1 M PBS pH 7 içerisinde çözüldü. Peptid çözeltisi BSA çözeltisi üzerine eklendi. 30 dakika +4 °C’de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldıktan sonra üzerine 6 mL 0.5 M N-Metil imidazol eklendi. 2 saat manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Örneğin pH değeri 5’e düşürüldü. BSA’nın karboksil gruplarının aktivasyonu 14.2 mg EDC eklenerek yapıldı. 1 gece +4 °C’de manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Bu süre sonunda pH değeri 7’ye çekildi ve 4 saat tekrar karıştırıldı. pH değeri tekrar ölçüldü ve numunenin yapı ve karakterizasyonu HPLC, Viskotek [Dört Dedektörlü (UV, Kırılma İndisi, Viskozite ve Işık saçılması)] kromatografik sistemleri ile incelendi.

#### 4.4.3.4 Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraker (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ Bovine Serum Albumin ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid dizisini içeren biyokonjugatına ait HPLC-Viskotek Cihazları Analiz Sonuçları



Şekil 4.57 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranında BSA-Peptid Biyokonjugatı, (2) % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi, (3) % 0.2 BSA’ya ait HPLC Spektrumu



Şekil 4.58 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış (1)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranında BSA-Peptid Biyokonjugatı, (2) % 0.01 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi, (3)% 0.2 BSA’a ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

#### 4.4.4 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak, Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezi

Mikrodalga, 1940’lardan beri bilinmektedir, ama ilk kez 1986’da R. Gedye ve R. J. Majetich tarafından organik kimyada kullanılmaya başlanmıştır. Gedye ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mikrodalga kullanıldığında, ısıtıcı gibi cihazlarla ısıtılarak gerçekleştirilen reaksiyonlara göre, mikrodalga yönteminde reaksiyonların çok daha hızlı ilerlediğini, örneğin 8 saat sürebilecek bir reaksiyonun dakikalar içinde tamamlandığını, gördüler. Mikrodalga yöntemi ilk yıllarda çok rağbet görmemesine rağmen, ilerleyen teknolojiyle birlikte her geçen gün daha çok kullanılan bir yöntem haline gelmektedir (Brittany, 2002).

Mikrodalga elektromanyetik spektrumda X-ışınları, UV-görünür bölge ve IR’den daha az enerjili bölgede yer almaktadır ve 300–300000 MHz frekans aralığındadır. Mikrodalga frekansı, yani enerjisi, çok düşük olduğu için bağları kırmadan sadece dönmelerine sebep olmaktadır (Brittany, 2002).

#### 4.4.4.1 Hesaplamalar

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{VP/AA} = 80\,000$  Da

135-161 için  $\Rightarrow M_{pep} = 2975$

$$\frac{n_{peptid}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{peptid} \cdot M_{VP/AA}}{c_{VP/AA} \cdot M_{peptid}} = 2, 4$$

1)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 2$  olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{Peptid} = 0.09\text{g}/100\text{mL} = 0.9\text{mg/mL}$$

2)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 4$  olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{Peptid} = 0.15\text{ g}/100\text{mL} = 1.5\text{ mg/mL}$$

-N terminal uc kısmında trp amino asidi içermeyen 136-161  $\Rightarrow 2791$

3)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 8$  olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{Peptid} = 0.27\text{g}/100\text{mL} = 2.7\text{ mg/mL}$$

4)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 12$  olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{Peptid} = 0.41\text{g}/100\text{mL} = 4.1\text{ mg/mL}$$

#### 4.4.4.2 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Hazırlanması

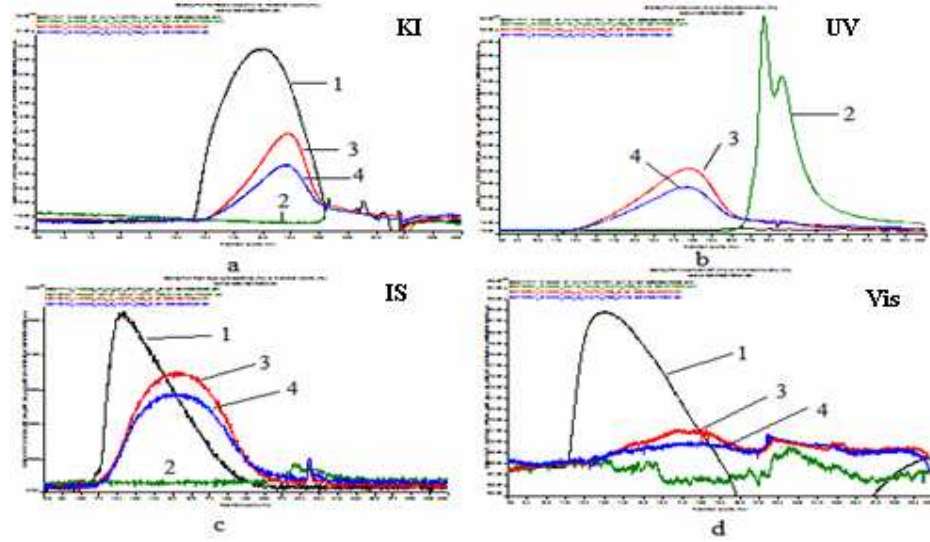
$n_{peptid}/n_{VP/AA} = 2$  oranına ait biyokonjugatın sentezi: 10 mg VP/AA kopolimeri (25/75;  $M_w=80.000$ ) 5 mL dimetilformamid (DMF) ( $C_3H_7ON$ ) içerisinde çözüldü. VP/AA kopolimerinin karboksil gruplarının aktivasyonu 18.3 mg *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uranyum heksaflorofosfat ( $C_{11}H_{16}F_6N_5OP$ ) ( $M_w=379.24$ ) (HBTU) ve 6.7 mg 1-Hidroksilbenzotriazol hidrat ( $C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$ ) (135.12 susuz) (HOBt) eklenerek yapıldı. 0.9 mg Şap Hastalığı Virüsüne ait 135-161 peptid dizisi ( $M_w=2974$ ) 4 mL DMF içerisinde çözüldü. 0.3 mL Diizopropil etilendiamin (DIEA) ve 0.7 mL (N-Metil Pirilidon) (NMP) baz çözeltisi peptid üzerine eklendi. Peptid çözeltisi polimer çözeltisi üzerine ilave edildi ve manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. 25 watt, 26-75 °C sıcaklık arasında 3 dakika süren aralıklarla Liberty peptid sentez cihazının Discovery modülü içerisinde mikrodalga işlemine maruz tutuldu. Örnek çözelti 50 mL falkon tüp içerisine alındı ve üzerine 35 mL soğuk (-20 °C) etil asetat eklenerek çöktürüldü. Çökelti -6 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu HPLC, Viskotek [Dört Dedektörlü (UV,

Kırılma İndisi, Viskozite ve Işık saçılması)] kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle incelendi.

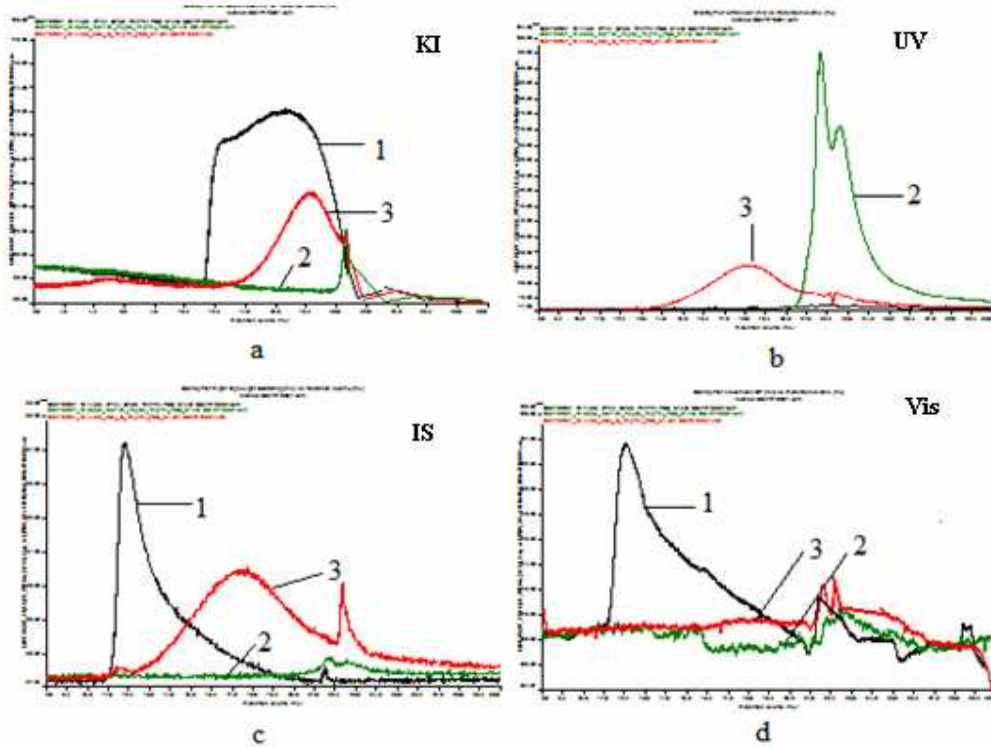
#### **4.4.4.3 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri (25:75; Mw 80.000) ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların HPLC-Viskotek ve Floresans Sonuçları**

Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında farklı oranda akrilik asid içeren VP/AA (25/75; Mw 80.000) ve VP/AA (50/50; Mw 80.000) kopolimerleri kullanıldı. VP/AA-Peptid biyokonjugat sentezinde kullanılan Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi Biyomühendislik Bölümü tarafından; 0.1-1 mol aralığında sentez yapabilen ve Fmoc kimyasına dayalı olarak çalışan Liberty Peptid sentez cihazında (CEM) sentezlendi. Sentezlenen Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisi LC-MS cihazında analizleri yapıldı.

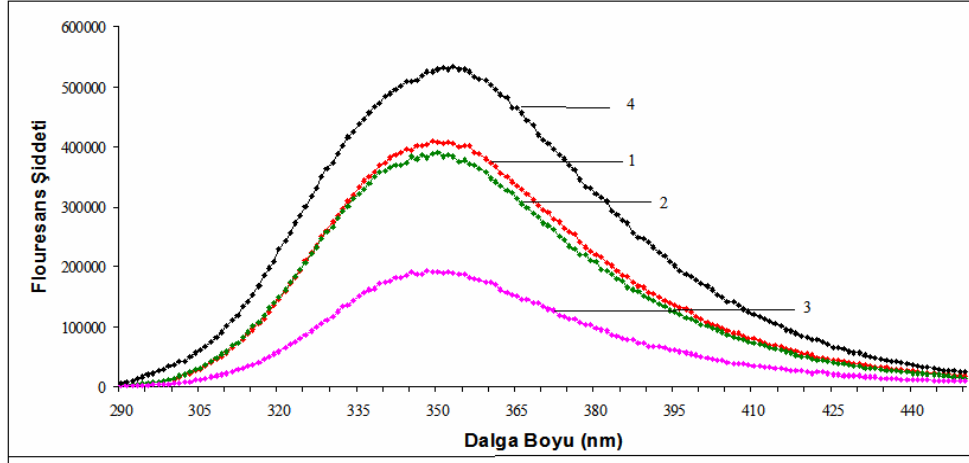
Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda farklı oranda akrilik asid içeren VP/AA (25/75; Mw=80.000) ve VP/AA (50/50; Mw 80.000) kopolimeri ile bileşenlerinin farklı oranlarında  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2, 4$  VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatının yapı ve karakterizasyonu Viskotek ve HPLC cihazlarında kromatografik olarak yapıldı. Ayrıca zetasiser cihazında boyut (nm) ve zetapotansiyel ölçümü gerçekleştirildi.



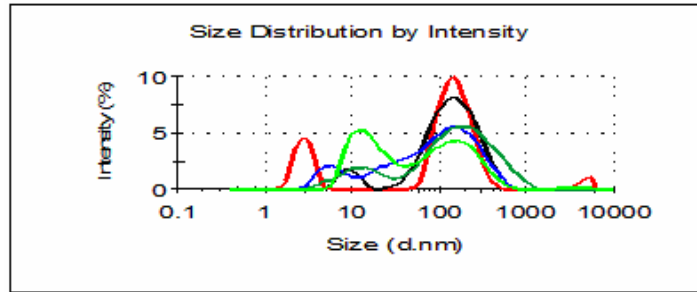
Şekil 4.59 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.2 VP/AA (25/75;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, **(2)** % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinininin 135-161 Peptidi, **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



Şekil 4.60 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.2 VP/AA (50/50;  $M_w=80.000$ ) Kopolimeri, **(2)** % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinininin 135-161 Peptidi, **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları



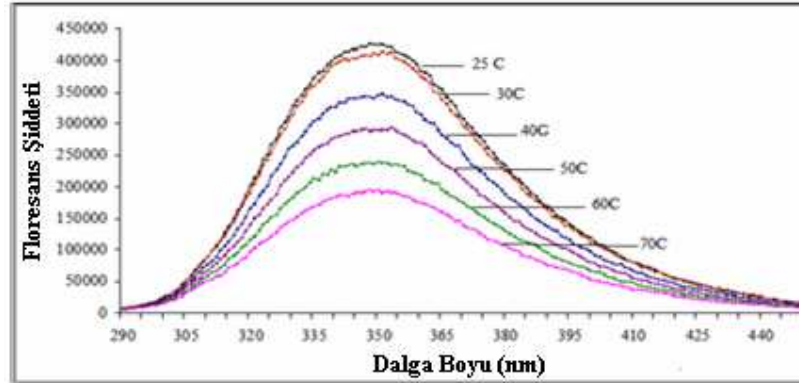
Şekil 4.61 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ;  $\lambda_{\text{max}}350$  nm), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ; ( $\lambda_{\text{max}}350$  nm), **(3)** VP/AA(50/50)-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ;  $\lambda_{\text{max}}350$  nm) **(4)**%0. 05 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizilimli Peptidine ( $\lambda_{\text{max}}353$  nm) ait floresans sonuçları



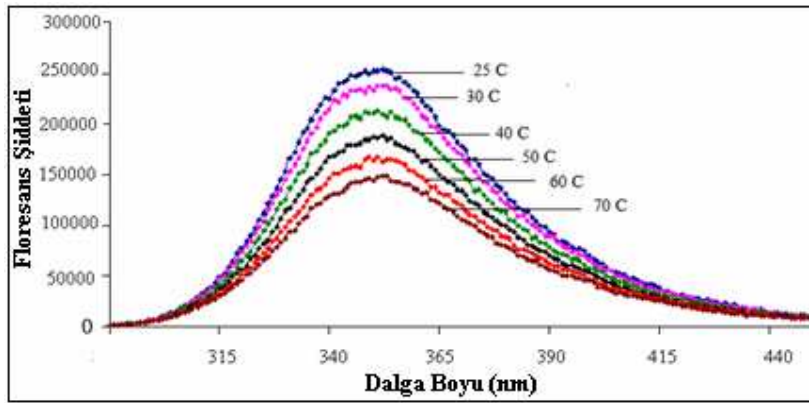
Örnekler	Boyut	Zeta Potansiyeli
% 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptidi	2.49	-13.5
% 0.5 VP/AA (25/75, Mw 80 000) Kopolimeri	7.91	-33
VP/AA-Pepid Fiziksel Karışımı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ )	4.92	-22.5
Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ )	10.1	-16.1
EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2’ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ )	6.39	-18.7

Şekil 4.62 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptidi, **(2)** % 0.5 VP/AA Kopolimeri, **(3)**VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), **(4)** Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), **(5)** EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2’ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ) ait zetasizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti ölçüldü.

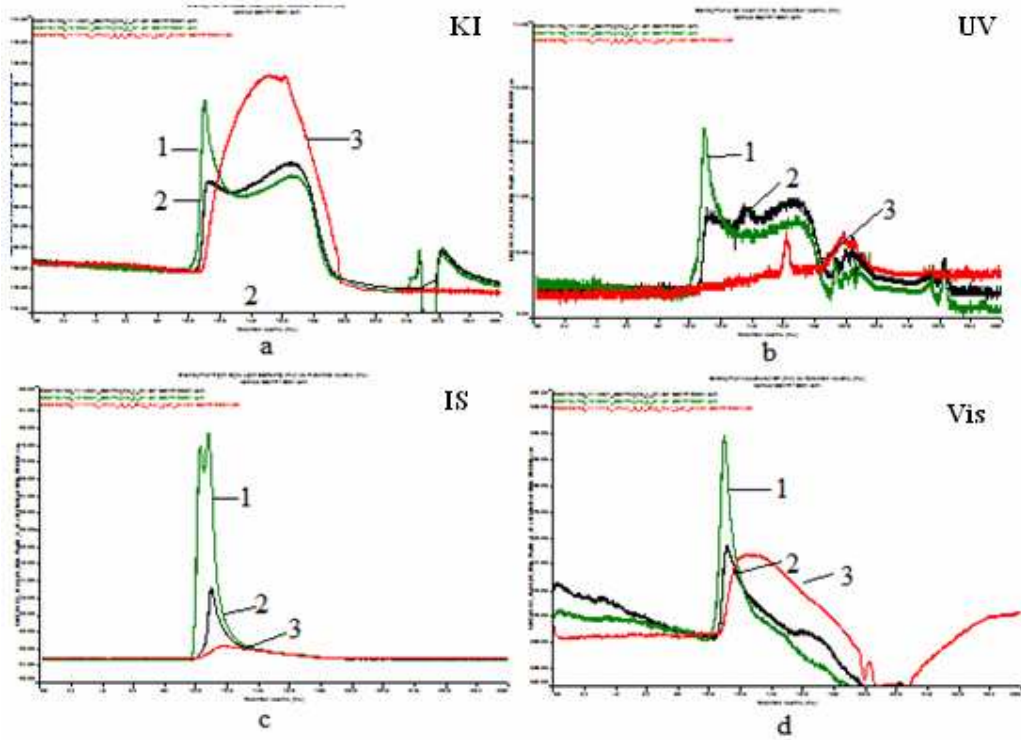


Şekil 4.63  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$  oranına sahip VP/AA-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti



Şekil 4.64  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$  oranına sahip VP/AA(50/50)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti

Aynı VP/AA-Peptid biyokonjugatları, (-N terminal ucunda trp amino asidi içermeyen) 135-161 peptid dizisi ile  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 8; 12$  oranlarında sentezlendi. Sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatının Viskotek cihazı analiz sonuçları:



Şekil 4.65 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=12$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$ ), **(3)** % 0.2 VP/AA Kopolimerine (25/75; 80 000) ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

#### 4.5 Floreskamin Yöntemi ile VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanması

Bu çalışmada tek başına floresans özellik göstermeyen ancak primer alifatik amin grupları ile reaksiyona girdiğinde fluorophor özellikte ürün oluşturan Floreskamin (Filenko vd., 2001; Sidney vd., 1991) kullanılarak VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının konjugasyon derecesi hesaplandı. Peptid moleküllerinin VP/AA kopolimeri ile oluşturduğu konjugatların konjugasyon derecesi serbest peptid ve fiziksel komplekslerle karşılaştırmalı olarak yapıldı.

##### 4.5.1 Hesaplamalar

Her bir çözelti için  $n_{\text{floreskamin}}/n_{\text{peptid}}$  ( $n_f/n_p$ ) oranı hesaplanarak bu oranlar için  $\lambda_{\text{max}}$  dalga boyundaki  $I_{\text{max}}$  Floresans şiddetlerine göre çizilen grafikten peptiddeki serbest amino grubu sayısı tayin edilir.

Şap Hastalığı Virüsünün 136-161 peptidinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.003’dür.

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{\text{VP/AA}} = 80\ 000$  Da

135-161 için  $\Rightarrow M_{\text{peptid}} = 2975$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{2\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 0,34$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{4\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 0,68$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{8\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 1,35$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{12\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 2,03$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{16\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 2,71$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{24\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 4,06$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{30\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 5,08$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{36\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 6,1$$

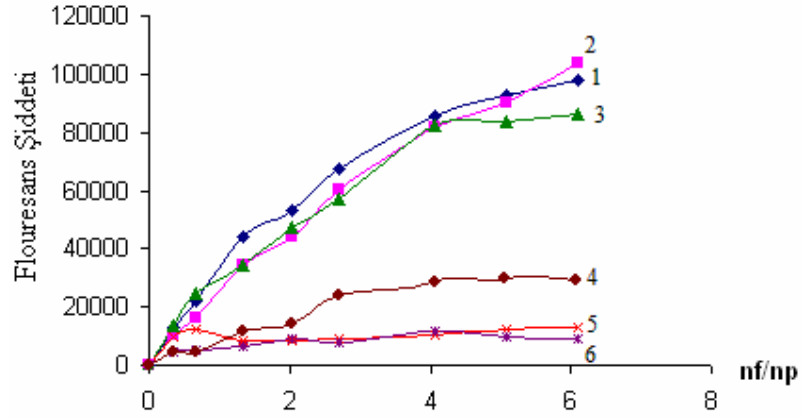
$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{44\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 7,46$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{52\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 8,8$$

#### 4.5.2 Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlardaki Amino Grubu Sayısının Tayini

4,51 mg Peptid 142.8 mL borik asid tamponunda içerisinde olacak şekilde çözülür. Çözeltiden 4'er mL'lik 10 adet numune alınır. 10 numune üzerine sırası ile 2 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl, 24 µl, 30 µl, 36 µl, 44 µl, 52 µl floreskamin çözeltisinden eklenir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 1.5 dakika karıştırma yapıldıktan sonra 390 nm'de uyarma yapılarak çözeltinin floresans spektrumu alınır.

#### 4.5.3 Floreskamin Yöntemi ile Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanmasına ait Deney Sonuçları



Şekil 4.66 (1) % 0.003 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizisi, (2) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (5) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), (6) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ) ait flouresans şiddet değişimi

#### 4.6 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların MCF-7 Kanser Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi

İlk Mossmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir (Mosman, 1983; Alley vd., 1988). MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (Alley vd., 1988). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Öztopçu, vd., 2005, Abe ve Matsude, 2000).

