

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEPTİD PROTEİN KOVALENT KONJUGASYONU

Kimyager Serap ACAR

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
ÖZET	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Peptid ve Proteinler	3
2.1.1 Proteinlerin Birincil (Primer) Yapıları.....	4
2.1.2 Proteinlerin İkincil (Sekonder) Yapıları	4
2.1.3 Proteinlerin Üçüncül (Tersiyer) Yapıları.....	5
2.1.4 Proteinlerin Dördüncül (Kuarterner) Yapıları.....	7
2.1.5 Proteinlerin Yapısındaki Kovalent Olmayan Bağlar	8
2.1.5.1 Hidrojen Bağları.....	8
2.1.5.2 Hidrofobik Kuvvetler.....	8
2.1.5.3 Elektrostatik Kuvvetler	9
2.1.5.4 Van der Waals Kuvvetleri.....	9
3. PROTEİN ÖZELLİKTEKİ TAŞIYICI MOLEKÜLLER	10
3.1 BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini.....	10
3.1.1 BSA'nın Fiziko-Kimyasal Özellikleri.....	11
3.1.2 BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar	14
3.2 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) Proteini.....	16
3.3 OVA (Ovalbumin) Proteini.....	17
4. DİĞER TAŞIYICI MOLEKÜLLER.....	18
4.1 Liposom Özellikteki Taşıyıcı Moleküller.....	18
4.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller	20
5. ÇAPRAZ BAĞLAMA REAKTİFLERİ.....	24
5.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	25
5.1.1 Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	27
5.1.1.1 Homobifonksiyonel N-Hidroksisüksinimid (NHS) Esterleri.....	27
5.1.1.2 Homobifonksiyonel İmidosterler	32
5.1.1.3 Homobifonksiyonel Dialdehidler	34
5.1.1.4 Homobifonksiyonel Bisizosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar.....	35
5.1.1.5 Homobifonksiyonel Diflorobenzen Türevleri.....	35
5.1.1.6 Amino Gruplarına Yönelen Diğer Çapraz Bağlayıcılar	35
5.1.2 Sülfidril Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	36
5.1.2.1 Bismaleimidler	36

5.1.2.2	Disülfid Oluşturan Reaktifler	36
5.1.2.3	Dialkilhalojenürler.....	37
5.1.3	Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri....	38
5.2	Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar	39
5.2.1	Amino ve Süldifril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	41
5.2.2	Karbonil ve Sülfidril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	45
5.2.3	Amino Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri.....	46
5.2.4	Sülfidril Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri.....	47
5.2.5	Karbonil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	48
5.2.6	Karboksil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	48
5.2.7	Arginin Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri.....	49
5.3	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar.....	50
5.3.1	Karbodiimidler	50
5.3.1.1	EDC	51
5.3.1.2	EDC Plus Sülfon-NHS	56
5.3.1.3	CMC	57
5.3.1.4	DCC	57
5.3.1.5	DIC	57
5.3.2	N,N-Karbonildiimidazol	58
5.4	Konjugatların Saflaştırılması	59
5.4.1	Diyaliz.....	59
5.4.2	Moleküler Eleme Kromatografisi.....	60
5.4.3	Gaz Basıncı Filtrasyon.....	60
5.4.4	Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri).....	60
6.	KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	61
6.1	UV-VIS Spektroskopisi	61
6.2	Moleküler Eleme Kromatografisi.....	62
6.3	Fluoresans Spektroskopisi	63
6.4	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	65
7.	DENEYSEL KISIM	67
7.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	67
7.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	67
7.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler	68
7.2	Şap Hastalığı 170-188 Dizilimli Sentetik Peptid Sentezi	69
7.3	Şap Hastalığı 135-161 Dizilimli Sentetik Peptid Sentezi	69
7.4	Peptid/BSA Konjugatları	69
7.4.1	Konjugasyonda Kullanılan Çözeltiler	69
7.4.2	Hesaplamalar.....	70
7.5	170-188 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı.....	73
7.5.1	1. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	73
7.5.2	2. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	74

7.5.3	3. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	75
7.5.4	4. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	76
7.5.5	5. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	77
7.5.6	6. Yönteme Göre Komplekslerin Hazırlanışı.....	77
7.6	135-161 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı.....	78
7.6.1	4. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	78
7.6.2	7. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı	79
7.7	UV-VIS Spektrofotometre Ölçümleri	80
7.8	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri	80
7.9	4 Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografi (Viscotek) Analizleri	80
7.10	Fluoresans Spektrofotometre Ölçümleri.....	80
7.11	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	80
8.	DENEY SONUÇLARI	81
8.1	170-188 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarına Ait UV Ölçümü.....	81
8.2	170-188 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin HPLC-Viscotek ve Fluoresans Sonuçları	82
8.3	135-161 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin HPLC-Viscotek ve Fluoresans Sonuçları	105
8.4	135-161 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin Zetasizer Sonuçları.....	120
9.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	129
10.	KAYNAKLAR.....	134
	ÖZGEÇMİŞ.....	139

SİMGE LİSTESİ

g	gram
M	Molar
mg	miligram
ml	mililitre
n	mol
°C	Santigrat derece
μl	mikrolitre
mV	milivolt

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovin serum albumin
HCl	Hidroklorik Asit
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN_3	Sodyum azid
RI	Kırılma İndisi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet
Ag	Antijen
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester
NHS	N-Hidroksisüksinimid ester
OVA	Ovalbumin

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Amid (peptid) bağı genel gösterimi 3
Şekil 2.2	Amid (peptid) bağının kısmen kazandığı çift bağ karakteri 3
Şekil 2.3	Peptid ve proteinlerin primer yapısının genel gösterimi 4
Şekil 2.4	α heliks yapısının genel görünümü 5
Şekil 2.5	β katlanmış yapının genel görünümü 5
Şekil 2.6	Peptid ve proteinlerin üçüncül yapılarının oluşumda etkili olan disülfid bağının oluşumu ve disülfid bağı sonucu meydana gelen katlanma 6
Şekil 2.7	Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının toplu gösterimi 6
Şekil 2.8	Globular (a) ve Fibröz (b) proteinlerin genel görünümleri 7
Şekil 2.9	Hidrojen bağı oluşumu 8
Şekil 2.10	Hidrofobik etkileşimler ve bunun sonucunda su moleküllerinin itilmesi 8
Şekil 2.11	Elektrostatik kuvvetler sonucu oluşan etkileşimler 9
Şekil 2.12	Van der Waals kuvvetleri sonucu oluşan etkileşimler 9
Şekil 3.1	Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat 11
Şekil 3.2	BSA molekülünün domain ve subdomainleri 12
Şekil 3.3	Bovine serum albuminin bazik yan zincirlerin mavi, asidik yan zincirlerin kırmızı ve nötral yan zincirlerin sarı ile gösterildiği yük dağılımı modeli. Önden (a), arkadan (b), soldan (c) ve sağdan (d) görünüm 12
Şekil 3.4	Proteinlerin izoelektrik noktalarından düşük pH'da, izoelektrik noktalarından yüksek pH'da ve izoelektrik noktalarına eşit pH'da gösterdikleri yük dağılımları 13
Şekil 3.5	BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi 13
Şekil 3.6	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, kromatogramda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır 14
Şekil 3.7	Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır 15
Şekil 4.1	(a) Tek katmanlı liposomun sulu çekirdek kısmı ve fosfolipid ikili tabakasının yapısı (b) Polar ve apolar ilaç maddelerinin aynı anda liposomlarla taşınabilmesi 18
Şekil 4.2	(a) Suda çözünebilir sentetik peptidler liposomlara direkt olarak hapsedilebilir, (b, c) Sentetik peptidler liposomlara kovalent olarak bağlanabilir 20
Şekil 4.3	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler 21
Şekil 4.4	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler 22
Şekil 4.5	Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi .. 23
Şekil 4.6	Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi 23
Şekil 5.1	Makromoleküllerin İntermoleküler ve İntamoleküler olarak bağlanması 24
Şekil 5.2	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi 25
Şekil 5.3	NHS molekülünden NHS ester oluşumu 27
Şekil 5.4	Sülfo NHS ester molekülü 27
Şekil 5.5	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan N-Hidroksisüksinimid esterleri 31
Şekil 5.6	NHS ester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması 31
Şekil 5.7	İmidoester molekülü 32
Şekil 5.8	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan İmidoester türevleri 33
Şekil 5.9	İmidoester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması 33
Şekil 5.10	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan dialdehit türevleri 34

Şekil 5.11	Formaldehid kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması	34
Şekil 5.12	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan İzosiyonat ve İzotiyosiyonat.....	35
Şekil 5.13	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Diflorobenzen türevleri	35
Şekil 5.14	Amino grubuna yönelen diğer Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar	35
Şekil 5.15	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan Bismaleimid türevleri	36
Şekil 5.16	Disülfid bağı üzerinden konjugat oluşturan moleküller	37
Şekil 5.18	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar	38
Şekil 5.19	Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi	39
Şekil 5.20	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan amino ve sülfidril grubuna yönelen heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar.....	43
Şekil 5.21	MBS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması	44
Şekil 5.22	Karbonil ve sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar	45
Şekil 5.23	Amino grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren çapraz bağlayıcılar.....	46
Şekil 5.24	Sülfidril grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren çapraz bağlayıcılar.....	47
Şekil 5.25	Karbonil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren p-Azidobenzoil hidrazid	48
Şekil 5.26	Karboksil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren 4-(p-Azidosalisilamido) bütülin	48
Şekil 5.27	Arginin grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren p-Azidofenil glioksal	49
Şekil 5.28	pH=4,7'de oluşturulan (♦) peptid-BSA konjugatı ve (♦) Fiziki karışımın Saphadex G-25 kolon fraksiyonları	52
Şekil 5.29	pH=7,3'de oluşturulan (♦) Peptid-BSA konjugatı ve (♦) Fiziki karışımın Saphadex G-25 kolon fraksiyonları	52
Şekil 5.30	EDC kullanılarak sentezlenen Peptid-BSA konjugatı reaksiyon mekanizması	55
Şekil 5.31	EDC Plus Sülfö-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması	56
Şekil 5.32	Diyaliz işleminin şematik görünümü	59
Şekil 6.1	P ₀ şiddetindeki ışığın b cm kalınlığında c konsantrasyonundaki bir çözeltiliden geçerken şiddeti azalmaktadır.....	61
Şekil 6.2	Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram	63
Şekil 6.3	BSA molekülünde bulunan Triptofanların konumu.....	64
Şekil 6.4	Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli	66
Şekil 7.1	1.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	73
Şekil 7.2	2.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	74
Şekil 7.3	3.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	75
Şekil 7.4	4.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	76
Şekil 7.5	5.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	77
Şekil 7.6	6.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	77
Şekil 7.7	4.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	78
Şekil 7.8	7.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları	79
Şekil 8.1	(♦) Peptid-BSA n=3 konjugatının zamana bağlı UV absorpsiyonu (400 nm).	81
Şekil 8.2	(♦) NMI'a ait kromatogram ve (♦) pH 7'de hazırlanan konjugatlar için NMI pikinin geliş zamanı	82
Şekil 8.3	pH 5'de hazırlanmış (♦) Konjugat (1. Yöntem n _{pep} /n _{BSA} =5), (♦) Fiziki Karışım (n _{pep} /n _{BSA} =5), (♦) BSA ve (♦) Peptid'e ait HPLC kromatogramları	84

Şekil 8.4	pH 5’de hazırlanmış (◆) Konjugat (1. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları.....	84
Şekil 8.5	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları	86
Şekil 8.6	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları.....	86
Şekil 8.7	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları.....	87
Şekil 8.8	pH 7’de hazırlanan (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	87
Şekil 8.9	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları.....	88
Şekil 8.10	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları.....	88
Şekil 8.11	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları	90
Şekil 8.12	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları.....	90
Şekil 8.13	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları.....	91
Şekil 8.14	pH 7’de hazırlanan (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	91
Şekil 8.15	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları.....	92
Şekil 8.16	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları.....	92
Şekil 8.17	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları	94
Şekil 8.18	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları.....	94
Şekil 8.19	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları.....	95
Şekil 8.20	pH 7’de hazırlanan (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	95
Şekil 8.21	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları.....	96
Şekil 8.22	pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım	