##### 4.6.1 MTT Deneyinin Hazırlanması

Herbir kuyucuğa  $1 \times 10^4$  hücre düşecek şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildikten sonra hücreler ilaç uygulamasına alındı. Serbest peptid 4; 2; 1; 0.75; 0.50; 0.2 mg/mL, sebest VP/AA kopolimeri 15; 10; 4; 1.5; 1; 0.7; 0.4; 0.2; 0.1; 0.005 mg/mL, VP/AA-Peptid fiziksel karışımı ve biyokonjugat 3.2; 2; 1.2; 0.4; 0.32; 0.24; 0.16; 0.08; 0.04

mg/mL oranlarında besi ortamına eklendi. İlaç uygulanmış her bir kuyucuktan elde edilen optik yoğunluk 540 nm'de okundu. Okunan değerler, her bir kuyucuktaki ilaç uygulanan hücrelerin absorbansı x100/kontrol hücrelerin absorbansı formülüne göre canlı hücre yüzdesine çevrildi. Serbest peptid ve VP/AA-Peptid fiziksel kompleks ve biyokonjugatın doz-cevap eğrileri belirlenerek kontrolün yüzdesi değeri olarak ifade edildi. Doz-cevap eğrileri yardımı ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

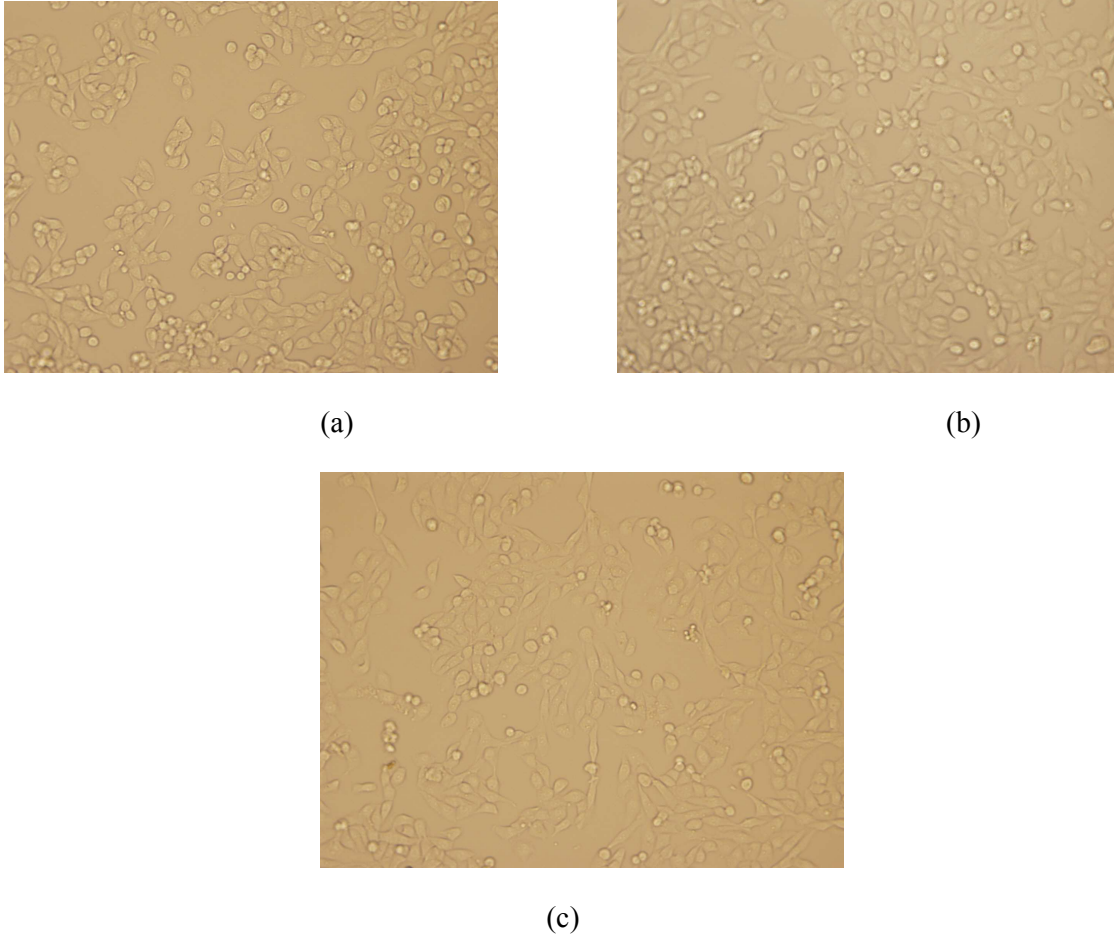
#### **4.6.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi**

Mikroplağın (96) kuyularına ekilen 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat inkübe edilen MCF 7 hücrelerinin morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. MCF 7 hücrelerinin kuyucuk yüzeylerini eşit miktarda kapladıkları, normal morfolojik özelliklerini taşıdıkları ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre olmadığı gözlemlendi.

Bu mikroplak kültür deneyinde Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisinin değişik konsantrasyonlarının (4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.20 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi. Deneyde her bir konsantrasyon için 5 kez tekrar edildi ve serbest peptid eklenmeyen kuyular kontrol grubu olarak değerlendirildi.

##### **4.6.2.1 Morfolojik İnceleme**

Serbest peptidin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskopik olarak incelendi. Kontrol grubu olan kuyularda ki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.67 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonu sonucu oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 4 mg/mL (b) 0.2 mg/mL (c) Kontrol

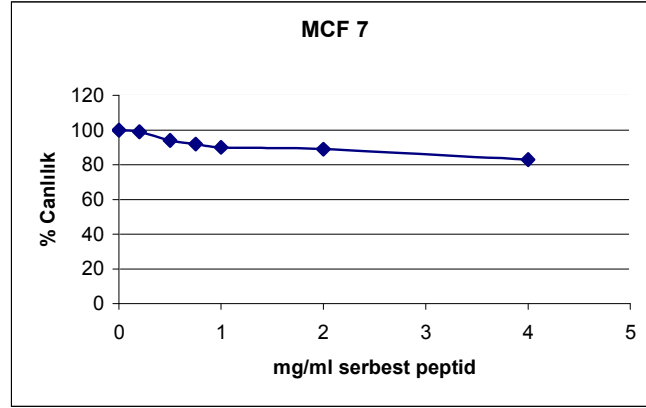
#### 4.6.3 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Farklı Konsantrasyonlardaki 135-161 Peptid Dizisinin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki serbest peptidin MCF 7 hücreleri üzerine etkisi morfolojik olarak incelendikten sonra bu mikropolak kuyucukları üzerine MTT solüsyonu eklendi ve 24 saat sonra, hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi. Kontrol grubu olan kuyucuklardaki hücreler üzerinde en fazla formazan kristalleri oluştu ve formazan kristali oluşturmayan tek tek ölü hücreler gözlemlendi.

Mikroplaktaki kuyucuklarında formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol ve serbest peptidin farklı konsantrasyonu

için ayrı ayrı uygulanan kuyucukların 570 nm'deki absorbans değerlerinin ortalamaları (herbir konsantrasyon için 5 kuyu) alınarak % canlılık hesaplandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 MCF 7 hücrelerinin serbest peptidin konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği

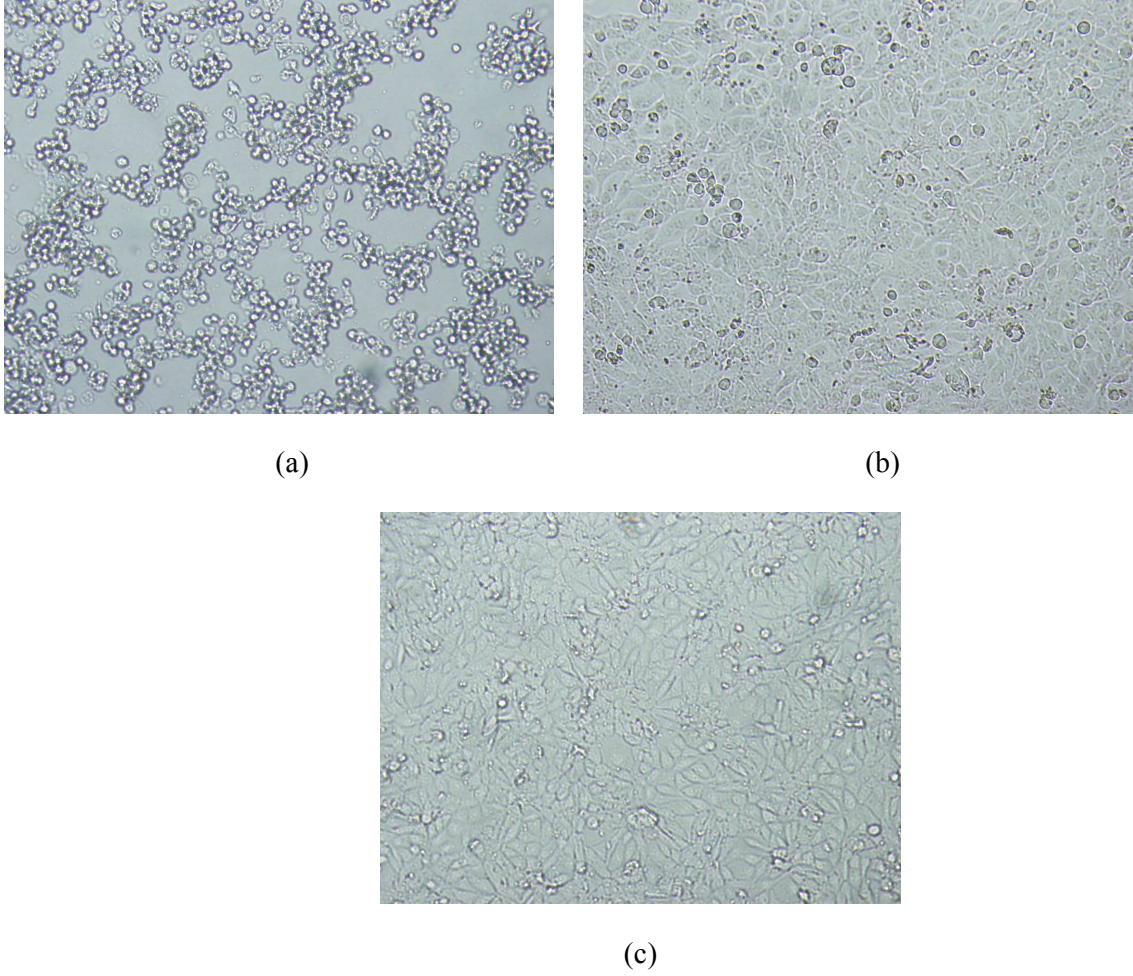


#### 4.6.4 Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (25/75; Mw 80000) MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Bu mikropalak kültür deneyinde ise VP/AA kopolimerinin değişik konsantrasyonlarının (15 mg/mL, 10 mg/mL, 4 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

##### 4.6.4.1 Morfolojik İnceleme

VP/AA kopolimerinin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden ardından inkübatöre kaldırılan mikropalaka kuyucuklarındaki hücrelerin durumu 24 saat sonra mikroskopik olarak incelendi.



Şekil 4.68 VP/AA kopolimerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 6 mg/mL (b) 0.2 mg/mL (c) Kontrol

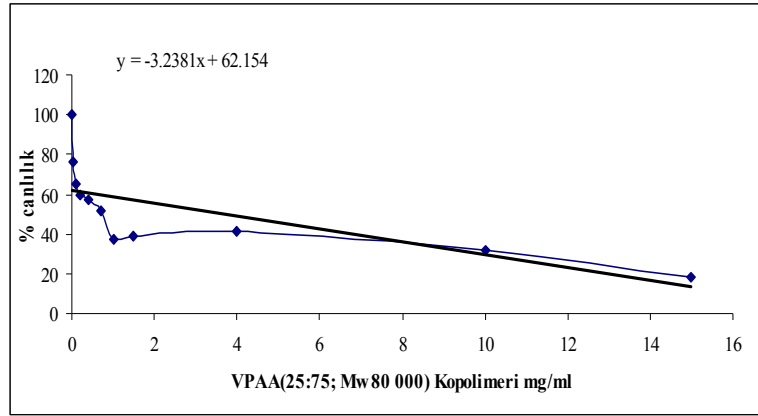
#### 4.6.5 Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (25/75; Mw 80000) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

##### 4.6.5.1 Morfolojik İnceleme

MTT solüsyonunu şekil 4.68'de morfolojileri incelenen bu kuyucuklara eklendikten 24 sonra hücrelerin, MTT ile etkileşmesi sonucu meydana getirdiği değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi.

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

Çizelge 4.3 MCF 7 hücrelerinin VP/AA kopolimer konsantrasyonuna bağlı % canlılık grafiği

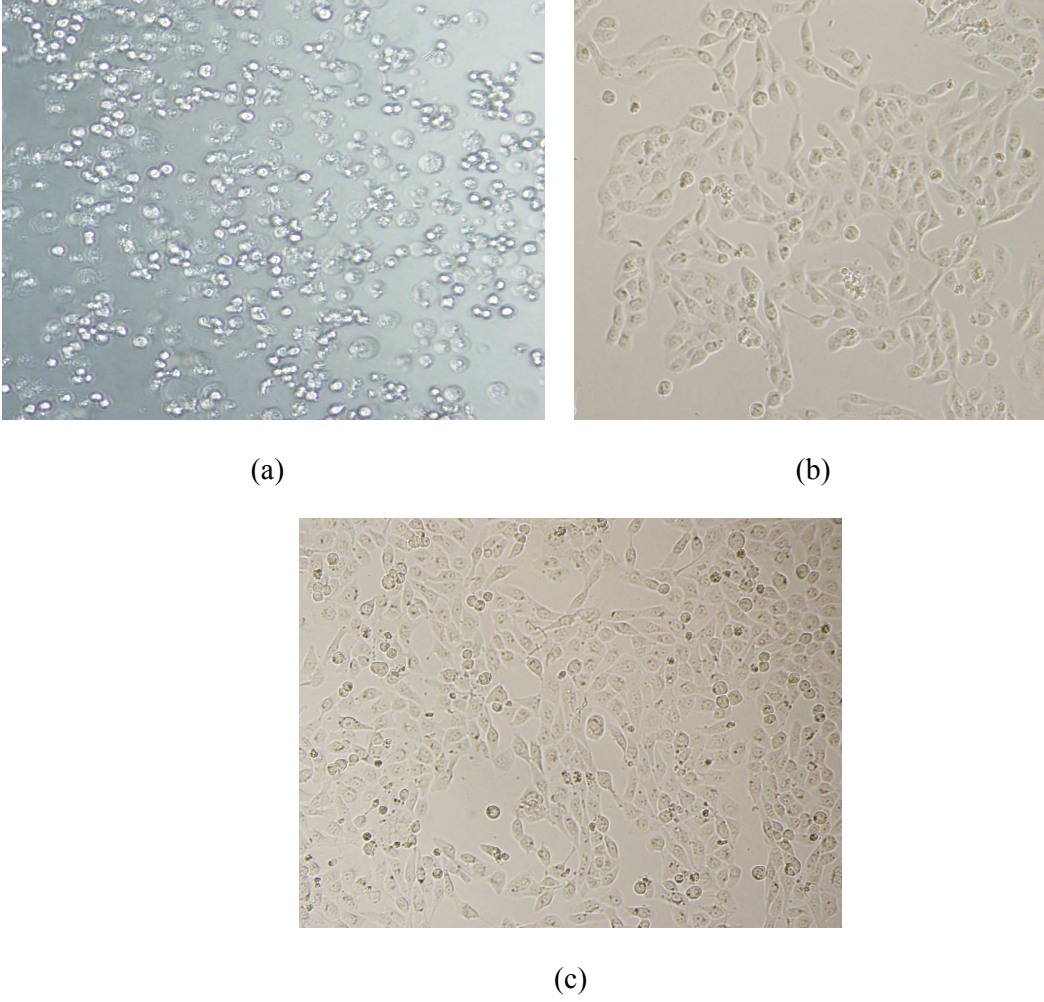


#### 4.6.6 VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Mikroplağın (96) kuyularına ekilen MCF 7 hücrelerinin 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. Yapılan bu mikroplak kültür deneyinde VP/AA-Peptid fiziksel karışımının değişik konsantrasyonlarının (3.2 mg/mL, 2 mg/mL, 1.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

##### 4.6.6.1 Morfolojik İnceleme

VP/AA-peptid fiziksel karışımının MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi.



Şekil 4.69 VP/AA-Peptid fiziksel karışımının 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 3,2 mg/mL (b) 0.04 mg/mL (c) Kontrol

#### 4.6.7 VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

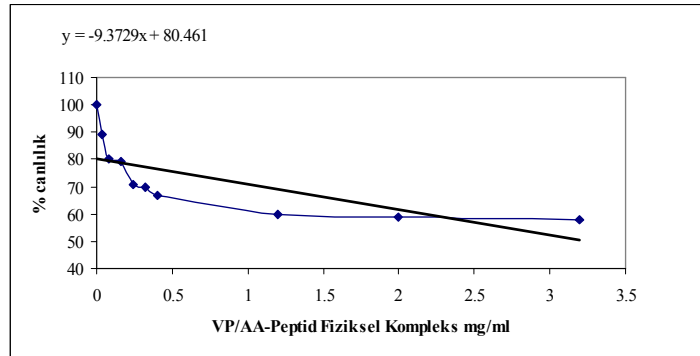
##### 4.6.7.1 Morfolojik İnceleme

MTT solüsyonunu şekil 4.69'da morfolojileri incelenen bu kuyucuklara eklendikten 24 saat sonra hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi.

Mikroplaktaki kuyucuklarında formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol ve serbest peptidin farklı konsantrasyonu

için ayrı ayrı uygulanan kuyucukların 570 nm'deki absorbans değerlerinin ortalamaları (herbir konsantrasyon için 5 kuyu) alınarak % canlılık hesaplandı

Çizelge 4.4 MCF 7 hücrelerinin VP/AA-Peptid fiziksel karışımının konsantrasyona bağlı % canlılığı



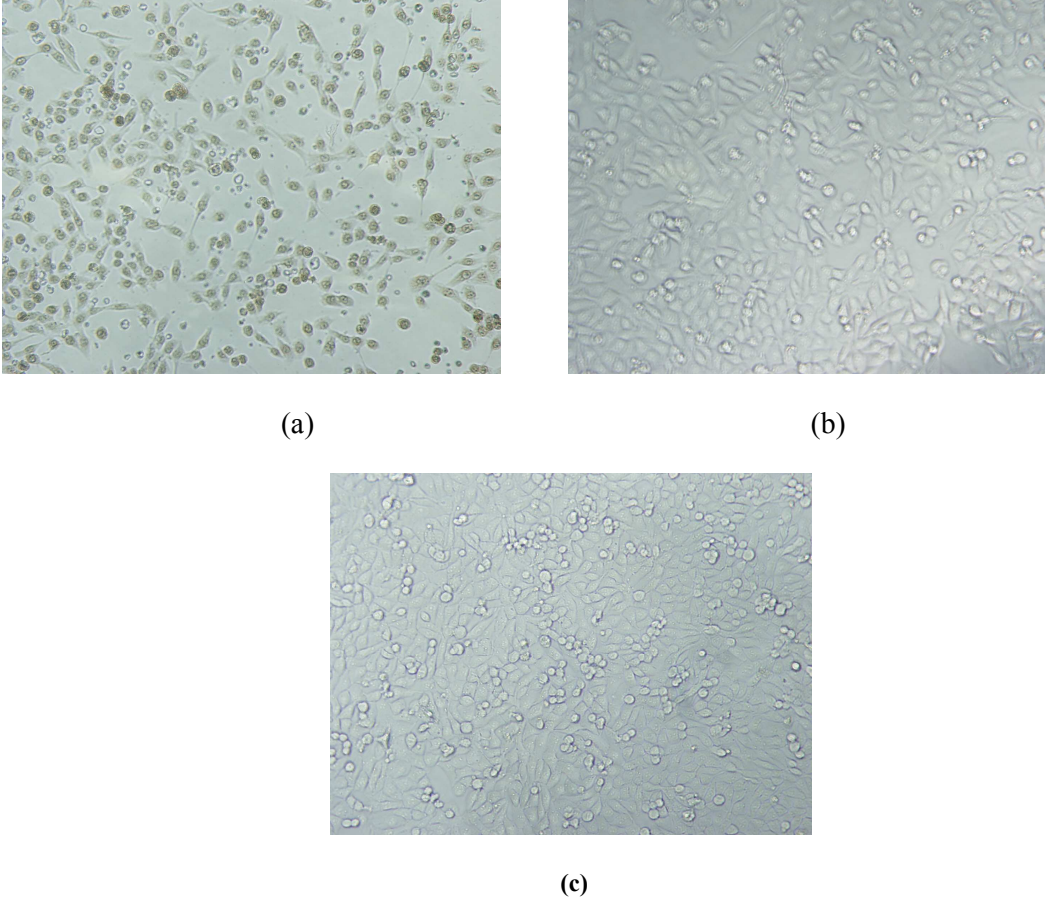
#### 4.6.8 VP/AA-Peptid Biyokonjugatın MCF 7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Mikroplağın (96) kuyularına ekilen MCF 7 hücrelerinin 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyonu sonucunda morfolojik durumları ters mikroskopta incelendi. İnceleme sonucunda hücrelerin kuyucuk yüzeylerini eşit miktarda kapladıkları tespit edilirken, hücreler genel sahip oldukları morfolojik görünümde ve kuyucuğun yüzeyinde yüzen ölü hücre yoktur.

Yapılan bu mikroplak kültür deneyinde VP/AA-Peptid Biyokonjugatın değişik konsantrasyonlarının (3.2 mg/mL, 2 mg/mL, 1.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

##### 4.6.8.1 Morfolojik İnceleme

VP/AA-peptid biyokonjugatının MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücrelerin durumu mikroskobik olarak incelendi.



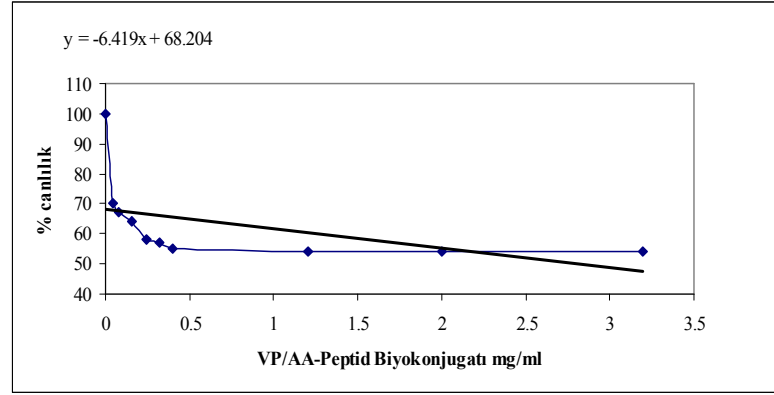
Şekil 4.70 VP/AA-Peptid biyokonjugatının 24 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x); (a) 3,2 mg/mL (b) 0.04 mg/mL (c) Kontrol

#### 4.6.9 VP/AA-Peptid Biyokonjugatının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

MTT solüsyonunu şekil 4.70'de morfolojileri incelenen bu kuyucuklara eklendikten 24 saat sonra hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi.

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

Çizelge 4.5 MCF 7 Hücrelerinin VP/AA-Peptid biyokonjugatının konsantrasyona bağlı % canlılık eğrisi



#### 4.7 Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimerinin, A<sub>22</sub> Serotip Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan VP1 Yapısal Kapsid Proteininin Peptid Epitopları ile Kovalent Bağlanmaları Sonucu İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Polimer-Peptid Biyokonjugatlarının Sentezi

##### 4.7.1 Hesaplamalar

VP/AA kopolimeri  $\Rightarrow M_{VP/AA} = 80\,000$  Da

135-161 için  $\Rightarrow M_{pep} = 2975$

$$\frac{n_{peptid}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{peptid} \cdot M_{VP/AA}}{c_{VP/AA} \cdot M_{peptid}} = 2, 4, 5, 9, 15$$

Peptid çözeltideki konsantrasyonu %0.25 dir.

- 1)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 2$  olan 0.2 mL VP/AA-Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 3.35\text{g}/100\text{mL} = 33.5$  mg/mL
- 2)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 4$  olan 0.2 mL VP/AA-Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 1.68$  g/100mL = 116.8 mg/mL
- 3)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 5$  olan 0.2 mL VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 1.475$  g/100mL = 14.75 mg/mL
- 4)  $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 9$  olan 0.2 mL VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi  
 $c_{VP/AA} = 1.01$  g/100mL = 10.1 mg/mL

5)  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 15$  olan 0.2 mL VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{\text{VP/AA}} = 0.477 \text{ g/100mL} = 4.77 \text{ mg/mL}$$

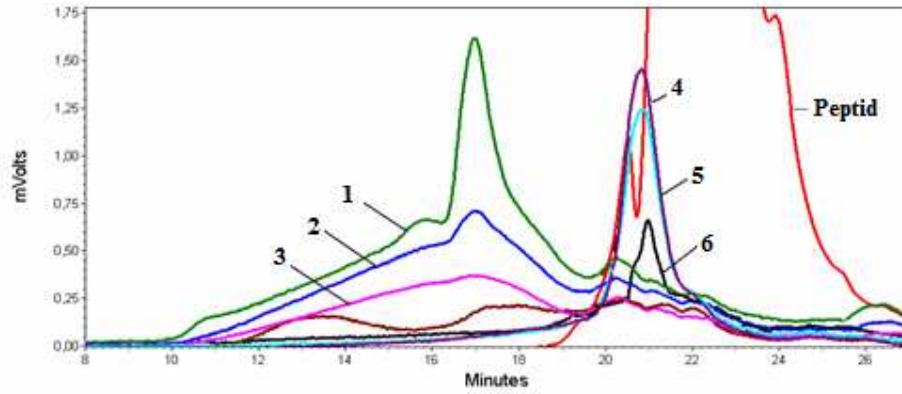
Antijenik özelliklerini test etmek amacıyla balb/c farelere enjekte edilmek üzere VP/AA-Peptid biyokonjugatları ve fiziksel kompleksleri sentezlendi. VP/AA Kopolimeri (25/75; Mw=80.000) ile A<sub>22</sub> serotip Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan VP1 yapısal kapsid proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugatlar ve fiziksel karışımlar iki farklı yöntemle ve bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında sentezlendi.

- a) Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidralklorür (EDC) aktivatörü varlığında yöntem 2'ye göre, bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5; 9; 15$  oranlarında ve 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içerecek şekilde VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Bu biyokonjugatların sentezinde –N terminal ucunda triptofan amino asidi içeren Sigma GENOSYS tarafından sentezlenen Şap Hastağı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisi kullanıldı. Sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar 10.000 Mw ayırma gücüne sahip polietersülfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 °C'de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Safsızlıklarından arındırılan farelere enjeksiyonları yapılacak olan fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar liyafilizatör aletinde -80 °C'de kurutuldu. Toz haline getirilen fiziksel kompleks ve biyokonjugat numuneleri 0.154 M NaCl çözeltisi içerisinde çözüldü ve farelere enjeksiyon için hazır duruma getirildi.
- b) Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}= 2; 4$  oranlarında 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastağı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 peptid dizisini içerecek şekilde VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Bu biyokonjugatların sentezinde kullanılan Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 peptid Biyomühendislik Bölümünün peptid sentez laboratuvarında Liberty Peptid Sentez Cihazında (CEM) sentezlendi. Sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları 10.000 Mw ayırma gücüne sahip polietersülfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 °C'de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Safsızlıklarından arındırılan biyokonjugatlar liyafilizatör

aletinde -80 °C’de kurutuldu. Toz haline getirilen biyokonjugatlar 0.154 M NaCl çözeltisi içerisinde çözüldü ve farelere enjeksiyon için hazır duruma getirildi.

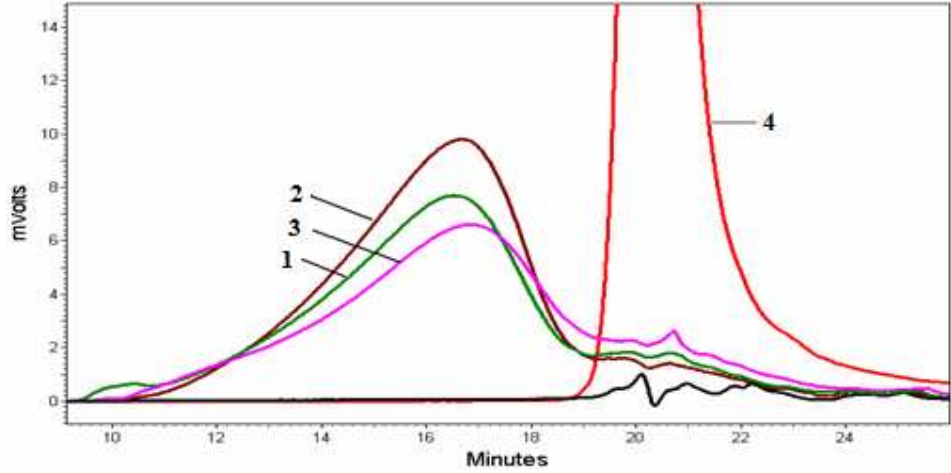
#### 4.7.2 Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimerinin, A<sub>22</sub> Serotip Şap Hastalığı Virüsünün Fonksiyonel Antijen Özelliği Taşıyan VP1 Yapısal Kapsid Proteininin Peptid Epitopları ile Kovalent Bağlanmaları Sonucu İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait HPLC Cihazı Analiz Sonuçları

- a) EDC aktivatörü varlığında yöntem 2’ye göre bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5; 9; 15$  oranlarında ve 0.5mg/0.2mL Şap Hastağı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içerecek şekilde hazırlanan VP/AA-Peptid fiziksel kompleks ve sentezlenen biyokonjugatları saflaştırıldı. Saflaştırılan fiziksel karışım ve biyokonjugatlar farelere enjekte edilmeden önce HPLC cihazında kromatografik analizleri yapıldı.



Şekil 4.71 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ), **(4)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ ), **(5)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ ), **(6)** VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleks ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ ), **(7)** % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizilimli Peptidi, ait HPLC Kromatogramı

- b) Yeni bir metod olan mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2, 4$  oranlarında 0.5 mg/0.2 mL’de Şap Hastağı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içerecek şekilde VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan fiziksel karışım ve biyokonjugatlar farelere enjekte edilmeden önce HPLC cihazında kromatografik analizleri yapıldı.



Şekil 4.72 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış **(1)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$ ), **(2)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), **(3)** VP/AA-Peptid Biyokonjugatı (VP/AA 50/50;  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$ ), **(4)** % 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisine ait HPLC Kromotogramı

#### 4.8 Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Balb/c farelere enjekte edilmesi

Çalışmamızda TÜBİTAK, Marmara Arastırma Merkezi, Gen Mühendisligi ve Biyoteknoloji Arastırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları laboratuvarında temin edilen 90 adet 8 haftalık ortalama 31 gr ağırlığında erkek Balb/c soyu fare kullanıldı.



Şekil 4.73 Balb/c fare

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatların (aşı) enjekte edildiği gruptaki deney hayvanları her bir grupta 5 tane olmak üzere 11 gruba ayrıldı (Çizelge 4.6).

Mikrodalga yöntemi kullanılarak organik ortamda sentezlenen biyokonjugatların (aşı) enjekte edildiği gruptaki deney hayvanları her birinde 4 tane olmak üzere 7 gruba ayrıldı (Çizelge 4.7).

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



Şekil 4.74 Kuyruk veninden madde enjeksiyonu

Çizelge 4.6 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği soyu türü fare grupları ve enjekte edilen örneklerinin içeriği

Grupun Adı	Enjekte Edilen Örneklerin İçeriği	Gruptaki Balb/c Fare Sayısı
GRUP 1	0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisi	5
GRUP 2	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ oranında sentezlenen 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel kompleks	5
GRUP 3	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel kompleks	5
GRUP4	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren fiziksel kompleks	5
GRUP 5	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	5
GRUP 6	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	5
GRUP 7	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ oranında sentezlenen 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	5
GRUP8	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	5
GRUP 9	0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisi ve Freund Adjuvat Karışımı	5
GRUP 10	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=15$ oranında sentezlenen 0.25mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	5
GRUP 11 (Kontrol)	0.2 mL 0.154 M NaCl	5

Çizelge 4.7 Mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c soyu fare grupları ve enjekte edilen örneklerinin içeriği

GRUPUN ADI	ENJEKTE EDİLEN MALZEME İÇERİĞİ	Gruptaki Balb/c Fare Sayısı
GRUP A	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	4
GRUP B	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 4$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	4
GRUP C	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 4$ oranında sentezlenen 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren $\text{Cu}^{+2}$ içeren VP/AA-Peptid biyokonjugatı	4
GRUP D	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 4$ oranında sentezlenen VP/AA (50/50; Mw 80.000) Kopolimeri ve 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	4
GRUP E	% 0.1 VP/AA (25/75; Mw 80.000) Kopolimeri ve 0.5mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 peptid dizisini içeren biyokonjugat	4
GRUP F	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 4$ oranında sentezlenen VP/AA (50/50; Mw=80.000) Kopolimeri ve 0.2mg/0.2mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizisine ait peptid dizisini içeren biyokonjugat	4
GRUP G (Kontrol)	0.2 mL 0.154 M NaCl	4

#### 4.9 Fare Serumlarının alınması

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

#### **4.10 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara karşı oluşan Antikor Miktar Tayini**

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

##### **4.10.1 Kullanılan Çözeltiler**

###### **❖ Sodyum Sitrat Çözeltisi**

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

###### **❖ 0.5 M PBS Tamponu (pH=7,2)**

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

###### **❖ Yıkama Tamponu**

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

###### **❖ Substrat Tamponu**

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

200 mL olacak şekilde hacim tamamlanır.

❖ **%0.2 Süt Tozu Çözeltisi**

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

❖ **Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu**

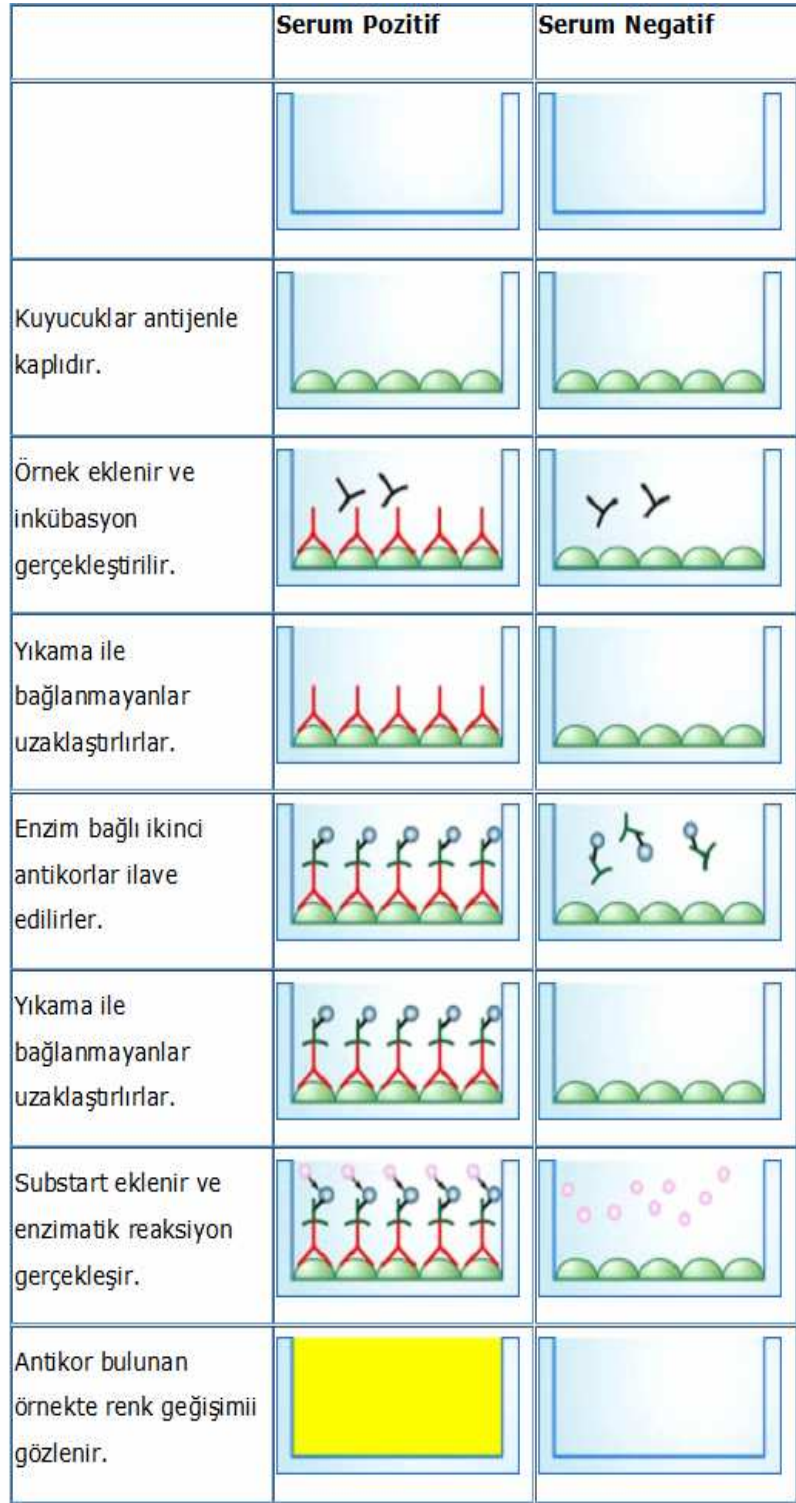
0.5 M 750 µL PBS (pH 7) çözeltisi üzerine 1 µL Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz eklenir ve vorteksle karıştırılır.

❖ **4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması**

4-nitrofenil fosfattan ( $C_6H_5NO_2 \cdot P_2O_6$ ; Mw 461.4 g/mol) 2,5 mg alınıp 25 mL substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

#### 4.10.2 ELISA Deneyinin Yapılışı

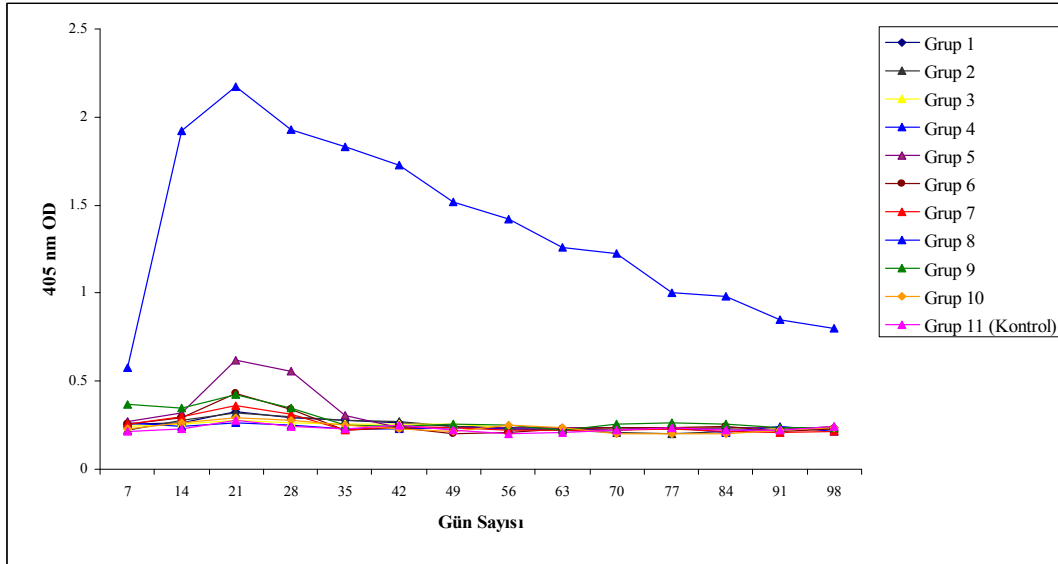
- 96 kuyu içeren ELISA plağı (Greiner) 0.5 µg antijen ( $n_{peptid}/n_{BSA}=5$  oranında sentezlenen 0.5 mg Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Dizisine ait peptid dizisi içeren BSA-Peptid biyokonjugatı) 100 µL kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELISA plakaları gece boyu +4 °C'de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



Şekil 4.75 Indirek ELISA'nın şematik gösterimi [17]

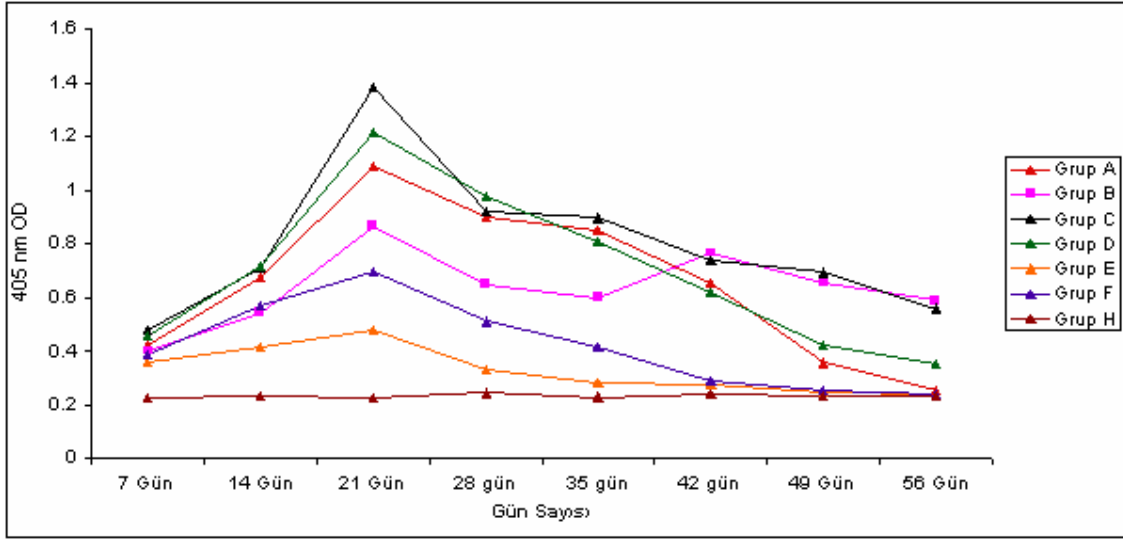
#### 4.11 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayine Ait Sonuçlar

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında yöntem 2'ye göre  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5; 9; 15$  oranlarında ve 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içerecek şekilde VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri hazırlandı ve VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Hazırlanan fiziksel kompleks ve sentezlenen biyokonjugatlar saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intravenöz olarak enjekte edildi. 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubuna serumu ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.76 Yöntem 2'ye göre  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5; 9; 15$  oranlarında ve 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini içeren fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar ile immunize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) VP/AA-Peptid'e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği

Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2; 4$  oranlarında 0.5 mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 dizisini içerecek şekilde VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Sentezlenen biyokonjugatlar saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intravenöz olarak enjekte edildi. 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubuna serumu ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.77 Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2; 4$  oranlarında ve 0.5mg/0.2 mL Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 dizisini içeren biyokonjugatlar ile immünize edilmiş farelerde (1:50 dilüsyonlu serum örnekleri) VP/AA-Peptid'e karşı spesifik olarak oluşan antikor kinetiği.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Başlıca 10 ana grup altında bulgularımızı sunduğumuz bu çok kapsamlı tez çalışmamızda, tartışmamızı yazarken tekrarlardan kaçınmak amacıyla şu sırayı takip ettik. Şap Hastalığı Virüsü ve lineer yapılı polielektrolitlerle neden çalıştığımızı belirttikten sonra sırası ile farklı metotlarla sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının reaksiyon verimlerini kromatografik ve florimetrik analizlerle karşılaştırdık, bu VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının MCF-7 kanser hücre canlılığı üzerine etkisini inceledik, antijenik özelliklerini yani immün sistem üzerine olan etkisini belirttiğimiz sonuçlarımızı literatürde mevcut son yıllarda yapılmış çalışmaların sonuçları ile karşılaştırdık ve irdeledik.

Sentetik peptid aşılı ile yapılan araştırmalarının çoğu Şap Hastalığı Virüsü (Beignon vd., 2005; Villen vd., 2004; Li vd., 2004; Fischer 2003; Wang vd., 2001; Nargi vd., 1999), Hepatit B, Grip Virüsü (Ben-Yedidia, 1998), Polio Virüs ve İnsan İmmün Yetersizliği virüsü (HIV) (Gottfried vd., 1995; Sarin vd., 1995) gibi antiviral hastalıklar konusunda yapılmıştır. Difteri ve kolera toksinlerinin (Audibert vd., 1981, Jacobs vd., 1983) yanı sıra Malaria'dan korunmak için antiparazitik immünojenler (Richman vd., 1989) gibi antibakteriyel peptid aşılı da önem verilen araştırmalar arasında yer almaktadır.

Ülkemizde, hem hayvansal üretimi etkileyen ve hem de ticari potansiyeli yok eden, 2003 yılında ülke genelinde tespit edilen ihbarı mecburi hastalıklar incelendiğinde; şap hastalığının ülkenin her tarafında yaygın olarak seyrettiği Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığının 9. Kalkınma planında (2007-2013) beyan edilmektedir. Ayrıca, hastalık bildirimlerinin Doğu ve Güneydoğu bölgelerinde gerçeği yansıtmadığı konusuna da dikkati çekmektedirler. Türkiye'de her yıl hazırlanan programlar çerçevesinde; Şap, Sığır Vebası, Koyun-Keçi Vebası, Sığır-Koyun Brusellozu, Şarbon, Kuduz, Mavidil, tek tırnaklı hayvanlarda Ruam gibi hastalıklarla mücadele çalışmaları yanında hastalık taramaları da yapılmaktadır. Programlı veya stratejik aşılama, kordon ve karantina, test uygulaması, dezenfeksiyon, kesim veya imha, hayvan hareketlerinin kontrolü hayvan hastalıklarında uygulanan kontrol programlarının temelini teşkil etmektedir. Şap hastalığına karşı ülkesel düzeyde kontrol programı uygulanmakta olup yoğun aşılama çalışması sürdürülmektedir [18].

Şap Hastalığı, süt ve et veriminde kayıplara, gebe hayvanlarda yavru düşmesine, özellikle genç hayvanlarda görülen yüksek oranda ölümlere, dış ticarete getirilen kısıtlamalardan doğan ekonomik kayıplara ve tedavi masraflarında yüksek maliyete neden olduğundan, ekonomiye ve ticarete büyük zarar vermektedir [9]. Ülkemizde yaşadığı büyük problemlerden biri olan

Şap Hastalığının Virüsünden korunmak, ancak aşılama ile sağlandığından ve bu hastalığa karşı ucuz ve basit bir teknoloji ile sentezlenen daha etkin, daha az riskli ve daha kararlı yapıda olan sentetik bazlı peptid aşuların sentezlenmesi tüm sağlık sektörüne ve ekonomisine büyük katkı sağlayacağından bu tez çalışmasında bu hastalık seçildi.

Zayıf immünojenik özellikteki sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidler, proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilik asid (PAA), PoliN-isopropilakrilamid (NIPAA), Poli-N-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilik asid (VP/AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar (Kabanov 2004; Gürhan vd., 2002; Dilgimen vd., 2001; Mustafaev, 1996b). Bu polimerler canlı organizmada çok uzun süre yüksek düzeyde antijene özgün immünite sağladığından çalışmamızda kullanılan peptid molekülleri vinil prilidon-akrilik asid kopolimerine bağlanmıştır.

### **5.1 Sentetik Polianyon Özellikteki VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma**

3 farklı metot ile sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının karşılaştırmalı olarak yapıları araştırılarak karakterize edildi. pH 7 değerinde VP/AA kopolimerinin negatif yüklü karboksil gruplarının peptid moleküllerindeki amino grupları ile bağlanması ve amid bağı oluşturması sonucunda oluşan biyokonjugatın konjugasyon reaksiyon verimi karşılaştırmalı olarak incelendi.

#### **5.1.1 Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde (Hydrated Reversed Micelle System) Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma**

Polimer-peptid, protein-protein, protein-peptid kovalent konjugasyon reaksiyonlarında geleneksel metodlar kullanıldığında karşılaşılan çeşitli problemlerden ve sınırlamalardan dolayı farklı sistemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi de; suyun, organik çözeltilerde yüzey aktif maddelerle kararlaştırılmış mikroemülsiyonlarında yani hidratlanmış dengeli misel sistemlerinde (hydrated reversed micelle systems-HRM) konjugasyonun gerçekleştirilmesidir (Volkov vd 2003; Valdez vd., 1993; Armando vd., 1992; Kumar vd., 1992).