	($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları.....	96
Şekil 8.23	pH 5'de (◆) 1. Yöntem'e göre ve pH 7'de (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntemlere göre hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait HPLC kromatogramları.....	98
Şekil 8.24	pH 5'de (◆) 1. Yöntem'e ve pH 7'de (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntemlere göre hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) pH = 5, (◆) pH=7, (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Fluoresans spektrumları.....	98
Şekil 8.25	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları	99
Şekil 8.26	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	99
Şekil 8.27	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları	100
Şekil 8.28	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları	100
Şekil 8.29	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait HPLC kromatogramları.....	102
Şekil 8.30	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Fluoresans spektrumları	102
Şekil 8.31	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları	103
Şekil 8.32	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	103
Şekil 8.33	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Işık saçılması detektörü kromatogramları.....	104
Şekil 8.34	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları.....	104
Şekil 8.35	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait HPLC kromatogramları	106
Şekil 8.36	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Fluoresans spektrumları.....	106
Şekil 8.37	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve (◆) Peptid'e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları.....	107
Şekil 8.38	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$,	

	(♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.....	107
Şekil 8.39	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Işık saçılması detektörü kromatogramları	108
Şekil 8.40	pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları	108
Şekil 8.41	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz HPLC kromatogramları.....	110
Şekil 8.42	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz Fluoresans spektrumları	110
Şekil 8.43	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz HPLC kromatogramları.....	112
Şekil 8.44	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz Fluoresans spektrumları	112
Şekil 8.45	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz HPLC kromatogramları.....	114
Şekil 8.46	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz Fluoresans spektrumları	114
Şekil 8.47	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz Fluoresans spektrumları	115
Şekil 8.48	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid, (◆) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (◆) Alt faz ve (◆) Üst faz Fluoresans spektrumları	116
Şekil 8.49	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) (♦) 4. Yöntem (NMI var), (◆) 7. Yöntem (NMI Yok), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (♦) Peptid'e ait HPLC kromatogramları	118
Şekil 8.50	pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) (♦) 4. Yöntem (NMI var), (◆) 7. Yöntem (NMI Yok), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (♦) Peptid'e ait Fluoresans spektrumları	118
Şekil 8.51	pH 7'de hazırlanmış (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA, (♦) Peptid ve 30 dak. aralıklar ile [(◆) 30. dak., (◆) 60. dak., (◆) 90. dak., (◆) 120 dak.] Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) için yapılan ölçümlere ait Fluoresans spektrumları.	119

Şekil 8.52	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=1$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri 121
Şekil 8.53	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=1$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri 121
Şekil 8.54	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=3$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri 123
Şekil 8.55	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=3$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri 123
Şekil 8.56	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=5$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri 125
Şekil 8.57	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{pep}/n_{BSA}=5$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri 125
Şekil 8.58	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve Konjugat (7. Yöntem) [(♦) $n_{pep}/n_{BSA}=1$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=3$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=5$ için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri 126
Şekil 8.59	pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve Konjugat (7. Yöntem) [(♦) $n_{pep}/n_{BSA}=1$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=3$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=5$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=7$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=9$ için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri 126
Şekil 8.60	pH 7’de hazırlanmış Konjugatlar (7. Yöntem) [(♦) $n_{pep}/n_{BSA}=1$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=3$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=5$] için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA)..... 127
Şekil 8.61	pH 7’de hazırlanmış Konjugatlar (7. Yöntem) [(♦) $n_{pep}/n_{BSA}=1$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=3$, (♦) $n_{pep}/n_{BSA}=5$] için yapılan ölçümlere ait boyut değerlerinin karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA) 127
Şekil 8.62	pH 7’de hazırlanmış Konjugatlar için yapılan Zeta potansiyel ölçümlerinin orana bağlı olarak karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA) 128
Şekil 8.63	pH 7’de hazırlanmış Konjugatlar için yapılan boyut ölçümlerinin orana bağlı olarak karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA)..... 128
Şekil 9.1	BSA ve peptid moleküllerinin düşük oranlardaki konjugasyonu sonucu oluşan konjugat için düşünülen 1. model 132
Şekil 9.2	BSA ve peptid moleküllerinin yüksek oranlardaki konjugasyonu sonucu oluşan konjugat için düşünülen 2. model 132

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 9.1	n=1, 3 ve 5 oranları için konjugatların $\lambda_{\max}$ değerleri	129
Çizelge 9.2	n=1, 3, 5, 7 ve 9 oranları için konjugatların ve bu konjugatların santrifüj edilmesinden sonra oluşan alt ve üst fazların $\lambda_{\max}$ değerleri	130
Çizelge 9.3	n=1, 3, 5, 7 ve 9 oranları için konjugatların Zeta potansiyel ve boyut değerleri.....	131

ÖNSÖZ

Tez konumu belirleyen, çalışmamın şekillenmesinde büyük emeği bulunan, benden hiçbir şekilde yardımlarını esirgemeyen, değerli tez hocam Yard.Doç.Dr. Zeynep AKDESTE'ye

Engin bilgisi ve tez çalışmalarım süresince yaptığı değerlendirmeler ile çalışmamızın her yönü ile ilerlemesinde yardımcı olan bizlerin her yönde önünü açan ve bu gelişmiş teknoloji ile çalışmamıza olanak sağlayan Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye

Tezim için gerekli olan Boyut ve Zeta potansiyel ölçümlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Eray DALGAKIRAN'a, GPC-Viscotek analizlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na, HPLC analizlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Namık AKILIÇ'a ve Flouresans ölçümlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Yasemin Budama BATTAL'a, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Banu MANSUR'a

Sevgili Kimya hocam İbrahim İBİŞ'e,

Lisans eğitimimden bu yana benden hiçbir şekilde desteğini esirgemeyen Organik Kimya'yı bizlere sevdiren ve en iyi şekilde öğrenmemizi sağlayan, engin bilgileri ile bizleri iyi bir Organik kimyacı olarak yetiştirmek için emek sarfeden Lisans Tez hocam Prof. Dr Şeniz KABAN'a,

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

Tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen Elk. Yük. Müh. Korhan DERMAN'a,

Tüm hayatım boyunca bana her türlü desteğinden dolayı sevgili Annem'e Babam'a ve Kardeşlerim'e,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Peptidlerin taşıyıcı proteinlere bağlanması, zayıf immunojenik özellikteki peptidlere karşı antikor oluşturmak için gerekmektedir. Sulu çözeltideki moleküllerin karboksil gruplarının aktivasyonu ve aktive olmuş karboksil gruplarına amino gruplarının kovalent bağlanması, bu tez çalışmamızın konusu olan globular yapıdaki protein ile sentetik peptidlerin konjugasyon reaksiyonunun temelini oluşturmaktadır.