AOT oktan karışımın oluşturduğu Hidratlanmış Dengeli Misel Sistemlerinde; suyun hidrasyon derecesine bağlı misel çapının değişimi Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Ayrıca, AOT misel sistemi içerisinde gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonunun her basmağında partiküllerin boyut ölçümleri yapılmış ve çaplarındaki değişimler Şekil 4.19’da verilmiştir. Hidrodinamik boyut (nm), çözeltinin hem hacmi hem de ışık şiddeti göz önünde bulundurularak iki farklı şekilde zetasizer aleti tarafından hesaplanmıştır. Işık şiddetine ait hesaplamaya bağlı AOT miselinin partikül boyutu 3.80 nm iken; peptid molekülü içeren AOT misel karışımındaki partikül boyutu 11.7 nm, VP/AA kopolimeri içeren AOT misel karışımında partikül boyutu 15.7 nm’dir. Misel partikülünün boyutundaki artış hidrofilik özellikli peptid ve VP/AA kopolimerinin misel partikülünün içerisine alındığını göstermektedir. VP/AA kopolimerini ve peptid molekülünü içeren misel karışımları birbirleri ile hızla bir şekilde karıştırıldıklarında misel çapı 12.8 nm olmaktadır. VP/AA kopolimeri ve peptid molekülünü bir arada içeren misel partikül boyutu, tek başına VP/AA kopolimeri ve peptid molekülü içeren misel partikül boyutlarından farklı olarak ara bir değere sahiptir.

HRM sistemlerinin sağladığı avantajlar göz önünde bulundurularak misel sistemlerinde VP/AA-Peptid konjugasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Fakat AOT misel sistemlerinde hidrofilik özellikli peptid moleküllerini içeren VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının sentezini gerçekleştirmeye imkan sağlarken; hidrofobik yapıli peptid dizilerinin suda çözünen polielektrolitlerle olan konjugasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde meydana gelen zorluklar ve reaksiyon veriminin istenilen düzeyde olmamasından dolayı çalışmamızda klasik metodlara dayalı konjugasyon reaksiyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

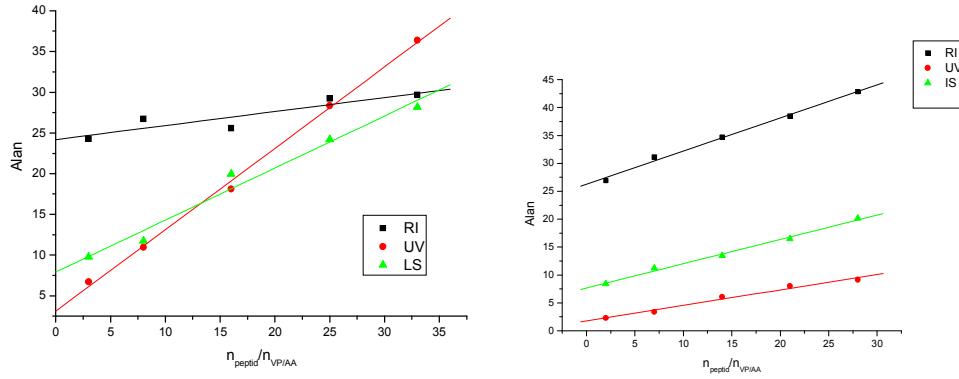
### **5.1.2 Suda Çözünen 1-etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid Hidraktorür (EDC) Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlara Ait Tartışma**

Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidraktorür (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında sentetik polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren ve bileşenlerin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlenmiştir. Bu biyokonjugatların sentezi iki farklı yöntemle yapılmıştır. Yöntem 1’de pH 5’de kopolimerin karboksil grupları aktive edilmiş ve sonra peptid molekülü ile karıştırılarak konjugatlar sentezlenmiştir. Yöntem 2’de ise; pH 5’de kopolimer ve peptid molekülleri birbirleri ile karıştırılarak fiziksel kompleks oluşumu sağlanmış ve sonrasında ortama EDC çapraz bağlayıcısı ilave edilerek karboksil

gruplarının aktivasyonu üzerinden konjugat sentezi yapılmıştır. EDC çapraz bağlayıcısı varlığında her iki yöntemle sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatların konjugasyon reaksiyon verimi kromatografik analizlere dayalı olarak karşılaştırılmıştır. VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında pH 7'de hazırlanan VP/AA-Peptid fiziksel komplekslerin ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) viskotek cihazına ait kromatogramları Şekil 4.24'de (170-188 peptid dizisi) gösterilmektedir. Kırılma indisine ait kromatogramda tek pik görülmekte ve bu pik VP/AA kopolimer piki ile aynı karakteristik özellik taşımaktadır. UV kromatogramında ise sadece peptide ait pik görülmekte (polimer UV özellik göstermemektedir) ve fiziksel karışımdaki peptid konsantrasyonunun artışına bağlı bu pikin alanı lineer olarak artmaktadır. Işık saçılması kromatogramında ise tek pik görülmekte ve bu pik VP/AA kopolimer piki ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. Tüm kromatogramlarda net bir şekilde fiziksel kompleks oluşmadığı gözlenmekte ve kromatogramlar serbest VP/AA kopolimeri ile serbest peptid'in karakteristik özelliklerini bir arada taşımaktadır.

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1'e göre VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren ve bu bileşenlerin farklı oranlarında pH 7'de sentezlenmiş biyokonjugatlar kromatografik (Şekil 4.25; 4.26; 4.31; 4.32) ve florimetrik (Şekil 4.27) yöntemlerle incelenmiştir. Şekil 4.25'te VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatlarının; VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) Viskotek kırılma indisi kromatogramı, kopolimer ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. UV detektöründen elde edilen kromatogramda normalde pik görülmeyen alanda peptidin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artan bir pik görülmekte [Şekil 4.25(b)] ve bu pik de konjugatın sentezlendiğini ve orana bağlı olarak konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Işık saçılması detektörüne ait kromatogramlarda ise VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının alıkonma zamanında (RT) görülen kayma ve pik alanlarında ki büyüme molekül ağırlığının arttığını göstermektedir. VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının konsantrasyonu peptid konsantrasyonu ile orantılı olarak artış göstermektedir. Şekil 4.31'de gösterilen şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 135-161 dizisini (-N terminal ucunda trp amino asidi taşımayan) içeren VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının, 170-188 peptid dizisi içeren biyokonjugatlarla aynı karakteristik özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Şekil 5.1'de Viskotek cihazının farklı detektörlerinden elde edilen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait pik alanlarının  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranına bağlı olarak değişimi gösterilmiştir ve Viskotek cihazının UV dedektörünün alan

grafisindeki sonuçlar HPLC analiz sonuçları ile örtüşmektedir. Şekil 5.1(a)'da VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatının, Şekil 5.1(b)'de VP/AA-Peptid (-N terminal ucunda trp taşımayan 135-161 peptid dizisi) biyokonjugatının artan  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarına bağlı olarak Viskotek cihazının farklı detektörlerinden elde edilen sonuçlar gösterilmiştir [Kırılma İndisi (RI), Ultra Viyole (UV) ve Işık Saçılması (IŞ) detektörleri].



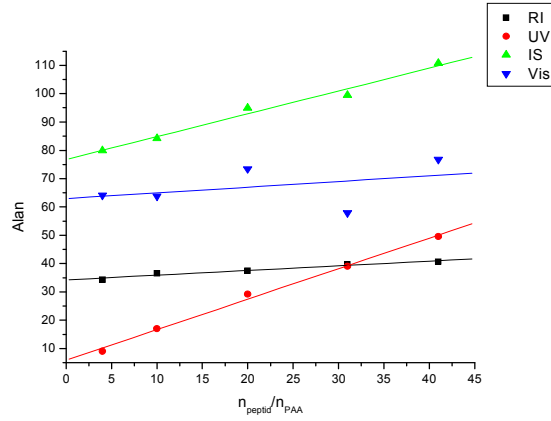
Şekil 5.1 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1'e göre bileşenlerinin farklı  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarında sentezlenen VP/AA kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellik taşıyan VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisini içeren biyokonjugat (a) ve 131-165 peptid dizisini içeren biyokonjugatlara (b) ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği

Şekil 4.27'da kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) bağlı olarak pH 7'de sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında floresans şiddetinin ( $I_{\text{max}}$ ) peptid konsantrasyonuna bağlılığı verilmiştir. Triptofan (Trp) amino asidine ait emisyon maksimumu ( $\lambda_{\text{maksimum}}$ ) ve kuantum verimi gibi floresans parametrelerindeki değişiklikler, yapıdaki Trp aminoasidinin konformasyonundaki değişiklikler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Sentezlenirken peptidin -N terminal ucuna trp amino asidinin eklenmesi ile peptid molekülüne floresans özellik kazandırılarak VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapısal özellikleri hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. 170-188 peptid dizisinin 352 nm'deki maksimum dalga boyu, VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında artan peptid oranına bağlı 346 nm dalga boyuna kaymaktadır. Böylece, biyokonjugatlardan alınan piklerde mavi bölgeye kaymalar (blue shift) gözlenmiştir. Buradan, VP/AA kopolimeri ile peptidin giderek daha sıkı bağlanması sonucunda peptidin triptofanının sulu çözeltilerden uzaklaştığı ve kopolimer ile sarıldığı anlaşılmaktadır. Trp amino asidi içermeyen 135-161 peptid dizisi ile sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapısı (Trp amino asidi dizide olmadığından ve floresans özellik göstermediğinden) florimetrik olarak incelenememiştir.

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1'e göre; VP/AA kopolimerine (25/75; 80.000) oranla daha fazla sayıda karboksil grubu içeren PAA (Mw100 000) polimeri ile şap hastalığı virüsünün fonksiyonel antijenik özellikli VP1 kapsid proteininin 170-188 peptid dizisini içeren biyokonjugatlar pH 7'de sentezlenerek, yapı ve karakterizasyonu kromatografik (Şekil 4.34; 4.35) ve florimetrik (Şekil 4.36) yöntemlerle incelendi.

PAA polimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) pH 7'de hazırlanan fiziksel komplekslerin viskotek cihazına ait kromatogramları Şekil 4.33'de gösterilmektedir. Viskotek cihazının kırılma indisine ait kromatogramda tek pik görülmekte ve PAA polimer piki ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. UV kromatogramında ise 2 pik görülmektedir (polimer UV özellik göstermemektedir). PAA polimerinin çıktığı zaman aralığında fiziksel komplekse ait küçük bir pik ve peptidin çıktığı zaman aralığında da peptide ait ikinci bir pik görülmektedir. İkinci pik, fiziksel karışımdaki peptid konsantrasyonunun artışına bağlı lineer olarak artmaktadır. Işık saçılması kromatogramında ise tek pik görülmekte ve bu pik PAA polimer piki ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. Elde edilen kromatogramlardan fiziksel kompleksin çok az da olsa oluştuğu gözlenmekte ve serbest PAA polimeri ile serbest peptidin karakteristik özelliklerini bir arada taşımaktadır.

Şekil 4.34'de EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1'e göre sentezlenen PAA-Peptid biyokonjugatlarının; PAA polimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ ) viskotek kromatogramları gösterilmektedir. Viskotek cihazının kırılma indisi kromatogramı PAA polimeri ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. UV detektöründe elde edilen kromatogramda normalde pik görülmeyen alanda peptidin artan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı görülen pik [şekil 4.34 (b)] konjugatın sentezlendiğini ve orana bağlı olarak konjugat konsantrasyonunun arttığını (Şekil 5.2) göstermektedir. Işık saçılması detektörüne ait kromatogramlarda ise PAA-Peptid biyokonjugatlarının alıkonma zamanı değişmemekte ve pik alanlarında görülen artma molekül ağırlığının arttığını göstermektedir.



Şekil 5.2 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 1'e göre bileşenlerinin farklı  $n_{peptid}/n_{PAA}$  oranlarında sentezlenen PAA polimeri ve Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellikli VP1 kapsid proteinininin 170-188 peptid dizisini içeren biyokonjugatlara ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği

Şekil 4.36'da kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen PAA-Peptid biyokonjugatlarının floresans şiddetinin ( $I_{max}$ ) peptid konsantrasyonuna bağlılığı verilmiştir. Serbest 170-188 peptid dizisinin 352 nm'deki maksimum dalga boyu, PAA-Peptid biyokonjugatlarında artan peptid konsantrasyonuna bağlı 347 nm dalga boyuna kaymaktadır. Maksimum dalga boyunda gözlenen maviye kaymalar, biyokonjugat oluşumu sonucu peptidin PAA zincirleri tarafından sarıldığını ve peptiddeki triptofan amino asidinin sulu ortamdan uzaklaştığını ifade etmektedir.

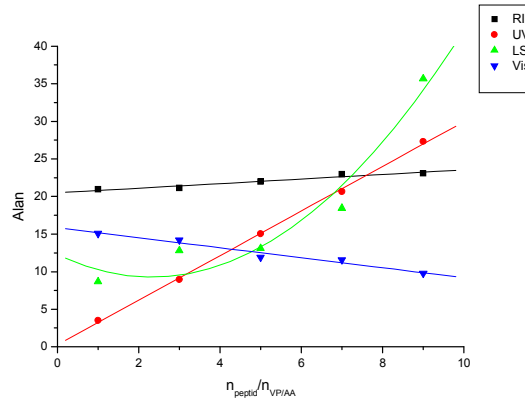
PAA polimeri ile Şap Hastağı virüsünün 170-188 peptid dizisinin, pH 5 ve pH 7 değerlerinde fiziksel kompleks ve biyokonjugatı sentezlenmiştir. HPLC kromatogramlarında (Şekil 4.38 ve 4.41) pH 7'de çok küçük bir alanla ifade edilen fiziksel kompleks oluşumu, pH 5 değerinde oldukça büyük bir alanla ifade edilmektedir. PAA-Peptid biyokonjugat reaksiyon kinetiğinde de aynı fark görülmüştür. PAA polimeri pH 7'de karboksil gruplarının iyonlaşmasından dolayı (pH 7'de iyonlaşma yüzdesi %57) negatif yüke sahiptir. Aynı şekilde pH 7 değerinde Şap Hastalığının 170-188 peptid dizisinin de net yükü negatiftir. Bu nedenle iki molekül arasında negatif yüklerin itmesi söz konusu olmakta ve bu itmeden dolayı polimer ile peptid arasında kompleks oluşumu engellenmektedir. PAA polimeri pH 5'de karboksil gruplarının daha az iyonlaşmasından dolayı (pH 5'de iyonlaşma yüzdesi %18) pH 7'ye göre daha az negatif yüke sahiptir. 170-188 peptid dizisinin izoelektrik noktası (pI) 6.17 olduğundan dolayı peptid molekülünün pH 5 değerinde net yükü pozitiftir. pH 5 değerinde pozitif yüke sahip

peptid ile negatif yüke sahip PAA polimeri arasında elektrostatik çekme kuvvetleri baskın olmakta ve PAA-peptid kompleksi oluşmakta bu kompleks de HPLC (Şekil 4.41) kromatogramlarında net bir şekilde görülmektedir.

VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri ise farklı bir yöntemle hazırlanmıştır. Yöntem 2'ye göre VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) pH 7'de hazırlanan VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) fiziksel komplekslerin viskotek cihazına ait kromatogramları Şekil 4.42'de gösterilmektedir. Viskotek cihazının kırılma indisi kromatogramında VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri 2 pikte karakterize edilmektedir. Şekil 4.42 (a)'daki birinci pik VP/AA kopolimerine karşılık gelirken, ikinci pik ise peptide karşılık gelmektedir. UV kromatogramında ise peptide ait tek bir pik görülmekte (polimer UV özellik göstermemektedir) ve VP/AA-Peptid fiziksel karışımdaki peptid konsantrasyonunun artışına bağlı bu pikin alanı lineer olarak artmaktadır. Fakat UV kromatogramında VP/AA kopolimerinin çıktığı zaman aralığında çok çok küçükte olsa OD'de artış gözlenmektedir. Işık saçılması kromatogramında ise VP/AA-Peptid fiziksel karışıma ait pikler VP/AA kopolimer piki ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. Viskozite dedektörüne ait kromatogramda ise VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri 2 pikte karakterize edilmektedir. Şekil 4.42 (d)'deki birinci pik VP/AA kopolimerine karşılık gelirken, ikinci pik peptide karşılık gelmektedir. Tüm kromatogramlarda VP/AA-Peptid fiziksel komplekslerinin alıkonma zamanları (RT) değişmemekte ve serbest VP/AA kopolimeri ile serbest peptidin karakteristik özelliklerini bir arada taşımaktadır. Viskotek cihazı kromatogramları; Yöntem 2'ye göre hazırlanan VP/AA-Peptid fiziksel karışımlarında kompleks oluşumunun düşük düzeyde de olsa gerçekleşmiş olduğu göstermektedir.

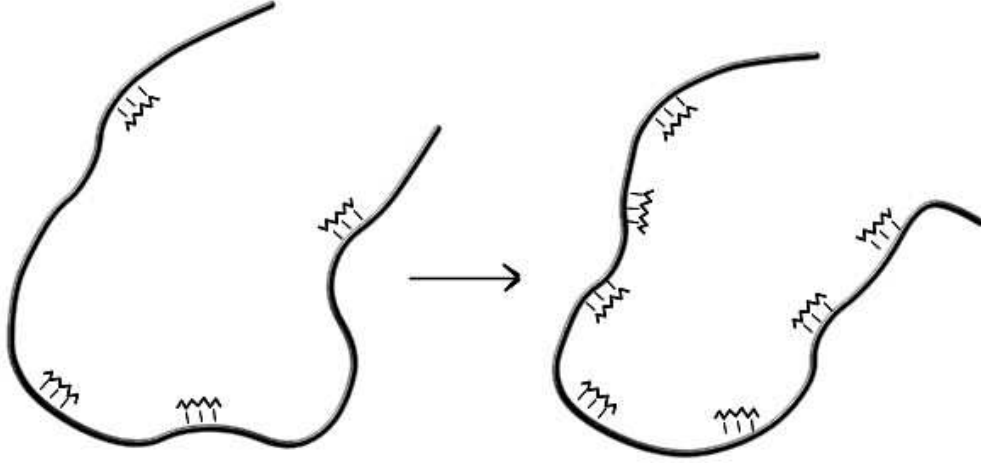
VP/AA-Peptid biyokonjugatları EDC varlığında Yöntem 2 olarak adlandırılan farklı bir yöntemle sentezlenmiştir. Yöntem 2'ye göre VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijenik özellikli VP1 kapsid proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren ve bu bileşenlerin farklı oranlarında pH 7'de sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyonu kromatografik (Şekil 4.43 ve 4.44) ve florimetrik (Şekil 4.45) yöntemlerle incelenmiştir. Şekil 4.43'de VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (135-161peptid dizisi) biyokonjugatlarının Viskotek kırılma indisi kromatogramı tek pikte karakterize edilmektedir. Şekil 5.3'de gösterilen RI'e ait pik alanındaki artış VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının konsantrasyon artışını ifade etmektedir. Şekil 4.43(b)'de UV kromatogramında kopolimerin çıktığı zaman aralığında görülen tek pik VP/AA-Peptid biyokonjugatını ifade etmektedir.

(VP/AA kopolimeri UV özelliği taşımamaktadır) Şekil 5.3’de gösterilen UV kromatogramına ait pik alan grafiğindeki artış VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının içerdiği peptid konsantrasyonu ile paraleldir. Bu biyokonjugatların ışık saçılması kromatogramı da [şekil 4.43(c)] tek bir pik ile karakterize edilmektedir. Şekil 5.3’de IS kromatogramında diğer kromatogramlarla aynı şekilde pik alanında artış görülmektedir. Viskozite dedektöründen elde edilen kromatogramda ise tek bir pik bulunmaktadır. Bileşenlerinin farklı oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının viskozitesi  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranına bağlı olarak farklılık göstermektedir.



Şekil 5.3 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2’ye göre VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (135-161) Biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının Kırılma İndisi (RI), UV, Işık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) dedektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği

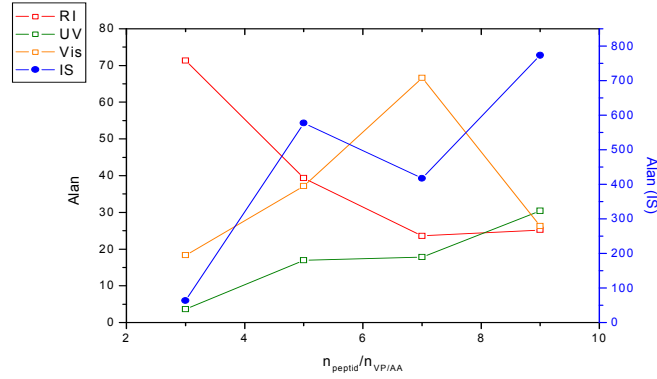
Yukarıda Kromatografik olarak yapı analizi gerçekleştirilen ve bileşenlerinin farklı oranlarında pH 7’de sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının floresans siddetinin ( $I_{\text{max}}$ ) peptid konsantrasyonuna bağlı değişimi verilmiştir (Şekil 4.45). Serbest 135-161 peptid dizisinin 353 nm’deki maksimum dalga boyu VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında peptid konsantrasyonunun artan oranına bağlı olarak 349 nm dalga boyuna kaymaktadır. Bu maviye kaymalar, VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının oluşumu sonucu peptidin VP/AA zincirleri tarafından sarıldığını ve peptiddeki triptofan amino asidinin sulu ortamdan uzaklaştığını ifade etmektedir. Hidrofilik özellikli 135-161 peptid dizisinin çapraz bağlayıcı varlığında VP/AA kopolimerine kooperatif bağlanması sırasında, polimerin sabit peptidin değişken olduğu,  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranlarındaki artışa bağlı olarak biyokonjugatın konformasyonunda değişimler söz konusu olmaktadır ve bu yapı değişimi aşağıdaki tarafımızdan aşağıdaki şekilde şematize edilmektedir.



Şekil 5.4 Hidrofilik özellikteki 135-161 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının peptid oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi

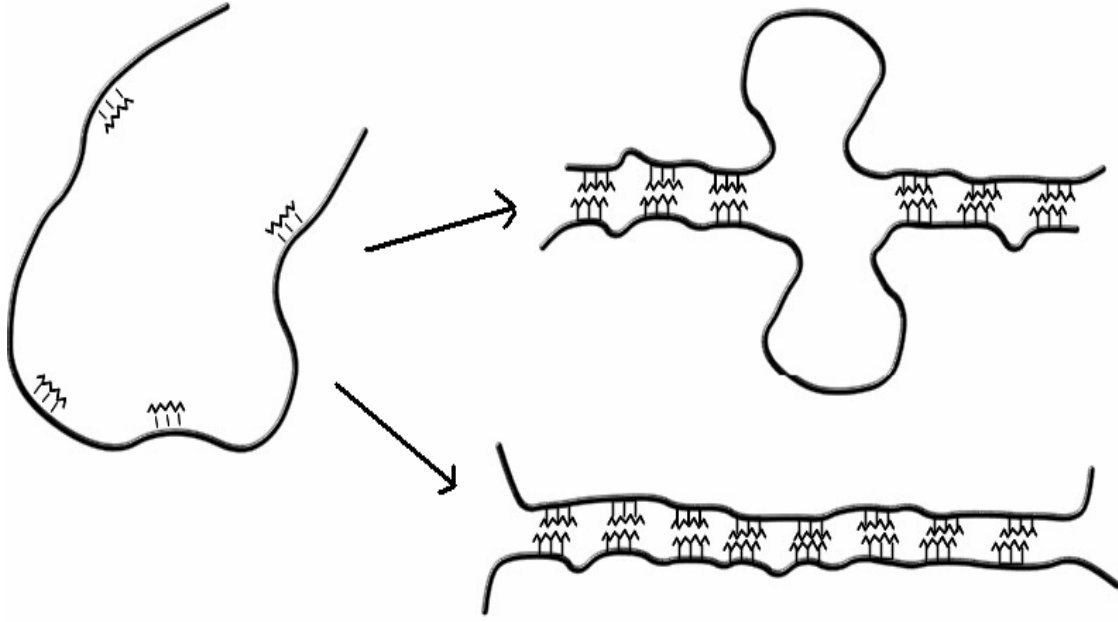
VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının yapı ve karakterizasyonun daha iyi açıklanması amacıyla EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) olarak pH 7'de VP/AA-Peptid (135-161 peptid dizisi) biyokonjugatları sentezlendi. Bu VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait viskotek cihazının kırılma indisi detektöründen alınan kromatogram tek bir pik ile karakterize edilmektedir.  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranının 3, 5 ve 7 olduğu durumda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait alıkonma zamanı kopolimerin alıkonma zamanı ile aynı iken,  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  oranının 9 olduğu durumda sentezlenen konjugata ait alıkonma zamanı kopolimerin alıkonma zamanına göre daha küçük değere kaymıştır. Şekil 5.5'de kırılma indisine ait kromatogramların pik alan grafikleri verilmektedir. VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında kopolimer konsantrasyonunun artan oranına bağlı pik alanındaki değişim  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  3, 5, 7 oranlarında doğru orantılı olarak azalmaktadır.  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$  oranında ise hafif bir yükselme görülmektedir. UV detektörüne ait kromatogramda ise kopolimerin çıktığı zaman aralığında konjugata ait 1 büyük pik ve peptide ait 2. küçük bir pik görülmektedir. Bu konjugatlara ait Viskotek kromatogramı alan grafiğinde  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  oranında sentezlenen biyokonjugat en küçük pik alanına,  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$  oranında sentezlenen biyokonjugat ise en büyük pik alanına sahiptir.  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=5$  ve 7 oranlarında sentezlenen biyokonjugatlar ise birbirine yakın pik alanına sahiptir ve  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  ile  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$  oranlarındaki piklerin alanlarının arasındaki bir değere sahiptir. Işık saçılması detektöründen elde edilen kromatogramın pik alanları  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3, 5$  ve 9 olan oranlarında artmakta,  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7$  olan oranında ise azalmaktadır. Viskozite detektöründen elde edilen

kromatogramda bileşenlerinin  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3,5$  ve 7 oranlarında pik alanında konsantrasyona bağlı artış görülmekte; fakat  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=9$  oranının pik alanında yapının değişmesinden dolayı azalma görülmektedir.



Şekil 5.5 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (135-161 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının kırılma İndisi (RI), UV, ışık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği

Şekil 4.48'de peptid konsantrasyonunun sabit, kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının floresans şiddetinin ( $I_{\text{max}}$ ) peptid konsantrasyonuna bağlılığı verilmiştir. VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının içerdiği peptid oranı sabit olduğundan  $I_{\text{max}}$  şiddeti tüm konjugatlarda sabittir. Serbest 135-161 peptid dizisine ait 353 nm'deki maksimum dalga boyu, kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında 335 nm dalga boyuna kaymaktadır. Bu maviye kaymalar, VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının oluşumu sonucu peptidin VP/AA zincirleri tarafından sarıldığını ve peptiddeki triptofan amino asidinin sulu ortamdan uzaklaştığını ifade etmektedir. Bu sonuçlar ışığında karışımdaki peptid oligomerlerinin polimer makromolekülüne kooperatif mekanizma ile bağlandığı bulunmuştur. Rastgele olmayan dağılımla gerçekleşen peptid-polimer kovalent konjugatları, komponentlerin oranı ile yönlendirilmekte ve daha kompakt bir yapı ile karakterize edilmektedirler. Farklı  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{Polimer}}$  oranlarında kromatografik diyagramların 2 pikle (konjugat ve serbest polimer piki) karakterize edilmesi ve konjugat ile serbest peptidin  $\lambda_{\text{max}}$  floresans değeri arasında mavi bölgeye kaymaların görülmesi bağlanma mekanizmasının kooperatif olarak gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



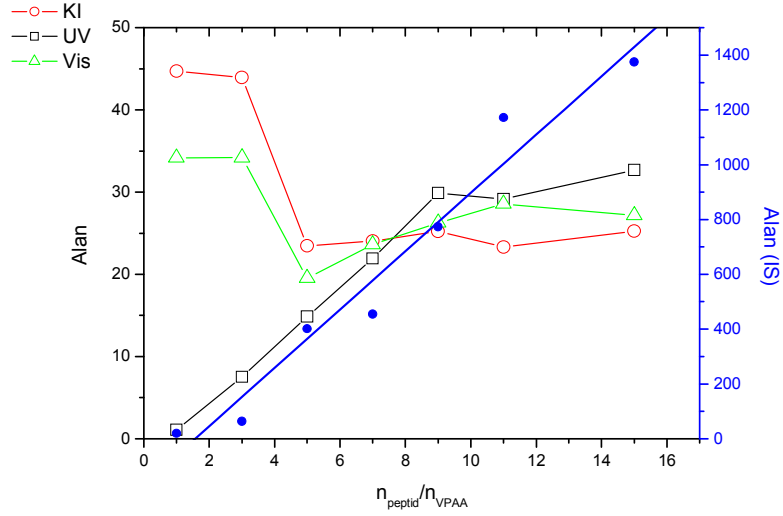
Şekil 5.6 Hidrofobik özellikteki 170-188 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının VP/AA kopolimerinin oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi

Yöntem 2'ye göre bileşenlerin oranı  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=3$  olacak şekilde sabit tutularak; pH 7'de, farklı konsantrasyonlarda (bileşenlerinin konsantrasyonları birbirinin katları olacak şekilde artırılarak), VP/AA-Peptid (135-161 peptid dizisi) fiziksel kompleksleri ve biyokonjugatları sentezlenerek yapı ve karakterizasyon değişimleri incelendi. Şekil 4.49 ve 4.50'deki Viskotek cihazı kromatogramlarından ve Şekil 4.53'deki florimetrik spektrumdan elde edilen bilgiler, konjugasyonun bileşenlerin konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığını göstermektedir.

Hidrofobik özellikli 170-188 peptid dizisi kullanılarak Yöntem 2'ye göre VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ( $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlenmiş ve biyokonjugatların yapı - karakterizasyonu peptid konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak incelenmiştir. Viskotek cihazının RI, UV, IS ve Viskozite kromatogramlarında VP/AA-Peptid biyokonjugatları tek pik ile karakterize edilmektedir (Şekil 4.54).

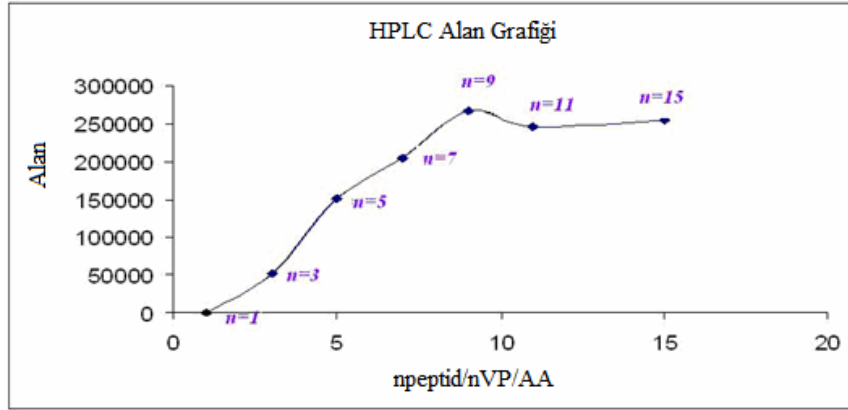
Dört detektöre bağlı kromatogramlarda kırılma indisi değerleri biyokonjugatlardaki peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı olarak değişmektedir.  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=7, 9, 11, 15$  oranlarına ait biyokonjugatlarının kırılma indisi  $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=1, 3, 5$  oranındaki konjugatların kırılma indislerine göre daha küçük değerlere sahiptir ve bu biyokonjugatların piklerinin karakteristik özellikleri de farklıdır. Bunun yanı sıra bu biyokonjugatların Viskotek cihazı UV

kromatogramları ile HPLC kromatogramları da birbirleri ile örtüşmektedir.



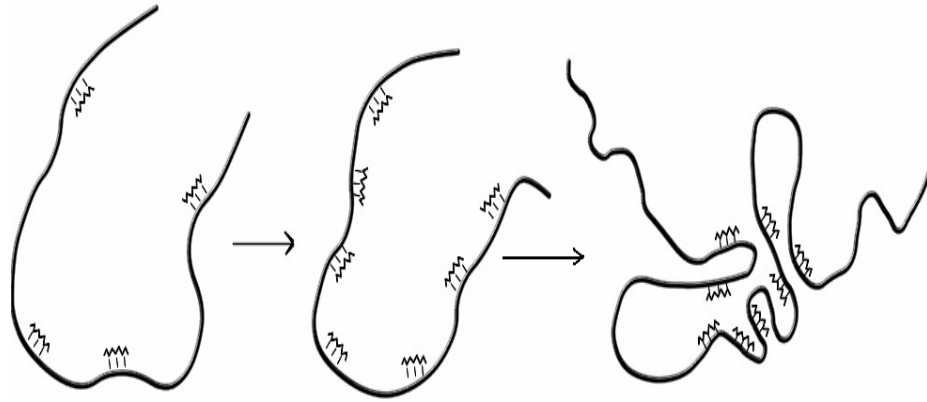
Şekil 5.7 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VPAA}}$ ) VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait Viskotek cihazının Kırılma İndisi (RI), UV, Işık saçılması (IŞ), Viskosite (Vis) detektörlerinin biyokonjugat pikine ait alan grafiği

Yukarıda kromatografik analiz sonuçları verilen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının floresans şiddetinin ( $I_{\text{max}}$ ), peptid konsantrasyonuna bağlılığı Şekil 4.56'da verilmiştir. Serbest 170-188 peptid dizisinin 352 nm'deki maksimum dalga boyu VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında artan peptid oranına bağlı olarak 334 nm dalga boyuna kaymaktadır. Polimer miktarının artmasına bağlı olarak biyokonjugatlara ait  $\lambda_{\text{max}}$  dalga boyunda önemli miktarda mavi bölgeye kayma görülmektedir.  $\lambda_{\text{max}}$ 'daki 20 nm'lik mavi bölgeye kayma peptidin N- ucundaki trp'ın sudan uzaklaştığını ve hidrofobik ortama çekildiğini göstermektedir, yani VP/AA kopolimer molekülleri ile peptid moleküllerinin bağlanması sonucu triptofan aminoasidinin daha içeride kaldığını ve bağlanma ile peptidin polimer molekülleri tarafından çevrelendiğini göstermektedir. Yapılan HPLC analizleri sonucunda VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VPAA}}$  1, 3, 5, 7, 9, 11, 15) sentezlenen biyokonjugatların alanları karşılaştırmalı olarak Şekil 5.8'de verilmiştir.



Şekil 5.8 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre peptid konsantrasyonunun sabit, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) VP/AA-Peptid (170-188 peptid dizisi) biyokonjugatlarına ait HPLC alan grafiği

Hidrofobik özellikli 170-188 peptid dizisi kullanılarak, VP/AA kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ( $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ ) sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının HPLC alan grafikleri ve diğer tüm analiz sonuçları değerlendirilerek tarafımızdan bu biyokonjugatlara ait yapı-karakterizasyon değişimi aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir.



Şekil 5.9 Hidrofobik özellikteki 170-188 peptidi ve VP/AA kopolimeri ile sentezlenen VP/AA-peptid biyokonjugatlarının peptid oranının artması ile yapısında meydana gelen değişimlerinin şematik gösterimi

HPLC alan grafiğinden de anlaşılacağı gibi VP/AA kopolimerinin sabit tutularak hazırlandığı biyokonjugatlarda, peptid miktarı arttırıldığında, bir orana kadar kopolimere her seferinde daha fazla peptidin bağlandığı ancak oranın 9 olduğu değerde kopolimerin peptide doyduğu ve daha fazla peptid bağlayamadığı bu nedenle ortama daha fazla peptid eklense bile bağlanma olmadan ortamda serbest kaldığı anlaşılmaktadır.

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Bovine Serum Albumin (BSA) ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin sentetik 135-161 peptid dizisini içeren, bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranına sahip BSA-Peptid biyokonjugatı sentezlendi. BSA-Peptid biyokonjugatların HPLC-Viskotek cihazları ile yapı karakterizasyonu tayin edildi. BSA-Peptid biyokonjugatı, immünizasyonları yapılan farelerin serumlarında VP/AA-Peptid biyokonjugatına karşı spesifik olarak oluşan antikör miktarının saptanması amacıyla ELISA plakalarının kaplanması kullanıldı. Ayrıca sentezlenen bu BSA-peptid biyokonjugatının antijenik özelliğini test etmek amacıyla balb/c farelerde immünizasyon yapıldı.

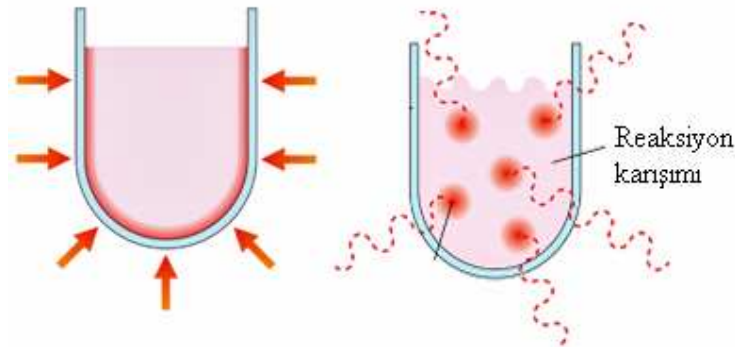
Mustafaev ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan ve düşük immünolojik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA'ya % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA\*B konjugatları 1-etil3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlemişler.

Deen ve arkadaşları (1990), düşük orandaki hidroliz özelliğinden dolayı konjugasyon reaktifi olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)'i seçtikleri konjugasyon çalışmasında, taşıyıcı protein olarak içlerinde BSA'nın da bulunduğu çeşitli moleküllerin, sentetik peptidler (SP) ile konjugatlarını sentezlemişler. N-metil imidazol (NMI)'ün kullanıldığı konjugasyon reaksiyonundan elde edilen konjugatlar ile standart EDC bağlanma reaksiyonundan elde edilen biyokonjugatlarla karşılaştırılmış ve NMI'ün bağlanma reaksiyonu ve konjugatın immünojenliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Standart bağlanma reaksiyonunda (RC=Regular Coupling) 10 mg/mL taşıyıcı protein ve 20 mg/mL sentetik peptid 0.35 M MES (2-Morpholinoetansülfonik asit) tamponunda (pH=5,0) çözünmüş ve oda sıcaklığında yine MES tamponunda çözünen EDC damla damla peptid ve BSA çözeltisi üzerine eklenmiştir. Daha sonrasında da karışım 4 °C'de bir gece konjugasyona bırakılmıştır. Geliştirilmiş bağlanma reaksiyonunda (MC=Modified Coupling) ise 0.5 M N-Metil imidazol (pH=6,0) peptid ve proteinin çözünmesinde kullanılmış, sonrasında karışıma EDC eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında reaksiyon için bekletilmiş ve konjugatın PBS'e karşı diyalizi yapılmıştır. Konjugat için protein miktarı sabit tutularak SP/Protein = 100 ve EDC/SP = 0.5-50 arasında değişen oranlarla çalışılmıştır. Çalışmalar sonucunda NMI ile oluşturulan konjugatların serbest peptidlere karşı daha spesifik immün cevaplar oluşturduğu saptanmıştır (Deen vd., 1990).

### 5.1.3 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak, Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

İlk kez 1986'da R. Gedye ve R. J. Majetich tarafından organik kimyada mikrodalga teknolojisinin kullanılmasıyla yapılan çalışmada, ısıtıcı gibi cihazlarla ısıtılarak gerçekleştirilenlere göre, reaksiyonların çok daha hızlı ilerlediği (örneğin 8 saat sürebilecek bir reaksiyonun dakikalar içinde tamamlandığı) görülmüştür. Mikrodalga yöntemi başlarda çok rağbet görmemesine rağmen, ilerleyen teknolojiyle birlikte her geçen gün daha çok kullanılan bir yöntem haline gelmektedir (Larhed, 2001; Kappe, 2004, 2006).

Normal ısıtma sistemlerinde verilen ısı ile önce ısıtıcı ısınmakta daha sonra bu enerji reaksiyon kabına aktarılmakta ve reaksiyon kabı dahil tüm sistemin sıcaklıkları eşit olana kadar ısı enerjisi reaksiyon çözeltisine aktarmakta ve ürünlerin oluşması için gerekli enerji bu şekilde karşılanmaktadır. Mikrodalga yönteminde ise, örnek doğrudan, reaksiyon kabı tarafından değil, mikrodalga ışınları tarafından ısıtılmaktadır. Bu yöntemin en önemli iki faydası; Reaksiyon karışımına daha etkin bir enerji aktarımı ve Reaksiyon kabının ortası ile kenarındaki bileşenlerin eşit miktarda enerjiye maruz kalmalarıdır.



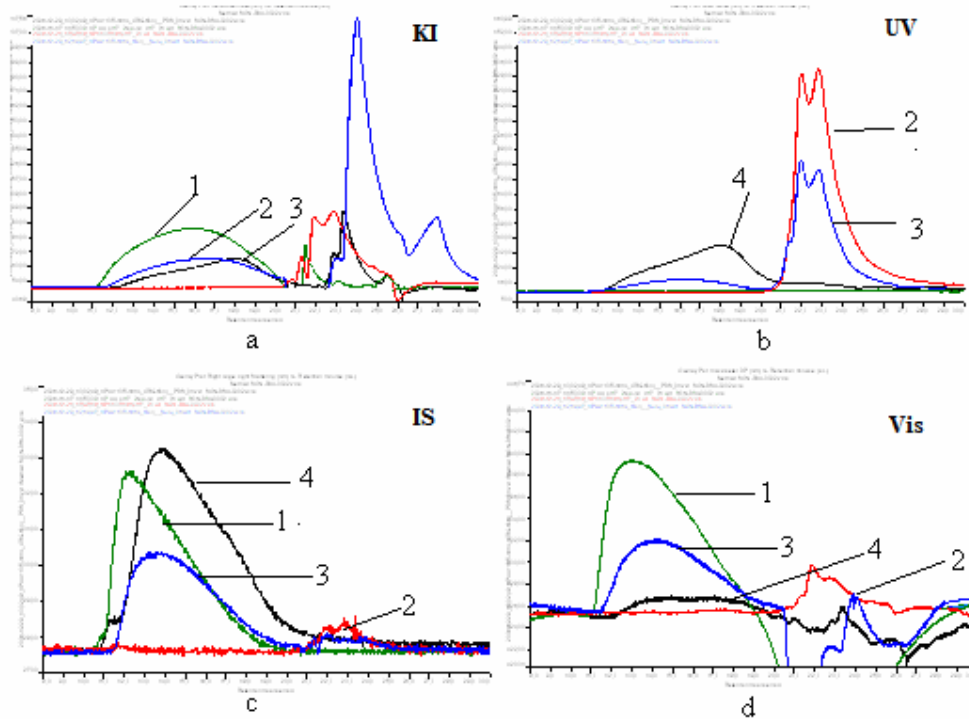
Şekil 5.10 Mikrodalga Teknolojisinde ısı dağılımı (Brittany, 2002)

Mikrodalgayla enerji transferi her nanosaniyede bir gerçekleşmekte ve bu süre moleküllerin durulması için gerekli süreden daha kısa olmaktadır. Moleküller tamamen durulmadan tekrar tekrar enerjiye maruz kaldıklarından, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini aşabilecek duruma gelmeleri kolaylaşmakta ve reaksiyon çok daha çabuk tamamlanmaktadır (Larhed, 2001; Kappe, 2004, 2006).

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının Viskotek ve HPLC cihazlarının UV kromatogramlarında bir miktar peptidin reaksiyona girmeden

serbest kaldığı ve reaksiyon veriminin buna bağlı olarak düştüğü görülmüştür. Bölümüze 25-DPT-07-04-01 no'lu 'Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular' projesinden alınan Liberty Peptid Sentez Cihazında mikrodalga teknolojisi kullanılarak peptid sentezi gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga teknolojisi peptid sentezinde verimi arttırdığından, çalışmalarımızda kullanılan VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının sentezinde de kullanılabileceği ve biyokonjugasyonun verimini arttıracığı düşünülmüştür.

Karşılaştırma amacı ile bileşenlerinin konsantrasyonları aynı olacak şekilde VP/AA-Peptid biyokonjugatları; hem EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre, hem de mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenmiştir. İki farklı metotla sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına ait viskotek cihazının kromatogramları Şekil 5.11'de gösterilmektedir.



Şekil 5.11 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış **(1)** % 0.2 VP/AA (25/75; Mw=80.000) Kopolimeri, **(2)** % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteininin 135-161 Peptid Dizisi, **(3)** EDC çapraz bağlayıcısı varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatı **(4)** Organik Ortamda Mikrodalga Yöntemi kullanılarak sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Viskotek Kırılma İndisi detektörü (a), UV detektörü (b), Işık Saçılması detektörü (c), Viskozite detektörü (d) kromatogramları

Viskotek cihazının UV kromatogramları incelendiğinde EDC varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatı 2 pik ile karakterize edilmektedir. Birinci pik

biyokonjugata karşı gelirken, ikinci pik ise reaksiyona girmeyen serbest peptidi göstermektedir. Mikrodalga teknoloji kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatı ise tek pik ile karakterize edilmektedir. Tek pik ortama eklenen tüm peptidin reaksiyona girdiğini ve serbest peptid kalmadığını göstermektedir. Ayrıca mikrodalga teknolojisi ile sentezlenen biyokonjugatın pik alanı EDC varlığında sentezlenen biyokonjugata göre daha fazladır. Bu da bize peptid sentezinde yüksek verim sağlayan mikrodalga teknolojisinin, VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının sentezinde biyokonjugasyon verimini attırdığını açık bir şekilde göstermektedir.

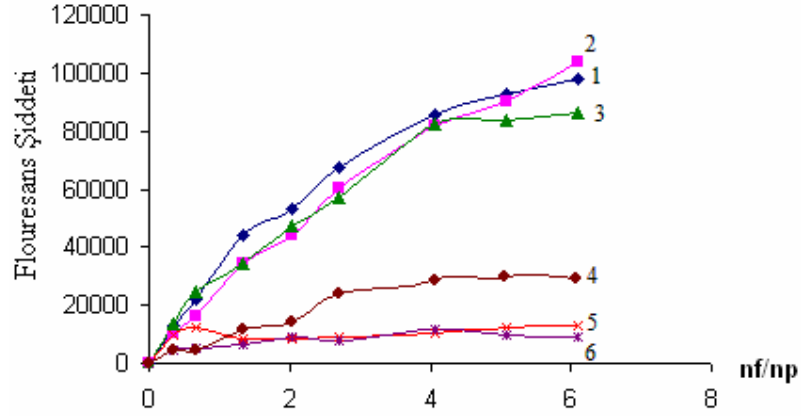
Kromatografik analizlerin yanısıra karşılaştırma amacı ile sentezlenen biyokonjugatların zetasizer cihazında boyut ve zeta potansiyel ölçümleri de yapılmıştır. Serbest VP/AA kopolimeri ve serbest 135-161 peptid dizisi pH 7'de karboksil gruplarının negatif yüklü olmasından dolayı -33,0 mV ve -13.5 mV zeta potansiyeline sahiptir. VP/AA-Peptid (135-161 peptid dizisi) fiziksel kompleksleri -22.5 mV, EDC varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen biyokonjugatı -18.7 mV, mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatı ise -16.1 mV zeta potansiyele sahiptir. Buradaki zeta potansiyel değerlerinin azalması VP/AA ve peptid moleküllerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının konjugasyon reaksiyonu sonucu amino grupları ile bağlanması ve amid bağı oluşturması, bunun neticesinde de negatif yüklerinin kaybolması ile açıklanmaktadır.