Karbodiimidler heterobifonksiyonel özellikteki direkt (zero-length) çapraz bağlama reaktifleridir ve karboksil gruplarının amino gruplarına bağlanmasında kullanılırlar. Bu tez çalışmamızda karbodiimid yöntemi ile suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) kullanılarak, Peptid-Protein konjugatları hazırlandı. Konjugasyonda bir protein molekülü için peptidin farklı oranları ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}$) ile çalışıldı ve bu orantılara ait biyokonjugatlar sentezlendi. Sentezlenmiş biyokonjugatlar farklı kolonlardan geçirilerek saflaştırıldı.

Saflaştırılan biyokonjugatların; sentetik peptid, BSA ve BSA-sentetik peptid fiziki karışımları ile karşılaştırmalı olarak karakterizasyonu ve bağlanma mekanizmasının incelenmesi, HPLC, GPC-VISCOTEK (Gel Permeation Chromatography; UV, Refraktif İndeks, Vizkozite ve Işık Saçılması Detektörlerine Sahip Kromatografik Sistem), Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer (Partikül boyutu ve Zeta Potansiyel ölçümü için) cihazları kullanılarak gerçekleştirildi. Fiziko-kimyasal analiz sonuçlarına dayanarak globular BSA moleküllerinin lineer yapıli peptid molekülleri ile kovalent bağlanması sonucu elde edilen biyokonjugatların oluşum mekanizması, elektrik yükü ve üç boyutlu yapısı incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Peptid, Protein, BSA, Kovalent Bağlanma, Karbodiimid, EDC

ABSTRACT

Coupling of the peptides to carrier protein is required to producing of anti-peptide antikör which are weak immunogenic peptides. In aqueous solution carboxyl groups activation and binding the amino groups to activated carboxyl group with covalent bond is formed our thesis main subject's fundamental which is conjugation of globular proteins with synthetic peptides.

Carbodiimides are heterobifunctional (zero-length) cross linkers reagents and used for coupling of carboxyl groups and amino groups. In this thesis study we prepare Peptide-Protein conjugates with carbodiimide method by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride. For conjugation we study with different ratio of peptides for one protein molecule ($n_{\text{peptide}}/n_{\text{BSA}}$) and synthesized the conjugates for this ratio. Conjugates are purified by using different column.

Purified conjugates are characterized and the mechanism of the binding process is investigated comparatively with synthetic peptide, BSA and BSA-synthetic peptide physical mixture by HPLC, GPC-VISCOTEK (Gel Permeation Chromatography, The system has UV, Refractive Index, Viscometer and Right Angle Light Scattering detectors), Fluorescence Spectrophotometer, Zetasizer (Z-Ave, Zeta Potential). Formation mechanism, electrical charge and three dimensional structure of bioconjugates are investigated based on physicochemical analysis results.

Key words: Peptide, Protein, BSA, Covalent Coupling, Carbodiimide, EDC

1. GİRİŞ

Sentetik peptidler, zayıf immunojenik özellik gösterdiklerinden, antijenik özelliklerini arttırmak ve peptidlere karşı antikor oluşturmak için; peptidlerin taşıyıcı moleküllere bağlanması gerekmektedir. Bu şekilde sentetik peptidlerin taşıyıcı moleküllere bağlanması ile oluşturulan yeni nesil aşılarda üretilmesi çalışmaları oldukça yaygın olarak gerçekleştirilmektedir. Yeni nesil aşı oluşturulmasının temelindeki nokta virüslerin yapısındaki antijenlerin saptanması ve bunların sentetik yollarla üretilmesidir. Gelişen teknoloji değişik peptid sentez yöntemleri ile immunojenik özellikteki bu dizilerin sentetik olarak sentezlenmesine imkan vermiştir.

Bu şekilde elde edilen sentetik peptidlerin doğal ya da sentetik makromoleküllere bağlanması (konjugasyonu) tıp ve biyoteknolojide; ilaç salınımindan immobilize enzimlere, afinite bazlı immunoassay çalışmalarından, sentetik aşı üretimine kadar oldukça geniş bir alanda büyük önem taşımaktadır (Scranton vd., 1995; Plate ve Vasiliev, 1986; Dilgimen vd., 2001).

Günümüze dek yapılan çoğu çalışmada sentetik peptidlerin taşıyıcılara bağlanmasında en iyi sonuç alınan taşıyıcılardan bir tanesinin BSA olduğunun tespit edilmesine ve BSA-sentetik peptid konjugatlarının sentezlenmesine, bu konjugatların da farklı alanlarda kullanılmasına rağmen oluşan konjugatların fizikokimyası ve oluşum mekanizması hakkında sistematik olarak detaylı araştırmalar yapılmamıştır. Elde edilen konjugatlar sınırlı olarak HPLC yöntemi ile incelenmiş, konjugatların boyut, zetapotansiyel, fluoresans emisyon gibi karakteristik özellikleri incelenmemiştir.

“Peptid-Protein Kovalent Konjugatları” isimli bu tez çalışmamızda; spesifik olarak antijenik özellikteki sentetik peptidler ile taşıyıcı molekül olarak kullanılan proteinin farklı pH ve farklı peptid oranlarında kovalent konjugasyonunu, elde edilen konjugatların yapısını ve oluşum mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Bu doğrultuda antijenik peptid olarak; Şap hastalığı A Tipi FMD virüsü VP1 kapsid proteininin 135-161 (WSKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA) ve 170-188 (WATDISELLVRMKRAELYCP) dizilimli antijenleri ile (sentetik peptidler), taşıyıcı protein olarak ise globular yapıdaki BSA moleküllerini ile çalışılmıştır. Konjugatlar; sabit protein miktarında, sentetik peptidin değişken oranlarında ve suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) varlığında sentezlenmiştir. EDC sulu çözeltideki moleküllerin karboksil gruplarını aktive etmekte ve aktive olmuş karboksil grupları da amino gruplarına kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu reaksiyon mekanizması

temel alınarak ve farklı deneysel yöntemler ile farklı oranlarda peptid kullanılarak elde edilen konjugatların bir kısmı direkt olarak analiz edilirken bir kısmı ise 10.000 MW ayırmaya sahip membranlar kullanılarak ya da kolondan geçirilerek (moleküler eleme kromatografisi) üre türevlerinden ayrılarak saflaştırılmış ve sonrasında aşağıda detaylı anlatıldığı üzere çeşitli cihazlar yardımı ile incelenmiştir.