VP/AA-Peptid fiziksel komplekslerinin ve her iki metotla sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının amino grubu sayısı ve konjugasyon derecesi floreskamin yöntemi ile saptanmıştır. Şekil 5.12'de  $I_{max}$ 'ın  $n_{\text{floreskamin}}/n_{\text{peptid}}$  oranına bağlı değişimi verilmektedir. Bu şekilden de görüldüğü üzere; peptid (1),  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  (2) ve  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$  (3) oranlarında hazırlanan VP/AA-peptid fiziksel komplekslerine ait  $I_{max}$  değerlerinin birbiri ile yakın olduğu görülmüştür.

Ancak EDC çapraz bağlayıcı varlığında sulu ortamda  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  (4) ve mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda [ $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  (5) ve  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$  (6)] sentezlenen biyokonjugatların  $I_{max}$  değerlerinin serbest peptide göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu bize konjugasyon reaksiyonu sonunda biyokonjugatın yapısında floreskaminin bağlanabileceği serbest amino grubu sayısının azaldığını göstermektedir. Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  oranında EDC çapraz bağlayıcısı varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatının floreskamin reaksiyonu sonrasında floresans şiddetinde serbest peptide oranla azalmıştır. Fakat hem EDC çapraz bağlayıcısı hem de mikrodalga teknolojisi ile  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  oranında sentezlenen biyokonjugatların  $I_{max}$  şiddeti

farklılık göstermektedir. Serbest peptide kıyasla, EDC ile sentezlenen biyokonjugatlarda serbest amino grubu sayısının azaldığı ama bu azalmanın organik yöntemle sentezlenen konjugatlardaki kadar fazla olmadığı görülmüştür. Bu da bize Viskotek sonuçları ile paralel olarak mikrodalga teknolojisi kullanılarak sentezlenen biyokonjugatta, kopolimere daha fazla peptid molekülünün bağlandığını ve daha fazla amino grubunun kapanmış olduğunu göstermektedir. Amino grubu sayısının azalmasına bağlı olarak da  $I_{max}$  şiddetinde daha fazla azalma görülmektedir çünkü floreskaminin bağlanacağı amino grubu sayısı daha da azalmıştır. EDC ile sulu ortamda yapılan konjugat sentezinde ise kopolimere daha az peptid molekülünün bağlandığı ve serbest amino grubunun azaldığı ancak azalmanın organik ortamdaki sentezlenen konjugattaki kadar olmadığı görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar ışığında reaksiyon veriminin mikrodalga yöntemi ile sentezlenen biyokonjugatlarda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 5.12 (1) % 0.003 Şap Hastalığı Virüsünün 135-161 peptid dizisi, (2) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{peptid}/n_{VP/AA}=2$ ), (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ( $n_{peptid}/n_{VP/AA}=4$ ), (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{peptid}/n_{VP/AA}=2$ ), (5) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{peptid}/n_{VP/AA}=2$ ), (6) Mikrodalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ( $n_{peptid}/n_{VP/AA}=4$ ) ait flouresans şiddet değişimi

## 5.2 Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik 135-161 Peptid Dizisini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların MCF-7 Kanser Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerine Ait Tartışma

Farklı metodlarla hazırlanan VP/AA-Peptid fiziksel kompleksleri ve farklı metodlarla sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının antijenik ve koruyucu özellikleri balb/c farelerde test edilmeden önce bu biyokonjugatların hücre çoğalması üzerine olan etkisi *in vitro* olarak değerlendirildi. Bu çalışmalar bölümümüzün 'Hücre Kültür Laboratuvar'ında,

Prof. Dr. Adil Allahverdiev başkanlığında, grup çalışanları tarafından gerçekleştirildi.

### **5.2.1 Serbest peptidin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi**

Yapılan mikropalak kültür deneyinde serbest peptidin değişik konsantrasyonlarının (4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.2 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi. Serbest peptid konsantrasyonları 4 mg/mL, 2 mg/mL ve 1 mg/mL olacak şekilde peptid çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücreler kontrol grubu hücrelerine benzer bir morfolojik özellik gösterirken, kontrol grubundan farklı olarak yuvarlak hücre sayısı biraz daha fazladır. Serbest peptid konsantrasyonları; 0.75 mg/mL, 0.50 mg/mL ve 0.20 mg/mL olacak şekilde peptid çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi. MTT yöntemi uygulanan kuyularda ise; serbest peptid konsantrasyonları 4 mg/mL, 2 mg/mL ve 1 mg/mL olacak şekilde peptid çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücreler üzerinde formazan kristalleri kontrol grubu hücreleri gibi oluşmuş, fakat formazan kristali oluşturmamış ölü hücreler kontrol grubuna göre daha fazladır. Serbest peptid konsantrasyonları 0.75 mg/mL, 0.50 mg/mL ve 0.20 mg/mL olacak şekilde peptid çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücreler üzerinde kontrol grubuna benzer şekilde formazan kristalleri gözlemlendi. MTT deney sonunda serbest peptidin 4 mg/mL değerlerinde MCF 7 hücreleri üzerine toksik etkisi gözlenmediğinden IC<sub>50</sub> değeri hesaplanamamıştır. Serbest peptidin yüksek konsantrasyonlarında toksik etki gözlenebilir.

### **5.2.2 Serbest VP/AA kopolimerinin MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi**

Bu mikropalak kültür deneyinde ise serbest VP/AA kopolimerinin değişik konsantrasyonlarının (15 mg/mL, 10 mg/mL, 4 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda, kontrol grubu olan kuyulardaki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olduğu gözlenirken, serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonları 15 mg/mL ile 1 mg/mL arasındaki olacak şekilde polimer çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerde deformasyon gözlemlendi. Hücrelerin küçüldüğü, yüzey uzantılarını kaybettiği ve yuvarlak formda olduğu, yüzey kaplamasının azaldığı morfolojik olarak tespit edildi. Serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonları 0.7 mg/mL ve 0.4 mg/mL olacak şekilde polimer çözeltisi eklenmiş olan kuyularda ise normal morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlenirken, fazla sayıda yuvarlak hücrelerin olduğu belirlendi. Serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonları 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 0.05 mg/mL olacak şekilde polimer

çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin ise kontrol grubundaki hücreler gibi sağlıklı olduğu gözlemlendi.

MTT metodu sonrasında 15 mg/mL serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonu uygulanan kuyularda her alanda 10-15 hücre üzerinde formazan kristal oluşumu gözlenirken (kristal oluşmamış ölü hücre sayısı çok fazla), 0.7 mg/mL ve 0.4 mg/mL serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonu uygulanan kuyularda üzerinde formazan kristalleri oluşmuş hücre sayısı yaklaşık olarak tüm hücrelerin yarısı kadardır. Serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonları 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 0.05 mg/mL olacak şekilde polimer çözeltisi eklenmiş olan kuyularda ise hücrelerin üzerinde oluşan formazan kristalleri kontrol kuyularını andırmakla birlikte, kontrol kuyularına göre daha fazla kristal oluşturmamış ölü hücreye sahiptir.

Bu yöntemle MCF 7 hücrelerinin %50'sine etki eden serbest VP/AA kopolimerinin IC<sub>50</sub> değeri 3.75 mg/mL olarak belirlendi.

### **5.2.3 VP/AA-Peptid fiziksel karışımının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi**

Yapılan bu mikropalak kültür deneyinde VP/AA-Peptid fiziksel karışımının değişik konsantrasyonlarının (3.2 mg/mL, 2 mg/mL, 1.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

VP/AA-peptid fiziksel karışımının konsantrasyonları 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL olacak şekilde fiziksel karışım çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin morfolojik incelemeleri neticesinde; bu kuyulardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine benzer bir morfolojik özellik göstermektedir. 2 mg/mL, 1.2 mg/mL olan konsantrasyonlarda fiziksel karışım çözeltisi eklenen kuyularda kontrol grubundan farklı olarak yuvarlak hücre sayısı biraz daha fazladır. VP/AA-peptid fiziksel karışımının konsantrasyonu 3.2 mg/mL olacak şekilde çözelti eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin ise % 50'den fazlasının ölü olduğu gözlenmiştir. 2 mg/mL, 1.2 mg/mL olan konsantrasyonlarda ise formazan kristalleri kontrol grubuna benzer şekilde oluşmuş, fakat formazan kristali oluşturmamış ölü hücrelerin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise çok az formazan kristalleri görülmüştür.

MCF 7 hücrelerinin %50'sine etki eden VP/AA-Peptid fiziksel karışımının IC<sub>50</sub> değeri 3.2 mg/mL olarak belirlenmiştir.

#### **5.2.4 VP/AA-Peptid Biyokonjugatının MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin Değerlendirilmesi**

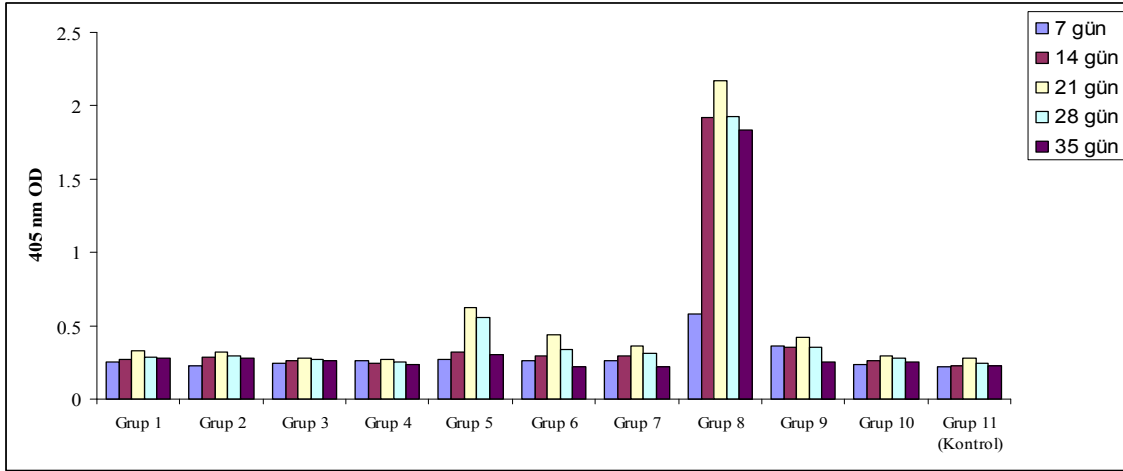
Mikroplak kültür deneyinde VP/AA-Peptid Biyokonjugatının değişik konsantrasyonlarının (3.2 mg/mL, 2 mg/mL, 1.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL) MCF 7 hücreleri üzerindeki etkisi incelendi.

VP/AA-peptid biyokonjugat konsantrasyonları; 0.4 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL olacak şekilde biyokonjugat çözeltisi eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin morfolojik incelemeleri neticesinde kuyulardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine benzer bir morfolojik özellik gösterdiği gözlenmiştir. 2 mg/mL, 1.2 mg/mL olan konsantrasyonlarda kontrol grubundan farklı olarak yuvarlak hücre sayısı biraz daha fazladır. VP/AA-peptid biyokonjugat konsantrasyonu 3.2 mg/mL olacak şekilde eklenmiş olan kuyulardaki hücrelerin ise yaklaşık % 50'sinde kristal oluşmuştur. 2 mg/mL, 1.2 mg/mL olan konsantrasyonlarda formazan kristalleri kontrol grubuna benzer şekilde oluşmuş, fakat formazan kristali oluşturmamış ölü hücreler kontrol grubuna göre daha fazladır. En yüksek konsantrasyonda ise çok az formazan kristalleri gözlenmiştir.

Tüm bu deneyler neticesinde MCF 7 hücrelerinin %50'sine etki eden VP/AA-Peptid konjugatın IC<sub>50</sub> değeri 2.83 mg/mL olarak belirlendi.

#### **5.3 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde VP/AA Kopolimeri-Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Sentetik Peptid Dizilerini İçeren Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktarına Ait Tartışma**

İki farklı yöntemle hazırlanan VP/AA-Peptid fiziksel karışımları ve iki farklı yöntemle sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları ayrı zaman aralıklarında farelere enjekte edildi. EDC varlığında yöntem 2'ye göre bileşenlerinin farklı oranlarında hazırlanan VP/AA-peptid fiziksel kompleksleri ve biyokonjugatlarının balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 4.6'da verilen şekilde yapılmıştır. Şekil 4.76'da tek bir doz intravenöz enjeksiyonları yapılan ve 7 gün aralıklarla 98 gün boyunca balb/c fare serumlarında VP/AA-Peptid fiziksel karışımlarına ve biyokonjugatlarına karşı spesifik olarak oluşan antikor miktarı indirek ELISA yöntemi ile saptanmıştır (Dilgimen vd., 2001; Yücel vd., 2001, 1999; Başalp vd., 2000, 1996b; Mustafev vd., 1998, 1996; Engvall vd., 1980; Sauer vd., 1986). Şekil 5.13'te çizelge 4.6'da özellikleri tanımlanan ve 7., 14., 21., 28., 35. günlerinde kanları alınan deney gruplarında VP/AA-Peptid fiziksel kompleks ve biyokonjugatlarına karşı oluşan antikor miktarları gösterilmiştir.



Şekil 5.13 EDC varlığında yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid fiziksel karışım ve biyokonjugatlarının enjeksiyon sonrası (35 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi

Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  farklı oranlarında 0.5 mg peptid/fare içecek şekilde hazırlanan ve tek doz enjeksiyonları yapılan VP/AA-Peptid fiziksel komplekslerinin (Grup 2, Grup 3, Grup 4) immün yanıt oluşumunu indüklediği görülmüştür. Bu fiziksel komplekslerin HPLC kromatogramlarında (Şekil 4.71) serbest peptide ait karakteristik özelliklerin ağır bastığı görülmektedir. Molekül ağırlığı 2974 olan serbest 135-161 peptidi (Grup1) immün yanıt oluşumunu aktifleyemezken; serbest peptidin freund adjuvant ile karışımı (Grup 9) çok çok düşük düzeyde de olsa immün sistemi aktiflemiştir. Literatür taramalarında; molekül ağırlığı yaklaşık 1500'den az olan sentetik antijenlerden immün yanıt elde etmek için peptid molekülünü bir taşıyıcı moleküle bağlamak gerektiği söylenmektedir (Kabanov, 2004; Ibarz vd., 2000; van Driel vd., 1999; Mustafev vd., 1996b; Altman vd., 1991). Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$  farklı oranlarında 0.5mg peptid/fare içecek şekilde hazırlanan VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının (Grup 5, Grup 6, Grup 7) tek bir defalık immunizasyonu sonucu düşük seviyede olsa fare serumlarında bu konjugatlara spesifik olarak antikor oluşumu gözlenmiştir.

Dilgimen ve arkadaşları; (2001) eşit konsantrasyonda BSA içeren CP-BSA konjugat çözeltilerini (0.01-0.10 g/dl dilüe ve 0.448-2.286 g/dl konsantre) farelere enjekte etmiş ve konsantrasyonu düşük ve yüksek olan CP-BSA konjugatlarına karşı immün cevap oluşumunu incelemiştir. Farelere serbest BSA enjekte edilmesi durumunda doza bağlı olarak antikor oluşumu tetiklenmiştir. Konsantrasyonu düşük (0.01-0.10 g/dl) CP-BSA çözeltilerine karşı çok düşük düzeyde antikor oluştuğunu rapor etmişlerdir. Konsantre 0.448-2.286 g/dl CP-BSA çözeltilerine karşı immunizasyon sonrası 7 günde maksimuma ulaşan ve 50 gün boyunca

etkisini sürdüren immünolojik aktivite gözlemişlerdir.

Sauravi ve arkadaşları 1999'da yaptıkları bir çalışmada 10 amino asid dizisinden oluşan luteizin salıcı hormonunu (LHRH) taşıyıcı bir protein yerine T4 epitopuna 4 farklı konformasyonda, çapraz bağlayıcı varlığında kovalent olarak bağlamışlar. 20 nmol LHRH peptid dizisi içerecek şekilde Freund's adjuvant (CFA) ile karıştırılarak balb/c farelere enjekte etmişler. 4 hafta sonra ikinci bir immünizasyon yapmışlar. Aynı konsantrasyonda enjekte edilen immünojenlerden sadece birine karşı immünolojik yanıt alınmıştır.

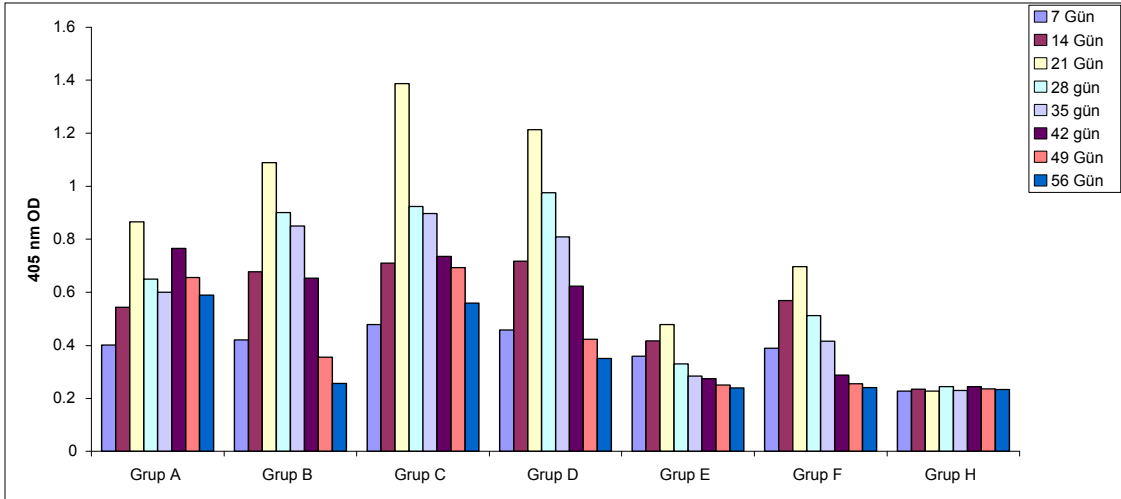
Çalışmamızda; 5, 6, 7 gruplarda gözlenen düşük immün cevap oluşumunun, yukarıda belirtilen çalışmalardaki gibi biyokonjugat içerisinde bulunan peptid konsantrasyonuna ve VP/AA-Peptid biyokonjugatının konformasyonuna bağlı olacağı düşünülmektedir.

Bileşenleri  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=3$  oranında 0.5 mg peptid/fare içerecek şekilde sentezlenen BSA-Peptid biyokonjugatına karşı tek doz enjeksiyonla immün sistem aktiflenmiş (Grup 8) ve antikor miktarı 21. günde maksimuma ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır. Enjeksiyon sonrasında 98. günde dahi oldukça yüksek BSA-Peptid biyokonjugatına karşı spesifik antikor bulunmaktadır. Benzer sonuçlar Mustafaev, 2004, 2002, 1996; Kabanov, 2004; Dilgimen vd., 2001; ve Başalp vd., 2000 tarafından da daha önce raporlanmıştır.

İkinci bir immünizasyon işlemi mikrodalga teknolojisi ile sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları ile gerçekleştirilmiştir. Her bir grupta 4 erkek balb/c fare içeren 6 grup oluşturuldu (Çizelge 4.7). Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$  ve 4 oranlarında 0.5 mg peptid/ fare içerecek şekilde sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları immün sistemi aktiflemişlerdir (Şekil 4.77). Şekilde 5.14'te tüm gruplarda 21. günde antikor miktarı maksimuma ulaşmış ve sonra azalmaya başlamıştır. Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$  oranında 0.5 mg peptid/ fare içerecek şekilde sentezlenen VP/AA-Cu<sup>+2</sup>-Peptid biyokonjugatına karşı en fazla immün yanıt oluşmuş ve aktif immün sistem etkisini 56 gün boyunca sürdürüştür.

Cu<sup>+2</sup> içeren üçlü komplekslerin ve kovalent konjugatların kısa sürede primer ve sekonder immün sistemi aktive ettiği bildirilmektedir (Mustafaev, 2004, Bayülken 2004; Başalp vd., 2002; Filenko vd.i 2001; Yücel vd., 2001; Mustafaev vd., 1998,1996).

Serbest VP/AA (25/75; Mw 80 000) kopolimeri ve serbest peptid enjeksiyonu yapılan grup E'de 21. günde immün cevap en düşük düzeyde oluşmuş ve hemen sonrasında sönmüştür. Bileşenlerinin  $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$  oranlarında, 0.2 mg peptid/ fare içerecek şekilde sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına (VP/AA kopolimer; 50/50) karşı bileşimindeki peptid oranına bağlı olarak daha düşük immün yanıt alınmıştır.



Şekil 5.14 Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının enjeksiyon sonrası (56 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi

Petrov ve arkadaşları (1985); influenza A virüsünden izole edilen hemaglutinini (HA), hemaglutinin ve nöraminidaz karışımını (HA+NA) ve matrix proteinini (M) sentetik bir polielektrolite kovalent olarak bağlanmışlar. Oluşan konjugatın (virogat) farelere tek bir enjeksiyonu ile viral antijenlere spesifik primer immün cevabın etkin biçimde stimule edildiği rapor edilmiştir. Virogatlarla (HA·P veya (HA+NA)·P) immünize edilen fareler, homolog virulans enfeksiyon sonucu ölüm riskinden büyük oranda korunmuştur. Farelerin, 1934 influenza suşundan orijinlenen M proteini ihtiva eden M·P virogatıyla immünizasyonu sonucu 1980 suşun öldürücü etkisine karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir.

Mustafaev ve arkadaşları (1996), farklı miktarda  $\text{Cu}^{+2}$  içeren PAA- $\text{Cu}^{+2}$ -BSA üçlü kompleksine karşı oluşan antikor miktarını araştırmışlar. Farelerin serbest BSA ile tek bir immünizasyonuna karşılık çok düşük seviyede antikor oluştuğunu rapor etmişler. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{Cu}^{+2}$  içeren PAA- $\text{Cu}^{+2}$ -BSA üçlü kompleksine karşı, serbest BSA'ya karşı oluşan antikor ile aynı düzeyde yanıt almışlar. Fakat  $\text{Cu}^{+2}$  konsantrasyonunun yüksek değerinde sentezlenen PAA- $\text{Cu}^{+2}$ -BSA üçlü kompleksine karşı daha önce BSA'nın immün cevap oluşturmaması konsantrasyonunda yüksek  $\text{Cu}^{+2}$  konsantrasyonuna bağlı immün yanıt oluşumunu gözlemişler. İmmün yanıt oluşumunun zamana bağlı olarak arttığını ve maksimuma ulaştıktan sonra azaldığını söylemektedirler. Ayrıca antikor oluşumu  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{BSA}}$  oranına bağlı ve üçlü kompleksteki PAA konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır.

Şap Hastalığı virüsüne karşı, bu virüsün peptid antijenlerini ile PE içeren sentetik aşı çalışmaları Türkiye'de Mustafaev ve Deliloğlu başkanlığında oluşturulan grup tarafından

başlatılmıştır. A<sub>22</sub> serotip Şap hastalığı virüsünün 40-60 ve 135-160 peptid epitoplarını Merrifield katı-hal kimyasal yöntemi ile sentezlemişler ve karbodiimid varlığında doğrudan iki farklı yapıyı kopolimere kovalent bağlarla bağlamışlar. Protein taşıyıcısının biyokonjugatın yapısında gerekli olup olmadığının anlaşılması için diğer örnekleri farklı yöntemlerle sentez etmiştir. Peptidler önce sığır serum albümin proteini ile kovalent konjuge edilmiş ve ikinci aşamada protein-peptid biyokonjugatları ve sentetik polielektrolitler arasında elektrostatik ve iyon koordinasyon polikompleksleri oluşturularak peptid içeren biyopolimer sistemler hazırlanmıştır. Geliştirilmiş peptid içeren polimerik biyokonjugatların immünolojik özelliklerini farelerde araştırmışlar ve kan serumlarında yüksek titreli peptide spesifik antikor oluşturduğunu saptamışlar. Peptid aşlarının sığırlarda etkin çalışabilmesi için biyokonjugatların yapısında eşzamanlı olarak virüs-spesifik T-helper lenfositlerinin aktivasyonu için gerekli olan T-epitoplarında bulunmasının önemli olduğunu vurgulamışlar.

Villen ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında, şap hastalığı virüsünün VP1, VP2 ve VP3 kapsid proteininin antijenik özellikli A ve D bölgelerine ait peptid dizilerini kullanarak çok bileşenli peptid aşısı geliştirmişler. Şap hastalığı virüsünün antijenik özelliğe sahip A bölgesinde yer alan A24 ve A19 peptid dizileri ile D bölgesinde yer alan D8 bölgesine ait peptid dizilerini sentezlemişler. Farklı konsantrasyonlarda tek peptid dizisi Freund's adjuvant (CFA) ile karıştırılmış ve kobaylara enjekte edilmiştir. İkinci bir grup kobay hayvanlarına, A bölgesi peptidini ya tek başına ya da D8 peptidi ile kombine bir şekilde enjekte etmişler. Kobay modellerinde ilk ümmünizasyondan sonra D8 peptid dizisine karşı en yüksek spesifik cevap almışlar ve diğer peptid dizilerine karşı 2. immünizasyondan sonra immün cevap oluşumu gözlemişlerdir.

Beignon ve arkadaşları (2005) şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin 141-159 aminoasid dizisinden oluşan peptidi BSA ve ovalbumin (OVA) ile konjuge etmişler. Serbest peptid, BSA ve OVA ile konjuge peptidleri ve kolera toksini ile birlikte 6-8 haftalık balb/c dişi farelere transkutan olarak enjekte etmişler. Peptid bazlı aşların uygun adjuvantlarla birlikte transkutan immünizasyonu sonrası güçlü antikor cevabı ile birlikte virüs nötralizasyonunu sağladığını bildirmişler.

Bu çalışmamızda, BSA-peptid biyokonjugatının tek doz intravenöz enjeksiyonu sonrasında hızla yükselmeye başlayan ve 21. günde maksimuma ulaştıktan sonra giderek azalan spesifik antikor cevabı gözlenmiştir. 98 gün sonrasında dahi antikor miktarının sıfıra ulaşmadığı gözlenmiştir. BSA ile konjuge edilen T-hücre epitoplarının yüksek immünite gösterdiği birçok literatürde bildirilmiştir (Mustafaev, 2004, 2002, 1996a; Kabanov, 2004; Dilgimen vd.,

2001; Başalp vd., 2000). Şap hastalığı peptid dizisinin polielektrolitler ile olan konjugasyonunda mikrodalga teknolojisi kullanılarak sentez edilen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarına karşı en yüksek spesifik immün yanıt alınmıştır. EDC varlığında yöntem 2'ye göre 0.5 mg peptid/fare içerecek şekilde sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatları hesaplanan (doz miktarı) peptid konsantrasyonunu içermemektedir. Çünkü; biyokonjugasyon reaksiyonu sırasında reaksiyon ortamına konulan peptidin tümü reaksiyona girmemekte ve reaksiyonuna girmeyen serbest peptid saflaştırma işlemleri ile ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemler sırasında VP/AA-Peptid biyokonjugatının bir miktarı kaybolmaktadır. Bu yüzden Balb/c farelere enjekte edilen doz miktarı hesaplanan dozda olmadığından VP/AA-Peptid biyokonjugatlarımıza karşı istenilen yüksek düzeyde immün cevap alınamamıştır. Mikrodalga teknolojisi kullanılarak sentezlenen biyokonjugatlarda ise aynı miktar eklenen peptidin tümünün reaksiyona girmesinden dolayı, şap hastalığı virüsünün VP1 kapsid proteininin peptid epitopunu içeren biyokonjugatımıza karşı yüksek spesifik yanıt alınmıştır. Bunun nedeni; mikrodalga teknolojisinin konjugasyon işlemi sırasında kopolimeri lineer pozisyonda tutması, sterik engellemeyi önlemesi, bunların sonucunda da tüm peptidin kopolimer ile reaksiyona girmesi ve konjugat yapısının katlanıp yumak halini almasını engellemesidir. Böylece; biyokonjugat içerisindeki peptid dizileri açıkta kalmakta ve kandaki plazma proteinleri ve hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilmektedir.

Üç farklı polipeptid (40-60, 135-161 ve 170-188 peptid dizileri) zinciri kullanılarak elektrostatik etkileşim, iyon koordinasyon ( $\text{Cu}^{+2}$  aracılığı) ve kovalent bağ oluşumu ile PE-peptid kompleks ve konjugatları oluşturulmuştur. Bu biyopolimer sistemleri ile immünize edilmiş farelerde peptid-özgün antikor oluşumunun dinamikleri incelenmiştir. PE ile polipeptidlerin neutral pH'lardaki mekanik karışımlarında elektrostatik bir etkileşim olduğu, ancak bir bağlanmanın gözlenmediği söylenebilir. İlk defa olarak peptidlerin doğrudan polimere mikrodalga teknolojisi kullanılarak bağlanması ile spesifik antikor oluşturabilen yüksek immünojenler sentezlenmiştir. Sentezlenmiş konjugatların çeşitli fiziko-kimyasal yöntemlerle yapısı incelenmiş ve yapı modelleri gerçekleştirilmiştir.

BSA ile polipeptidlerin suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) aktivasyonu ile BSA-peptid biyokonjugatları sentezlenmiştir. Bu BSA-peptid biyokonjugatları homojen yapıda ve niteliktedir. BSA molekülüne farklı miktarda peptid molekülü bağlanmasının yanı sıra, bir polipeptid zinciri farklı BSA moleküllerini birbiri ile bağlayabildiğini de ortaya koymuştur (intermolecular crosslink).

Farklı yöntemlerle sentezlenen biyokonjugatların tek doz immünizasyonları ile farelerde,

yüksek primer immün yanıt oluşmasına yol açtığı verilerden görülebilmektedir. Farelerde, peptid içeren biyopolimer sistemler ile immünizasyonda, 7 gün dolayında peptid-spesifik antikor aktivitesinin arttığı ve 35 güne kadar bu seviyesini korunduğu gözlenmiştir.

Polimer-peptid konjugatlarının immünojenik aktivitesinin temelini oluşturan fiziko-kimyasal mekanizma(lar), polimerik makromoleküllerin adjuvant etkisi ile ilgili olabilir. Biyokonjugat üzerinde PE'in boş yerleri, 'immünocomplete' hücre membranları ile güçlü etkileşimi sağlayabilir. Bu ise, polimere bağlı antijen ile spesifik hücre reseptörleri arasında etkileşimi kolaylaştırabilir ve stabilize eder, böylece immün cevap güçlenir. İmmün yanıt için, bu şekilde güçlendirilmiş etkileşimler ve yüksek epitop yoğunluğunun (bir polimer taşıyıcıya birkaç peptid molekülünün bağlanmasıyla) etkisi oldukça önemlidir. Sonuç olarak, buraya kadar yapılmış olan denemeler ile, immünolojik ve pratik ilginin aşırı olduğu, polipeptid antijenlere karşı immün yanıtta artma sağlayan bir yöntem tanımlanmış oldu.

'Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular' şemsiye projesi kapsamında bu alanda ki çalışmalarımıza devam etmekteyiz. Büyük baş hayvan deneysel çalışmaları için yeterli miktarda VP/AA-Peptid biyokonjugatların sentezleri yapılarak, büyük baş hayvanlarda bağışıklık kazandırma özellikleri incelenecektir.

Ucuz ve basit bir teknoloji ile geliştirilen, yüksek stabiliteye sahip, biyolojik ömrü uzun, T-bağımlı olmayan immün yanıt oluşturabilen ve virüs içermeyen bu biyokonjugatların 'Polimerik Şap Aşısı' olarak kullanılmasıyla Türk Sağlık sektörüne ve ekonomisine büyük katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Abbas, A.K., Lichman, A.H., Pober, J.S., (1991), "Cellular and Molecular Immunology", HJB Saunders.
- Abe, K., Matsude, N., (2000), "Measurement of Cellular 3-(4,5-demethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Reduction Activity and Lactate Dehydrogenase Release Using MTT", *Neurosci Res* 38325-329.
- Abu chowski, A., van Es, T., Palczul, N.C., Davis, F.F., (1977), 'Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol', *J. Biol. Chem.*, 252: 3578- 3581.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. ve Brown, F., (1989), "The Three-Dimensional Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus at 2.9 Å Resolution", *Nature* 337, 709-716.
- Akan, E., (1992), Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yayınları, No: 16, Adana.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., (1988), "Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using A Microculture Tetrazolium Assay", *Cancer Res* 48: 589-601.
- Altman, A., ve Zanetti, M., (1991), "Synthetic Vaccines", p.745–755. In R. Dulbecco (ed.), *Encyclopedia of human biology*, vol. 7. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Alving, C.R., (1977), "In The Antigens", New York: Academic Press, Vol. 4, p. 1.
- Armando, G.P., Darszon, A., Gómez-Puyou, M.T., (1992), "Biomolecules in Organic Solvents By Published CRC Press Technology & Industrial Arts 266 pages ISBN 0849348234.
- Arnon, R., Ben-Yedidia, T., (2003), "Old and New Vaccine Approaches" *International Immunopharmacology* 3, 1195–1204.
- Aslam, M., Dent, A., (1998), "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences" Macmillan Reference LTD, London.
- Audibert, F., Jovilet M., Chedid, L., Alnf J.E., Boquet, P., Ruaille, P., Siffert O. (1981), "Active Antitoxic Ammunization by A Diphtheria Toxin Synthetic Oligopeptide", *Nature* 289: 593-599.
- Bamford, C.H., Cooper, S.L., Tsuruta, T. J., (1989), *Biomater Sci Polymer Edn.* 1:1.
- Baron, M.H., Baltimore, D., (1982), "Antibodies Against the Chemically Synthesized Genome-Linked Protein of Poliovirus React with Native Virus-Specific Proteins", *Cell* 28: 395-404.
- Başalp, A., Bermek, E., Çirakoğlu, B., Coka, V., Mustafaev, M.I., Saraç, A.S., (1996), "Immune Response to 17 beta-estradiol in Polyelectrolyte Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", *Hybridoma*, 15 (3): 233-238.
- Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., Bermek, E., (2000), "Immune Response to 17 beta-estradiol Involved in Polymer Gels: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", *Hybridoma*, 19 (6): 495-499.
- Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., (2002), "Immunogenic Cu<sup>2+</sup>-Induced Biopolymer

- Systems Comprising A Steroid Hormone, Protein Antigen, and Synthetic Polyelectrolytes”, *Hybridoma and Hybridomics*, 21 (1): 45-51.
- Baxt, B., Garmendia, A.E. ve Morgan., D.O., (1989), “Characterization of Anti-Idiotypic Antibodies Generated Against Foot-and-Mouth Disease Virus Neutralizing Monoclonal Antibodies”, *Viral Immunol.* 2: 103–113.
- Baxt, B., Morgan, D.O., Robertson, B.H. ve Timpone, C.A., (1984), “Epitopes on Foot-and-Mouth Disease Virus Outer Capsid Protein VP1 Involved in Neutralization and Cell Attachment”, *J. Virol.* 51: 298–305.
- Bayülken, S., Yüce, G., Erkol, A.Y., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M.I., (2004), “Effect of Copper Ions on The Radiostability of Protein-Polyelectrolyte Mixtures” *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 2, 315-319.
- Beck, E., Feil, G. ve Strohmaier, K., (1983), “The Molecular Basis of The Antigenic Variation of Foot-and-Mouth Disease Virus, *EMBO J.* 2, 555-559.
- Beignon, A.S., Brown, F., Eftekhari, P., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Charalambos, D.P., (2005), “A Peptide Vaccine Administered Transcutaneously Together with Toxin Clore Toxin Elicits Potent Neutralising Anti-FMDV Antibody Responses”, *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 104, 273-280.
- Belnap, D.M., McDermott, B.M. Filman, Jr., D.J., Cheng, N., Trus, B.L., Kolatkar, P.R., Bella, J., Olson, N.H., Bator, C.M., Baker, T.S. ve Rossmann, M.G., (1999), “Structural Studies of Two Rhinovirus Serotypes Complexed with Fragments of Their Cellular Receptor”, *EMBO J.* 18:6249–6259.
- Belsham, G.J., Abrams, C.C., King, A.M., Roosien, J. ve Vlak., J.M., (1991), “Myristoylation of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Protein Precursors is Independent of Other Viral Proteins and Occurs in Both Mammalian and Insect Cells”, *J. Gen. Virol.* 72:747–751.
- Ben-Yedidia, T., Arnon R., (1989), “Synthetic Peptide-Based Vaccines Against Influenza”, Springer Neterlands, Volume 5, Numbers 5-6, ISBN 0929-5666 (Print) 1573-496X.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P.W. ve Baxt, B., (1995), “Antibodies to The Vitronectin Receptor (Integrin  $\text{Av}\beta 3$ ) Inhibit Binding and Infection of Foot-and-Mouth Disease Virus to Cultured Cells”, *J. Virol.* 69, 2664–2666.
- Bilgehan, H., (1993), *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. 6. Baskı, Barış Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- Boersma, W.J.A., Claassen, E., Deen, C., Gerritse, K., Haaijman, J.J., Zegers, N.D., (1988) “Antibodies to Short Synthetic Peptides for Specific Recognition of Partly Denatured Protein”, *Analytica Chimica Acta*, 213:187-197.
- Bolwell, C., Clarke, B.E., Parry, N.R., Ouldrige, E.J., Brown, F. ve Rowlands, D.J., (1989), “Epitope Mapping of Foot-and-Mouth Disease Virus with Neutralizing Monoclonal Antibodies”, *J. Gen. Virol.* 70: 59–68.
- Borrego, B., Camarero, J.A., Mateu, M.G. ve Domingo, E., (1995), “A Highly Divergent Antigenic Site of Foot-and-Mouth Disease Virus Retains its Immunodominance” *Viral Immunol.* 8:11–18.
- Brittany, L. H., (2002), "Microwave Synthesis, Chemistry at the Speed of Light", CEM Publishing, USA.
- Brown, F., ve Cartwright, B., (1961), “Dissociation of Foot-and-Mouth Disease Virus into its Nucleic Acid and Protein Components”, *Nature* 192:1163–1164.

- Burmester, G.R., Pezzutto A., Çeviri : Tetikkurt C., (2006), “Renkli İmmünology Atlası”, Nobel Tıp Kitapevi.
- Cavanagh, D., Sangar, D.V., Rowlands, D.J. ve Brown, F., (1977), “Immunogenic and Cell Attachment Sites of Foot-and-Mouth Disease Virus: Further Evidence for Their Location in A Single Capsid Polypeptide”, *J. Gen. Virol.* 35, 149-158.
- Chan W. C., White P.D. (2000), *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Pres, Oxford.
- Chapman, M.S. ve Rossmann, M.G., (1993), “Comparison of Surface Properties of Picornaviruses: Strategies for Hiding The Receptor Site From Immune Surveillance”, *Virology* 195, 745-756.
- Charpentier, N., Dávila, M., Domingo, E. ve Escarmís, C., (1996), “Long-term, Large-Population Passage of Aphthovirus Can Generate and Amplify Effective Noninterfering Particles Deleted in The Leader Protease Gene”, *Virology* 223, 10-18.
- Chase, J.W., Merrill, B.M., Williams, K.P., (1983), “F sex factor encodes a single-stranded DNA binding protein (SSB) with extensive sequence homology to *Escherichia coli* SSB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5480-5484.
- Chen, B., Pogue, W.B., Hasan, T., (2005), “Liposomal delivery of photosensitising agents”, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2(3):477-487.
- Cheung, A., DeLamarter, J., Weiss, S. ve Küpper, H., (1983), “Comparison of The Major Antigenic Determinants of Different Serotypes of Foot-and-Mouth Disease Virus”, *J. Virol.* 48, 451–459.
- Chow, M.J., Newman, F., Filman, D., Hogle, J.M., Rowlands, D.J. ve Brown, F., (1987) “Cristylation of Picornavirus Capsid Protein VP4 and its Structural Significance”, *Nature*, 327:482–486.
- Chu, F.S., Fred, Chi C., Hinsdill, R.D., (1976), “Production of antibody against ochratoxin A”, *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 831-835.
- Chu, F.S., Ueno, I., (1977), “Production of antibody against aflatoxin B<sub>1</sub>”, *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1125-1128.
- Clavijo, A., Kitching, P., (2003), ‘The Nature and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease’, *Clinical Microbiolgy Newsletter*, 25(11): 81-88.
- Crowther, J.R., Farias, S., Carpenter, W.C. ve Samuel, A.R., (1993), “Identification of A Fifth Neutralizable Site on Type 0 Foot-and-Mouth Disease Virus Following Characterization of Single and Quintuple Monoclonal Antibody Escape Mutants”, *J. Gen. Virol.* 74: 1547–1553.
- Curry, S., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Fry, E., Jackson, T., King, A., Lea, S., Logan, D., Newman, J. ve Stuart, D., (1992), “Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Three Serotypes of Foot-and-Mouth Disease Virus”, *J. Mol. Biol.* 228, 1263-1268.
- Das, P.K., Ghosh, P., Bachhawat, B.K., Das, M.K., (1982a), “Liposomes as immunological carriers for the preparation of antimannosyl antibodies”, *Experientia*, 38(5):629-30.
- Das, P.K., Ghosh, P., Bachhawat, B.K., Das, M.K., (1982b), “Liposomes as carrier for production of sugar specific antibodies: preparation of antigalactosyl antiserum”, *Immunol. Commun.*, 11(1):17-24.
- Deen, C., Claasen, E., Gerritse, K., Zegers, D.N., Boersma, J.A.W., (1990), “A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides enhanced anti-peptide antibody responses”, *J. Immunol. Methods.*, 129 119-25.

- Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., Mustafaev, M., (2001), "Water-soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly(N-isopropyl-Acrylamide) and Their Immunogenicity", *Biomaterials*, 22 (17): 2383-2392.
- Domingo, E., Escarmís, C., Martínez, M.A., Martínez-Salas, E. ve Mateu, M.G., (1992), "Foot-and Mouth Disease Virus Populations are Quasispecies", *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 176, 33-47.11.
- Domingo, E., Mateu, M. G., Escarmís, C., Martínez-Salas, E., Andreu, D., Giralt, E., Verdaguier, N. ve Fita, I., (1996), "Molecular Evolution of Phthoviruses", *Virus Genes* 11, 197-207.
- Ellard, F. M., Drew, J., Blakemore, W.E., Stuart, D.I., ve King, A.M., (1999), "Evidence for The Role of His-142 of Protein 1C in The Acid-Induced Disassembly of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsids", *J. Gen. Virol.* 80: 1911–1918.
- Engvall, E., (1980), "Enzyme Immunassay ELISA and EMIT, *Methods in Enzymology*", Academic Press, New York, Vol 70, p.201-209, p.419-439.
- Erganiş, O., İstanbuloğlu, E., (1993), "İmmünoloji", Mimoza Yayınları, İstanbul.
- Filenko, A., Demchenko, M., Mustafaeva, Z., Osada, Y., Mustafaev, M., (2001), "Fluorescence Study of Cu<sup>2+</sup>-Induced Interaction between Albumin and Anionic Polyelectrolytes", *Biomacromolecules*, 2 (1), 270-277.
- Fischer, D., Rood, D., Barrette, R.W., Zuwallack, A., Kramer, E., Brown, F., Silbart, L.K., (2003), "Intranasal Immunization of Guinea Pigs with and Immunodominant Foot-and-Mouth Disease Virus Peptide Conjugate Induces Mucosal and Humoral Antibodies and Protection Against Challenge", *J. Virol.* 77, 7486-7491.
- Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J. ve Brown, F., (1989), "The Cell Attachment Site on Foot-and-Mouth Disease Virus Includes The Amino Acid Sequence RGD (Arginine- Glycine-Aspartic Acid)", *J. Gen. Virol.* 70, 625-637.
- Friedli, G.L., (1996), "Interaction Of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other Food Proteins And Metals", A Thesis Presented For The Award Of Doctor Of Philosophy To The University Of Surrey.
- Ghetie, V., Clive, S., Slaughtert, H., Thomas, W., Jonathan, W., Ellen, S.V., (1991), "CD4 peptide-protein conjugates, but not recombinant human CD4, bind to recombinant gp 120 from the human immunodeficiency virus in the presence of serum from AIDS patients" *Proc. Nati. Acad. Sci., Immunology*, 88:5690-5693.
- Gottfried, B., Bitterlich, G.B., Looney, D.J. ve Altman, A., (1995), "Copyright American Society for Microbiology Immunogenic Targeting of Recombinant Peptide Vaccines to Human Antigen-Presenting Cells by Chimeric Anti-HLA-DR and Anti-Surface Immunoglobulin D Antibody Fab Fragments In Vitro" *Journal of Virology*, 2357–2365 Vol. 69, No. 4.
- Gregoriadis, G. Leathwood, P.D., Ryman, B.E., (1971), "Enzyme entrapment in liposomes", *FEBS Lett.*, 14(2):95-99.
- Grubman, M.J., Zellner, M. ve Wagner, J., (1987), "Antigenic Comparison of The Polypeptides of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotypes and Other Picornaviruses", *Virology* 158, 133-140.
- Gülmezoğlu, E., Ergüven, S., (1994) *İmmünoloji*, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara.

- Güney O., Saraç A.S., Mustafaev M.I., (1997), "Fluorescence and turbidimetry study of complexation of human serum albumin with polycations", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 12 (3): 231-244.
- Gürhan, Deliloğlu S.I., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N., Celik, N., (2002), "Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine", In: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix 41, pp.349-357, FAO.
- Haro, I., Gómara, M.J., (2000), "Different Approaches to Potentiate the Immune Response Induced by a 12-Mer Synthetic Peptide", *Current Protein and Peptide Science*, 1, 125-137.
- Haydon, D., Lea, S., Fry, L., Knowles, N., Samuel, A.R., Stuart, D. ve Woolhouse, M.E., (1998), "Characterizing Sequence Variation in The VP1 Capsid Proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus (Serotype 0) with Respect to Virion Structure", *J. Mol. Evol.* 46: 465–475.
- He, Y., Bowman, V.D., Mueller, S., Bator, C.M., Bella, J., Peng, X., Baker, T.S., Wimmer, E., Kuhn, R.J. ve Rossmann, M.G., (2000), "Interaction of The Poliovirus Receptor with Poliovirus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:79–84.
- Heath. T.D., Edwards, D.C., ve Ryman, B.E., (1976), "The adjuvant properties of liposomes", *Biochem. Soc. Trans.*, 4(1):129-33.
- Hermanson, G.T., (1996), "Bioconjugate Techniques", Academic Pres, California.
- Hewat, E.A., Verdaguer, N., Fita, I., Blakemore, W., Brookes, S., King, A., Newman, J., Domingo, E., Mateu, M.G. ve Stuart, D.I., (1997), 'Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop', *EMBO J.* 16, 1492-1500.
- Hinds, M.G., Welsh, J.H., Biennoud, D.M., Fisher, J., Glennie, M.G., Richards, N.J.R., Turner, D.L., Robinson, J.A., (1991), "Synthesis, conformational properties and antibody recognition of peptides containing  $\beta$ -turn mimetics based on  $\alpha$ -alkyl proline derivatives", *J. Med. Chem.* 34:1777-1789.
- Hoffman, A.S., (2000), "Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations", *Clinical Chemistry.* 46:9 1478–1486
- Hogle, J.M., Chow, M. ve Filman. D.J., (1985), "Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution", *Science* 229:1358–1365.
- Hynes, R.O., (1992), "Integrins: Versatility, Modulation and Signaling in Cell Adhesion", *Cell* 69, 11-25.
- Ibarz, P.J., Cathcart, K., Korontsvit, T., vd. (2000), "Vaccination of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia with Bcr-Abl Oncogene Breakpoint Fusion Peptides Generates Specific Immune Responses", *Blood* 95:1781-1787.
- Jackson, T., Ellard, F.M, Abu-Ghazaleh, R., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W.I. ve King, A.M.Q., (1996), "Efficient Infection of Cells In Culture By Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Requires Binding to Cell Surface Heparan Sulfate", *J. Virol.* 70, 5282- 5287.
- Jacobs, C.O., Sela, M., Arnon R., (1983), "Antibodies Against Synthetic Peptides of The B Subunit of Cholera Toxin: Crossreaction and Neutralization of The Toxin", *Proc Natl. Sci* 80: 7611-7619.