Elde edilen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve yapısı ilk kez tarafımızca, Moleküler Eleme Kromatografisi temeline dayalı olarak HPLC cihazında UV detektör ile ve GPC-VISCOTEK cihazında; UV, Işık saçılması, Kırılma indisi, Vizkozite detektörleri ile kromatogramları alınarak saf peptid, saf BSA ve peptid-BSA fiziki karışımları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Konjugatların boyut analizleri de yine ilk kez tarafımızca, saf peptid ve saf BSA ile karşılaştırmalı olarak Foton Korelasyon Spektroskopisi yöntemine dayanarak, zeta potansiyelleri ise yine saf peptid ve saf BSA ile karşılaştırmalı olarak Lazer Doppler Elektroforez (LDE) yöntemi kullanılarak Zeta sizer cihazında ölçülmüştür.

BSA ve peptid moleküllerinde bulunan Triptofanın konjugasyon ve etkileşimler sonucu çevresel konumunun ve buna bağlı olarak emisyon şiddeti ($I_{\max}$) ile $\lambda_{\max}$ (en yüksek emisyon yaptığı dalga boyu) değerinin değişmesi temeline dayanarak fluoresans spektrofotometre de ölçümler yapılmış ve $I_{\max}$ 'daki azalmalar ile $\lambda_{\max}$ 'da görülen kaymalara bağlı olarak konjugatların özellikleri sistematik olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

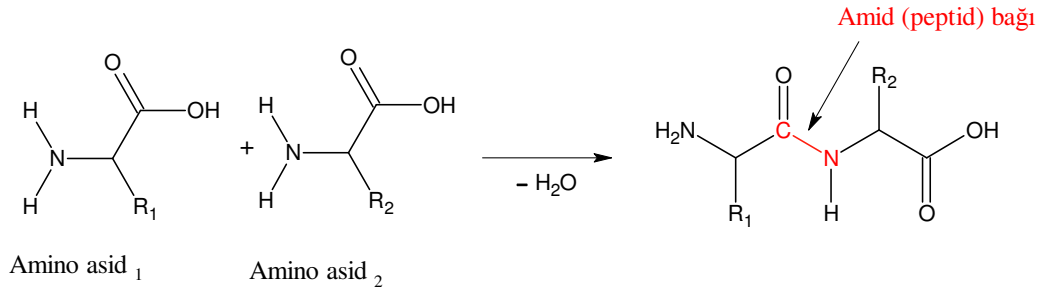
2.1 Peptid ve Proteinler

Peptid ve proteinler;

- Karbon (C),
- Hidrojen (H),
- Oksijen (O),
- ve bazıları da Sülfür (S) içermektedir.

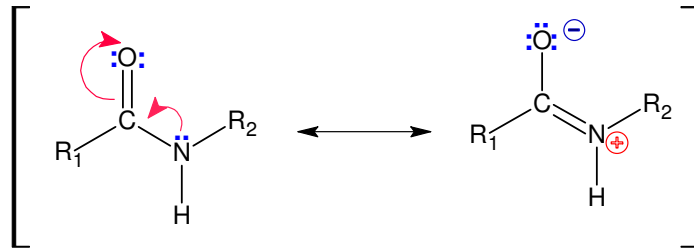
Peptidler aminoasid monomerlerinin peptid (amid) bağları ile bir araya gelmesinden oluşan doğal polimerlerdir. Peptidlerin biyolojik sistemlerdeki şaperonlar vasıtası ile katlanması sonucu ise proteinler oluşmaktadır.

Peptid bağı; bir aminoasiddeki karboksil grubunun karbon atomu ile diğer aminoasiddeki amino grubunun azot atomu arasında oluşan kovalent bağıdır [1].



Şekil 2.1 Amid (peptid) bağı genel gösterimi

Peptid bağı rezonans hibridleri arasında oluşan denge nedeni ile kısmi çift bağ karakteri taşımaktadır ve herhangi bir kovalent tekli bağdan daha kuvvetlidir.



Şekil 2.2 Amid (peptid) bağının kısmen kazandığı çift bağ karakteri

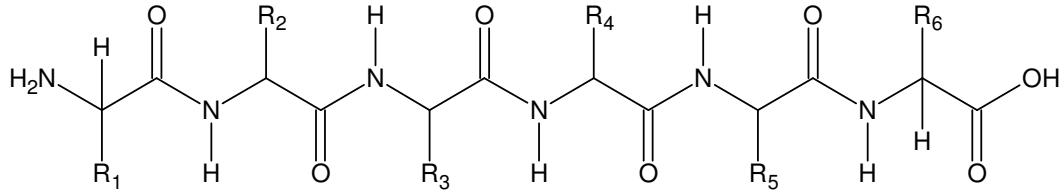
Her protein molekülünün doğal durumda iken sahip olduğu karakteristik üç boyutlu formuna konformasyonu denir. Proteinlerin konformasyonu, aminoasidlerin karşılıklı ilişkilerine göre dört farklı şekilde ifade edilir.

Bunlar;

- Birincil (Primer)
- İkincil (Sekonder)
- Üçüncül (Tersiyer) ve
- Dördüncül (Quarterner) yapılarıdır (Bahçeci, 2002).

2.1.1 Proteinlerin Birincil (Primer) Yapıları

Peptid ve proteinlerin birincil yapıları, birbirlerine peptid bağları ile bağlı aminoasidlerin oluşturduğu düz zincirden meydana gelmektedir.



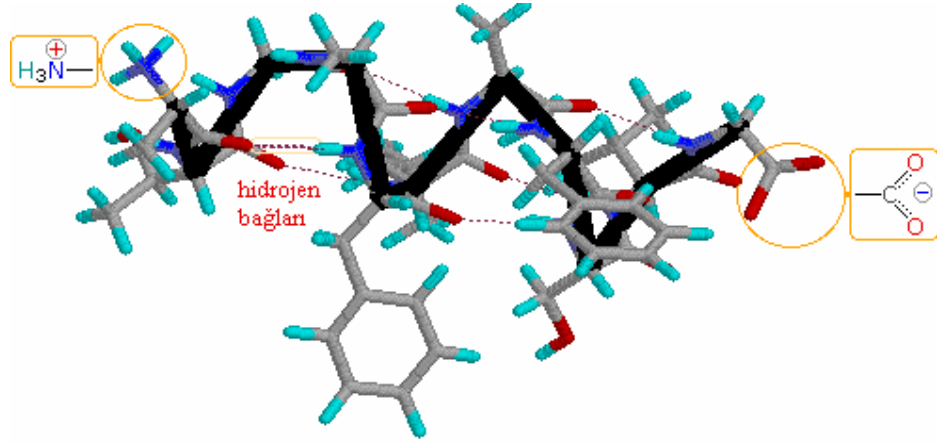
Şekil 2.3 Peptid ve proteinlerin primer yapısının genel gösterimi

2.1.2 Proteinlerin İkincil (Sekonder) Yapıları

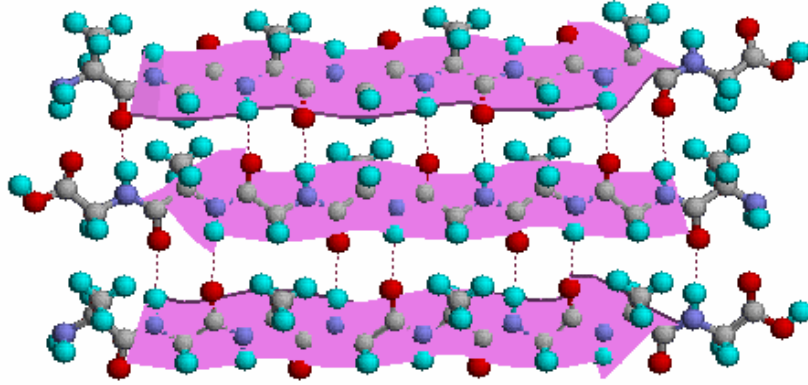
Peptid ve proteinlerin ikincil yapıları peptid zinciri üzerindeki aynı ya da farklı amid bağları arasında hidrojen bağlarının kurulması ile ortaya çıkar. Hidrojen bağları amid bağının $-C=O$ grubundaki oksijen ile $-NH_2$ grubundaki hidrojenler arasında oluşur.

Hidrojen bağları;

- aynı polipeptid zinciri üzerinde gerçekleşir ise **α heliks**,
- farklı polipeptid zincirleri arasında meydana gelir ise **β katlanmış yapı** oluşur [2].



Şekil 2.4 α heliks yapısının genel görünümü [2]

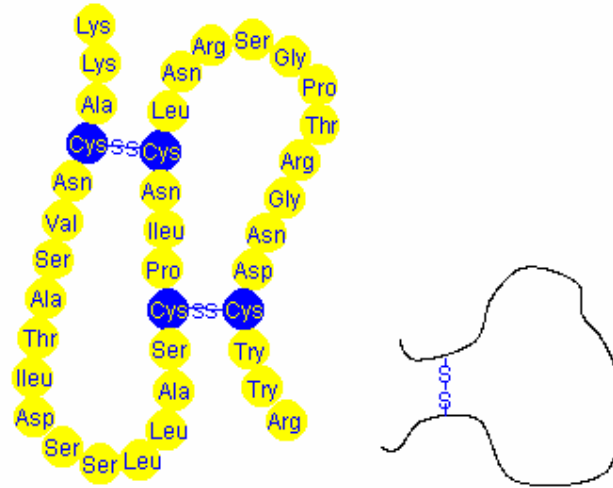


Şekil 2.5 β katlanmış yapının genel görünümü [2]

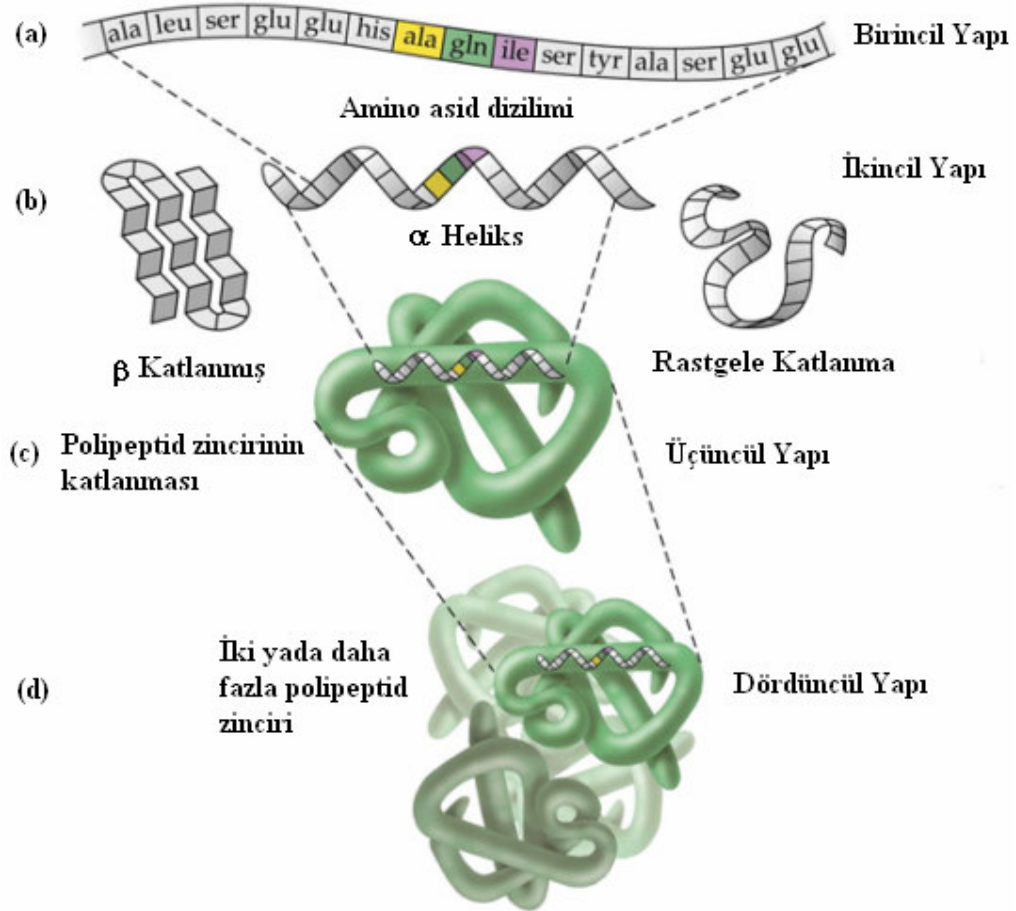
2.1.3 Proteinlerin Üçüncül (Tersiyer) Yapıları

Peptid ve proteinlerin üçüncül yapıları; polipeptid zincirini oluşturan aminoasidlerin yan zincirlerinin (R grupları) birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimler sonucu oluşan katlanma ya da kıvrılmalar ile şekillenmektedir. Peptid ve proteinlerin üçüncül yapısına etki eden kuvvetler;

- Hidrojen Bağları,
- Disülfid Bağları,
- Elektrostatik Kuvvetler
- Hidrofobik etkileşimler ve
- Van der Waals etkileşimleri olarak özetlenmektedir.



Şekil 2.6 Peptid ve proteinlerin üçüncül yapılarının oluşumda etkili olan disülfid bağının oluşumu ve disülfid bağı sonucu meydana gelen katlanma [3]

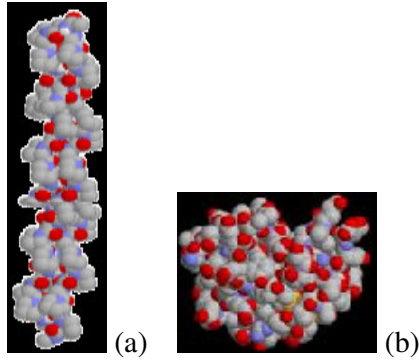


Şekil 2.7 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının toplu gösterimi [4]

2.1.4 Proteinlerin Dördüncül (Kuarterner) Yapıları

Proteinlerin dördüncül yapılarında ise birden çok alt ünite hidrojen bağları ya da hidrofob etkileşimler gibi kovalent olmayan bağlar ile bir arada tutulmaktadır. Alt ünitelerin konumlarına göre farklılaşan proteinler genel olarak

- Fibröz ya da
- Globular yapıları olarak sınıflandırılmaktadır.

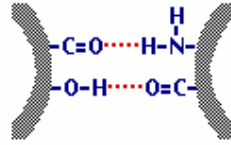


Şekil 2.8 Globular (a) ve Fibröz (b) proteinlerin genel görünüşleri [5, 6]

2.1.5 Proteinlerin Yapısındaki Kovalent Olmayan Bağlar

2.1.5.1 Hidrojen Bağları

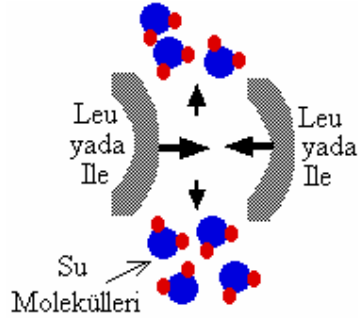
Polipektidler ana zincirlerini oluşturan aminoasidlerin R gruplarında birçok proton alıcısı (acceptor) ve vericilerine (donor) sahiptir. Ayrıca proteinin bulunduğu sulu çözelti ortamında da oldukça fazla miktarda hidrojen bağı alıcı ve vericisi bulunmaktadır. Buna bağı olarak hidrojen bağları hem polipeptid zincirlerinin kendi arasında hem de sulu çözelti ortamında bulunan elektron alıcı ve vericileri ile polipeptid zinciri arasında hidrojen bağları oluşmaktadır [7].



Şekil 2.9 Hidrojen bağı oluşumu

2.1.5.2 Hidrofobik Kuvvetler

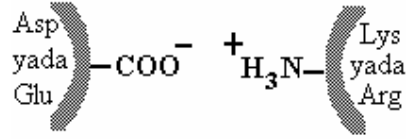
Proteinlerin yapısındaki aminoasid yan zincirleri hidrofilik ya da hidrofobik özellikte olabilmektedir. Farklı R gruplarının sulu ortamdaki etkileşimleri, proteinin yapısında ve bağlanmasında oldukça önemli role sahiptirler. Globular proteinlerdeki kendiliğinden katlanma durumu; hidrofilik R grupları ile sulu ortam arasındaki Hidrojen bağı oluşturma gücü ile Hidrofobik R gruplarının sulu ortamdan itilmesi arasında oluşan dengenin yansımasıdır [7].



Şekil 2.10 Hidrofobik etkileşimler ve bunun sonucunda su moleküllerinin itilmesi

2.1.5.3 Elektrostatik Kuvvetler

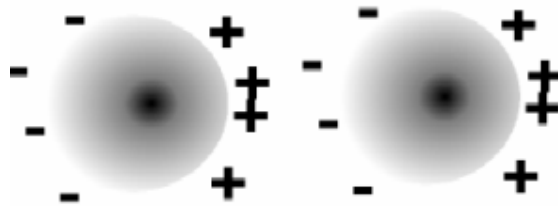
Elektrostatik kuvvetlerden oluşan etkileşimler; yüklü gruplar arasında ya da dipol momente sahip gruplar arasında meydana gelmektedir. Yüklü gruplar arasındaki etkileşim tipik olarak pozitif yüklü Aspartik asid ya da Glutamik asid ile Histidin, Lizin ya da Arginin arasında görülmektedir [8].



Şekil 2.11 Elektrostatik kuvvetler sonucu oluşan etkileşimler [7]

2.1.5.4 Van der Waals Kuvvetleri

Van der Waals kuvvetlerinin itme ve çekme kuvvetleri protein katlanmaları ve proteinlerin diğer moleküller ile etkileşimlerinde etkilidir. Van der Waals çekme kuvveti, yüksüz ve bağlanmamış durumdaki yakın atomlar arasında oluşan yük yoğunluğundaki dalgalanma sonucu meydana gelen kısa süreli kısmi kutuplaşma ile oluşmaktadır. Van der Waals kuvveti çok zayıf olmasına karşın etkileşimin çok büyük protein moleküllerinde olmasından dolayı katlanmalarda ve diğer moleküller ile etkileşimlerde van der Waals kuvvetlerinin önemi artmaktadır [9].



Şekil 2.12 Van der Waals kuvvetleri sonucu oluşan etkileşimler

3. PROTEİN ÖZELLİKTEKİ TAŞIYICI MOLEKÜLLER

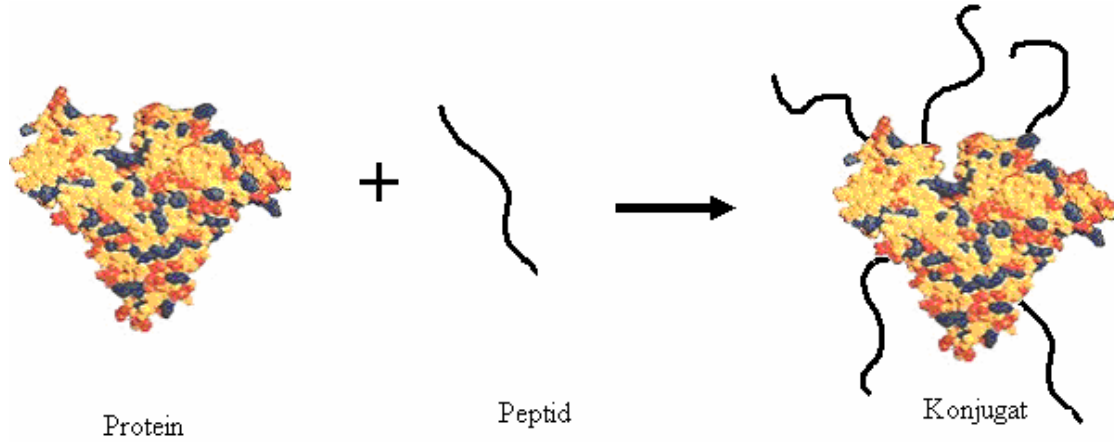
Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasid zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir (Deen vd., 1990). Büyük moleküler boyutlardaki BSA, KLH, OVA gibi globular proteinler ve liposomlar 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 (-NH₂) 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 noktalar. 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-Hidroksisükdinimid reaktif grupları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Peptidler antikor oluşturmak amacı ile immunizasyon için proteinlerle bağlanacağı zaman konjugasyon için spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması, peptid dizilimine sistein eklenmesi gibi klasik yöntemlerden kaçınılması gerekmektedir (Deen vd., 1990).

3.1 BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini

Bovin Serum Albumin 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).



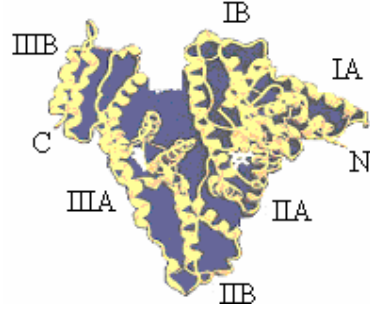
Şekil 3.1 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat

BSA'nın molekül ağırlığı 66×10^3 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 immunojeniktir. BSA yapısında 60 adet lizin içeren ve 30-35 adet primer amin bölgesine sahip, zayıf antijenik moleküller için oldukça sık kullanılan taşıyıcı bir proteindir.

BSA sulu çözeltilerde oldukça kolay çözünebildiğinden ve kolaylıkla homojen yapıya ulaştığından taşıyıcı protein olarak kullanılmasının yanı sıra, protein saptama çalışmalarında protein standardı olarak, SDS-PAGE ile Moleküler Ayırma Kromatografisi çalışmalarında da moleküler ağırlık standardı olarak kullanılmaktadır [10].

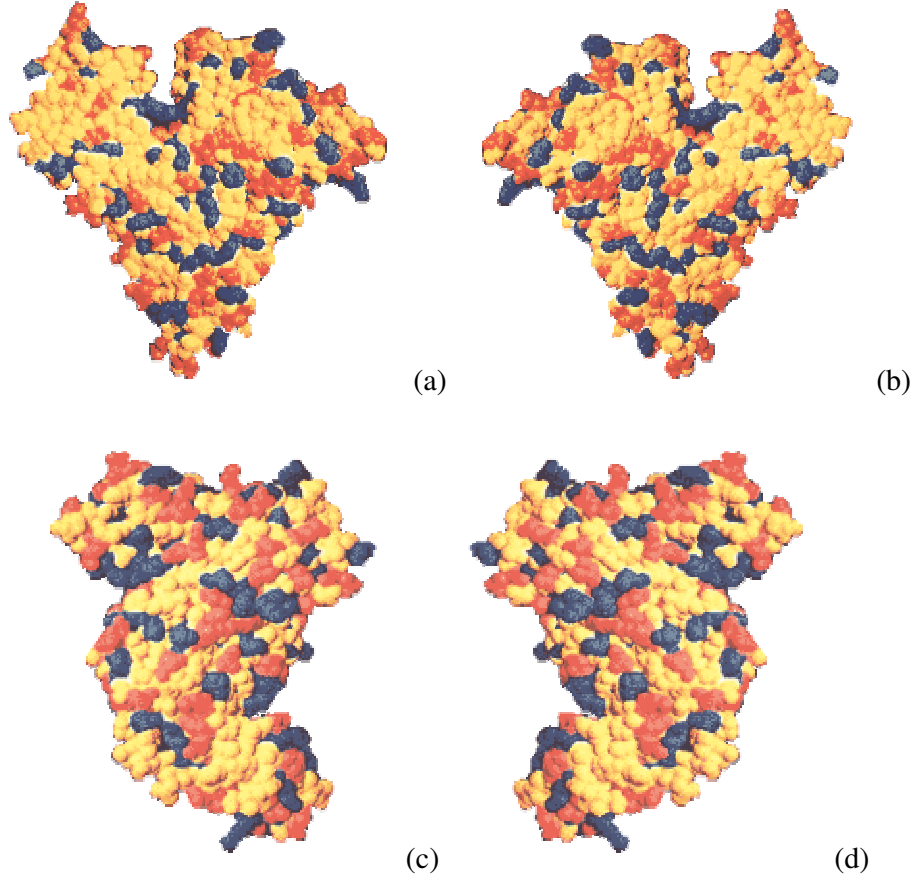
3.1.1 BSA'nın Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Bovin Serum Albumin molekülü I., II., ve III. olmak üzere üç üniteden (domain) oluşmakta ve her bir ünite iki farklı (A ve B) alt üniteden (subdomain) meydana gelmektedir. BSA molekülünün birincil (primer) yapısında düzenli bir yük dağılımı görülmez. Nötral pH'da Peters (1985) yapıdaki I, II ve III numaralı ünitelerin (domainlerin) sırası ile -10, -8 ve 0 net yüke sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 BSA molekülünün domain ve subdomainleri (Friedli, 1996)