- Kabanov, V. A., (2004), "From Synthetic Polyelectrolytes to Polymersubunit Vaccines", *Pure Appl. Chem.*, 76 ( 9): 1659–1677.
- Kagan, E., Ragupathi, G., Yi, S.S., Reis, C.A., Gildersleeve, J., Kahne, D., Clausen, H., Danishefsky, S.J., Livingston, P.O., (2005), "Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn", *Cancer Immunology Immunother.*, 54:424-430.
- Kappe, C.O., (2004), "Controlled Microwave Heating in Modern Organic", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43: 6250 –6284.
- Kappe, C.O., Dallinger D., (2006), "The Impact of Microwave Synthesis on Drug Discovery", *Nature Reviews*, 5:51-63.
- Kılıçturgay, K., (1994), 'İmmünolojiye Giriş', Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı, Bursa.
- Kitson, J.D., McCahon, D. ve Belsham, G. J., (1990), "Sequence Analysis of Monoclonal Antibody Resistant Mutants of Type 0 Foot-and-Mouth Disease Virus: Evidence for The Involvement of The Three Surface Exposed Capsid Proteins in Four Antigenic Sites", *Virology* 179:26–34.
- Kolatkar, P.R., Bella, J., Olson, N.H., Bator, C.M., Baker, T.S. ve Rossmann, M.G., (1999) "Structural Studies of Two Rhinovirus Serotypes Complexed with Fragments of Their Cellular Receptor", *EMBO J.* 18:6249–6259.
- Kosarev, E.L., Muranov, K.O., (2003), "Chromatography superresolution chromatography", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 502:764–767.
- Kumar, P., (1999), "Handbook of Microemulsion Science and Technology", Published by CRC Press Technology & Industrial Arts, 849 pages ISBN 0824719794.
- Langer, R., (1990), 'New methods of drug delivery', *Science*, 249: 1527-1533.
- Langer, R., Moses, M., (1991), 'Biocompatible controlled release polymers for delivery of polypeptides and growth factors', *J. Cell. Biochem.*, 45: 340-345.
- Laporte, J. ve Lenoir, G., (1973), "Structural Proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus", *J. Gen. Virol.* 20, 161-168. 18.
- Larhed, M., Hallberg, A., (2001), "Microwave-Assisted High Speed Chemistry: A New Technique in Drug Discovery", *Drug Discovery Today*, 6: 406–416.
- Latif, N., Bachhawat, K.B., (1984), "Liposomes in immunology", *J. Biosci.*, 6:491–502.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J. vd. (1994), "The Structure and Antigenicity of A Type C Foot-and-Mouth Disease Virus", *Structure* 2:123–139.
- Lee, W.Y., Schon, H., (1977), 'Abrogation of reagenic antibodies with modified allergens', *Nature*, 267: 618-619.
- Liftshitz, R., Gitler, C., ve Mozes, E., (1981), "Liposomes as immunological adjuvants in eliciting antibodies specific to the synthetic polypeptide poly(LTyr, LGlu)-poly(DLAla)--(LLys) with high frequency of site-associated idiotypic determinants", *Eur. J. Immunol.*, 11(5):398-404 .
- Liu F.T., Zinnecker M., Hamaoka T., Katz D.H., (1979), "New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates", *Biochemistry*, 20;18(4):690–693.

- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., Rowlands, D. J., Stuart, D. ve Fry, E., (1993), "Structure of A Major Immunogenic Site on Foot-and-Mouth Disease Virus", *Nature* 362, 566-568.
- Luo, M., Vriend, G., Kamer, G., Minor, I., Arnold, E., Rossmann, M.G., Boege, U., Scraba, D.G., Duke, G.M. ve Palmenberg, A.C, (1987), "The Atomic Structure of Mengo Virus at 3.0 A Resolution", *Science* 235:182-191.
- Marquardt, O., Rahman, M.M. ve Freiberg, B., (2000), "Genetic and Antigenic Variance of Foot-and-Mouth Disease Virus Type Asia1", *Arch Virol.* 145:149-157.
- Martínez, M.A., Verdaguer, N., Mateu, M.G. ve Domingo, E., (1997), "Evolution Subverting Essentiality: Dispensability of The Cell Attachment Arg-Gly-Asp Motif in Multiply Passaged Foot-and-Mouth Disease Virus", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6798-6802.
- Mason, P.W., Baxt, B., Brown, F., Harber, J., Murdin, A. ve Wimmer, E., (1993), "Antibodycomplexed Foot-and-Mouth Disease Virus, But Not Poliovirus, Can Infect Normally Insusceptible Cells Via The Fc Receptor", *Virology* 192, 568-577.
- Mason, P.W., Rieder, E. and Baxt, B., (1994), "RGD Sequence of Foot-and-Mouth Disease Virus is Essential for Infecting Cells Via The Natural Receptor But Can Be Bypassed By An Antibody-Dependent Enhancement Pathway", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1932-1936.
- Mateu, M.G., Camarero, J.A., Giralt, E., Andreu, D. ve Domingo, E., (1995), "Direct Evaluation of The Immunodominance of A Major Antigenic Site of Foot-and-Mouth Disease Virus in A Natural Host", *Virology* 206:298-306.
- Mateu, M.G., Valero, M.L., Andreu, D. and Domingo, E., (1996), 'Systematic placement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition', *J. Biol. Chem.* 271, 12814-12819.
- McCullough, K.C., Crowther, J.R., Carpenter, W.C., Brocchi, E., Capucci, L., De Simone, F., Xie, Q. ve McCahon, D., (1987), "Epitopes on Foot-and-Mouth Disease Virus Particles. I. Topology. *Virology* 157:516-525.
- Mohammed, R., Perrie, Y., (2005), "Liposome Solutions For Poorly Soluble Drugs", *Drug Delivery Report Autumn/Winter*.
- Morris, W., Steinhof, M.S., Russel, K., (1994), Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine*, 12 1:5-11.
- Mosmann, T., (1983), "Rapid Calorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay", *J. Immunol Methods* 48:589-601.
- Muckelbauer, J. K., Kremer, M., Minor, I., Iana, G., Dutko, F.J., Groarke, J., Pevear, D.C. ve Rossmann, M.G., (1995), "The Structure of Coxsackievirus B3 At 3.5 A Resolution", *Structure* 3:653-667.
- Mustafaev M., (2004), "Functionally Biopolymer Systems" *Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences* ISSN: 1304-7191, Printed in Yildiz Technical University, 34349, İstanbul.
- Mustafaev M., Çırakoglu B., Saraç S., Öztürk S., Yücel F, Bermek E., (1996f), "Soluble and insoluble ternary complexes of serum proteins with polyanions in the presence of Cu<sup>2+</sup> in water", *Journal of Applied Polymer Science*, 62 (1): 99-109.
- Mustafaev M., Osada Y., Matsukata M., Başalp A., Çırakoglu B., Bermek E., (1996d), "New amphiphilic immunogens by poly(N-isopropylacrylamide)-modified bovine serum albumin", *Polymer Gels and Networks*, 4 (4): 363-372.

- Mustafaev M., Yucel F., Çirakoglu B., Bermek E., (1996a), "Immune response to progesterone involved in  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated polyanion-protein complex-antigen specificity and affinity of hybridoma clones", *Immunology Letters*, 52 (2-3): 63-68 .
- Mustafaev M.I., (1996g), "Polyelectrolytes in immunology: fundamentals and perspectives", *Turkish Journal of Chemistry*, 20 (2): 126-138.
- Mustafaev M.I., Kabanov V.A., (1980), "Mechanism of heparin binding with polycations in the presence of serum-proteins" *Farmakologiya i Toksikologiya*, 43 (4): 395-399.
- Mustafaev M.I., Osada Y., Başalp A., Mustafaeva Z., Çirakoğlu B., Bermek E., (1998), "New temperature-responsive immunogens by poly (N-isopropyl-acrylamide)-modified bovine serum albumin", *Recent Advances in Peptide and Protein Delivery*, Editions de Sante, 145-162.
- Mustafaev M.I., Romanova R.Y., Norimov A.Sh., Filatova E.D., (1990), "On the role of chemical nature of the polymeric carrier in the immunogenic and protective activities of polyelectrolyte complexes of BGG Mycobacteria cell envelope antigens in a model of tuberculosis infection". *Immunologiya (Immunology)*, 6, 35-40.
- Mustafaev M.I., Saraç A.S., (1996h), "Polyelectrolyte complexes (in immunology)", In: Solomone J., Editor, *The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Application*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 5771-7.
- Mustafaev M.I., Saraç A.S., Erkol A.Y., (1996c), "Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on stability and composition of water soluble ternary polyacrylic acid- $\text{Cu}^{2+}$ -protein complexes against radiation damage" *Polymer Bulletin*, 36 (5): 623-627.
- Mustafaev M.I., Yucel F., Ozturk S., Çirakoglu B., Bermek E., (1996e), " $\text{Cu}^{2+}$ -mediated complex formation between polyacrylic acid (PAA) and bovine serum albumin", *Journal of Immunological Methods*, 197 (1-2): 31-37.
- Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Ergen, E., (2002), "Novel-Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 17:251-269.
- Mustafaev, M.I., (1996a) "Biyopolimerler" (Biopolymers), TUBİTAK, Gebze/Kocaeli, Türkiye.
- Mustafaev, M.I., Norimov; A.Sh., (1990), "Polymer-Metal Complexes of Protein Antigens-A New Highly Effective Immunogens". *Biomed.Sci.* 1(3), :274-278.
- Mustafaev, M.I., Osada, Y., Endo, T., (1998), "Advanced Biopolymer Systems", First Japanese-Turkish Workshop Materials. TUBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, pp: 1-76.
- Nargi, F., Krame, E., Mezencio, J., Zamparo, J., Whetstone, C., Van Regenmortel, M.H., Briand, J.P., Muller, S., Broen, F., (1999), "Protection of Swine from Foot-and-Mouth Disease with One Dose of An All-D Retro Peptide ", *Vaccine*. 17, 2888-2893.
- Novella, I.S., Borrego, B., Mateu, M.G., Domingo, E., Giralt, E. ve Andreu, D., (1993), "Use of Substituted Tandem-Repeated Peptides to Probe The Relevance of The Highly Conserved RGD Tripeptide in The Immune Response Against Foot-and-Mouth Disease Virus", *FEBS Lett.* 330, 253-259.
- Ogata, N., Kim, S.W., Feijen, J., Okano T., (Eds.), (1996), "Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems, Springer-Verlag, Tokyo, 381.
- Oulridge, E.J., Barnett, P.V., Parry, N.R., Syred, A., Head, M. ve Rweyemamu, M.M., (1984), "Demonstration of Neutralizing and Non-neutralizing Epitopes on The Trypsin-Sensitive Site of Foot-and-Mouth Disease Virus", *J. Gen. Virol.* 65, 203-207.

- Özbal, Y., (2000), “Temel İmmünoloji”, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Tic. Ltd. Şti.
- Özeroglu C., Guney O., Saraç A.S., Mustafaev M.I., (1996b), “The polymerization of acrylamide initiated with Ce(IV) and KMNO<sub>4</sub> redox systems in the presence of glycine”, *Journal of Applied Polymer Science*, 60 (5): 759-765.
- Özeroglu C., Namazova N., Mustafaev M.I., Saraç A.S., (1996a), “The complex formation between polyacrylamide containing glycine end groups and bovine serum albumin in the presence of copper (ii) in neutral aqueous media”, *Colloid and Polymer Science*, 274 (5): 418-427.
- Özeroğlu C., Guney O., Mustafaev M.I., (1997), “Oxidative polymerization of acrylamide in the presence of L-threonine”, *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 249: 1-9.
- Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D. ve Stuart, D., (1990), “Structural and Serological Evidence for A Novel Mechanism of Antigenic Variation in Foot-and-Mouth Disease Virus”, *Nature* 347, 569-572.
- Petrov, R.V., Khaitov, R.M., Zhdanovt, V.M., Sinyakov, M.S., Norimov, A.Sh., Nekrasov, A.V., Podchernyaev, R.Y., Kharitonenkovi, I.G., ve Shchipanovat, M.V., (1985) “Influenza Virus Antigens Conjugated with A Synthetic Polyelectrolyte: A Novel Model of Vaccines”, *Vaccine*, Vol. 3, 393.
- Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov; A.Sh., (1992), “Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes”, Harwood Acad. publ. GmbH, UK.
- Raphael, L. Tom, B.H., (1984), “Liposome facilitated xenogeneic approach for studying human colon cancer immunity: carrier and adjuvant effect of liposomes”, *Clin. Exp. Immunol.*, 55(1):1-13.
- Richman, S.J., (1989), “Constructions of Carrier-Free Synthetic Peptide Antigens Capable of Stimulating Biotable Antibody Responses to A 75k Da Malarial Parasite Protein. In *Synthetic Peptides: Approaches To Biological Problems*”, J.P. Tam and E.T. Kaiser Eds Alan. R. Liss, Inc., New York, 181-196.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., (2001) “Immunology” Mosby sixth edition.
- Rooijen, V.N., Nieuwmegen, V.R., (1980), “Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own”, *Immunol Commun.* 9(3):243–256.
- Rossmann, M.G., (1972), “The Molecular Replacement Method”, Gordon & Breach, New York.
- Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Griffith, J.P., Hecht, H.J., Johnson, J.E., Kamer G., Luo, M., Mosser, A.G., vd. (1985), “Structure of A Human Common Cold Virus and Functional Relationship to Other Picornaviruses”, *Nature* 317:145–153.
- Ruiz-Jarabo, C.M., Sevilla, N., Dávila, M., Gómez-Mariano, G., Baranowski, E. ve Domingo, E., (1999), “Antigenic Properties and Population Stability of A Foot-and-Mouth Disease Virus with an Altered Arg-Gly-Asp Receptor Recognition Motif”, *J. Gen. Virol.* 80, 1899–1909.
- Sá-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. ve Mason, P.W., (1997), “Tissue Culture Adaptation of Foot-and-Mouth Disease Virus Selects Viruses That Bind to Heparin and are Attenuated in Cattle”, *J. Virol.* 71, 5115–5123.

- Saraç A.S., Özeroğlu C., Mustafaev M.I., (1995), "The Ternary Complexes of Bovine Serum-Albumin and Polyacrylamide Derivatives in The Presence of Copper Ions in Neutral Water", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10 (2): 121-134 Apr.
- Saraç A.S., Sönmez G., Ustamehmetoğlu B., Mustafaev M.I., (1997b), "Water-soluble polypyrroles by matrix polymerization: interpolymer complexes", *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry*, 35 (7): 1255-1263.
- Saraç A.S., Yavuz Ö., Sezer E., Mustafaev M.I., (1997a), "Spectrophotometric study of Cu<sup>2+</sup>-mediated complex formation of bovine serum albumin with copolymers of acrylic acid and vinyl pyrrolidone", *Polymer News*, 22, 258-261.
- Sauer, M.J., Foulkes, J.A., Worsfold, A., Morris, B.A., (1986), "Use of Progesterone 11-glucuronide-alkaline Phosphatase Conjugate in A Sensitive Microtitre-Plate Enzymeimmunoassay of Progesterone in Milk and Its Application to Pregnancy Testing in Dairy Cattle", *J. Reprod. Fert.*, 76, 375-391.
- Schild, H.G., (1992), "Poly(n-isopropylacrilamide): Experiment, Theory and applications", *Prug Polym Sci* 17:163-249.
- Sevilla, N. ve Domingo, E., (1996) "Evolution of A Persistent Aphthovirus In Cytolytic Infections: Partial Reversion of Phenotypic Traits Accompanied By Genetic Diversification", *J. Virol.* 70, 6617-6624.
- Sevilla, N., Dávila, M., Gómez-Mariano, G., Baranowski, E. and Domingo, E., (1999), "Antigenic properties and population stability of a foot-and-mouth disease virus with an altered Arg-Gly-Asp receptor recognition motif", *J. Gen. Virol.* 80, 1899-1909.
- Sheehan, J.C., Cruickshank, P.A., Boshart, G.L., (1961), "A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides", *J. Org. Chem.* 26,2525-2528
- Sheehan, J.C., Preston, J., Cruickshank, P.A., (1965), "A rapid synthesis of oligonucleotide derivatives without isolation of intermediates", *J. Am. Chem. Soc.* 87,2492-2493
- Shek, P.N., Heath, T.D., (1983), "LatifImmune response mediated by liposome-associated protein antigens. III. Immunogenicity of bovine serum albumin covalently coupled to vesicle surface", *Immunology*, 50(1):101-107.
- Smith, J.A., (1989), "Synthetic peptides: Tools for Elucidating Mechanism of Protein Antigen Processing and Presentation", In *Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems*, J.P. Tom and E.T. Kaiser, eds. Alan R. Liss, Inc., New York, 31-42.
- Smith, J.A., Hunnel J.G.R., Leach, S.J., (1977), "A Novel Method for Delineating Antigenic Determinants: Peptide Synthesis and Radioimmunoassay Using The Same Solid Support", *Immunochemistry* 14:565-572.
- Strohmaier, K., Franze, R. ve Adam, K.H., (1982), "Location and Characterization of The Antigenic Portion of The Foot-and-Mouth Disease Virus Immunizing Protein", *J. Gen. Virol.* 59, 295-306.
- Thomas, A.A., Woortmeijer, R. J., Puijk, W. ve Barteling, S.J., (1988), "Antigenic Sites On Foot-and-Mouth Disease Virus Type A10", *J. Virol.* 62: 2782-2789.
- Tsurata T., (1996), "Contemporary topics in Polymeric Materials for Medical Applications", *Polymer Science*, Vol. 126, 21-47.
- Tyrrell, D.A., Heath, T.D., Colley, C.M., Ryman, B.E., (1976), "New aspects of liposomes", *Biochim. Biophys. Acta*, 14:457(3-4):259-302.

- Uelzmann H. (1958), "Copolymers of Acrylic acid and N-Vinylpyrrolidone-2", *J. of Polymer Science*, 33:377-379.
- Valdez C.D., Le Hue´rou J-Y., Gindre, M., Urbach, W., Waks, M., (1993), 'Hydration and Protein Folding in Water and in Reverse Micelles: Compressibility and Volume', *Biophysical Journal*, 80: 2751-2760.
- van Driel, W.J, Rensing, M., Kenter, G.G., vd. (1999), "Vaccination with HPV16 Peptides of Patients with Advanced Cervical Carcinoma: Clinical Evaluation of A Phase I-II Trial", *Eur. J. Cancer* 35:946-952.
- Verdaguer, N., Mateu, M. G., Bravo, J., Domingo, E. ve Fita, I., (1996), "Induced Pocket to Accomodate The Cell Attachment Site Arg-Gly-Asp Motif in A Neutralizing Antibody Against Foot-and Mouth Disease Virus", *J. Mol. Biol.* 256, 364-376.
- Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E. ve Fita, I., (1995), "Structure of The Major Antigenic Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus Complexed with A Neutralizing Antibody: Direct Involvement of The Arg-Gly-Asp Motif in The Interaction", *EMBO J.* 14, 1690-1696.
- Villen, J., Oliveira, E., Nunez, J.I., Molina, N., Sobrino, F., Andreu, D., (2004), "Towards A Multi-Site Synthetic Vaccine To Foot-and-Mouth Disease: Addition of Discontinuous Site Peptide Mimic Increases The Neutralization Response In Immunized Animals". *Vaccine* 22:3523- 3529.
- Volkov A. G., (2003), 'Interfacial Catalysis By Contributor', Aleksandr Jurevič Volkov Published, CRC Press Science, ISBN 0824708393, 680.
- Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., vd., (1999), "Phase I Trial of a MART-1 Peptide Vaccine with Incomplete Freund's Adjuvant for Resected High-Risk Melanoma", *Clin. Cancer Res.* 5:2756-2765.
- Williams, A., Ibrahim, I.A., (1981), "A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)", *J. Am. Chem. Soc.* 103,7090-7095
- Wong, S.S., (1993), "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", London: CRC Press Inc.,
- Xiao, C., Bator, C.M., Bowman, V.D., Rieder, E. He, Y., Hebert, B., Bella, J., Baker, T.S., Wimmer, E., Kuhn, R.J. ve Rossmann, M.G., (2001), "Interaction of Coxsackievirus A21 with its Cellular Receptor", *ICAM-1. J. Virol.* 75: 2444-2451.
- Xie, Q.C., McCahon, D., Crowther, J.R., Belsham, G.J., ve McCullough, K.C., (1987), "Neutralization of Foot-and-Mouth Disease Virus can be Mediated Through Any of At Least Three Separate Antigenic Sites", *J. Gen. Virol.* 68: 1637-1647.
- Yamada, H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K., Motomura, M., (1981), "Selective modification of aspartic acide-101 in lysozyme by carbodiimide reaction", *Biochemistry* 20, 4836-4842.
- Yeğen, O., (1990), *Temel İmmünoloji ve İmmün Eksikli Hastalıkları*, Palme Tıp Kitabevi, Ankara.
- Yücel F., Çırakoğlu, B., (1999), "Production of Monoclonal Antibodies Specific for Progesterone", *Tr. J. of Biology* 23 393-399.
- Yücel F., Çırakoğlu, B., Mustafaeva, Z., Mustafaev M., (2001), "Immune Response to Progesterone Immobilized on Cu<sup>2+</sup>- Induced Amphifilic Polyelectrolyte-Protein Complex:

Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones”, *Hybridoma*, 20 (1).

Zuccola, H.J., Racaniello, V.R., Hogle, J.M. ve Steven, A.C., (2000), “Three-Dimensional Structure of Poliovirus Receptor Bound to Poliovirus”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:73–78.

### **Elektronik Kaynaklar**

1. <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/pag>
2. <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/aviruses/immune-system-part.html>
3. <http://www.hekimce.com/index.php?kiid=606>
4. <http://www.vghd.org.tr/bilgibankasi/sap.htm>
5. <http://www.bornova.vet.gov.tr/sap.htm>
6. [http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/Aphthovirus/maps/fmd\\_maps.htm](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/Aphthovirus/maps/fmd_maps.htm)
7. <http://www.merso.org/sap.htm>
8. <http://www.rscb.org/pdb/>
9. [http://www.sap.gov.tr/sap\\_hastaligi\\_teshis.htm](http://www.sap.gov.tr/sap_hastaligi_teshis.htm)
10. <http://www.pbcpeptide.com/Conjugation.htm>
11. <http://www.lerner.ccf.org/services/molecbiotech/peptide.php>
12. <http://www.worthington-biochem.com/OA/cat.html>
13. <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/8232/8232vaccines.html>
14. <http://www.sartorius.com/index.php?id=2768>
15. [http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060\\_equipment/020\\_chromatography/020\\_sec/index.html](http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060_equipment/020_chromatography/020_sec/index.html)
16. [http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec\\_chromatography.jpg](http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec_chromatography.jpg)
17. <http://www.modares.ac.ir/elearning/mnaderi/GeneticEngineeringcourseII/Multimedia/>
18. ([http://plan9.dpt.gov.tr/oik23\\_gidaguvnligi/gidaguv.pdf](http://plan9.dpt.gov.tr/oik23_gidaguvnligi/gidaguv.pdf))

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	02.06.1976	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1989-1993	Şehremini Lisesi
Lisans	1993-1997	İstanbul Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	1997-1999	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora	2001-	Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı
Çalıştığı Kurumlar:		
Araştırma Görevlisi	1999-2002	Kadir Has Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi	2003-	Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü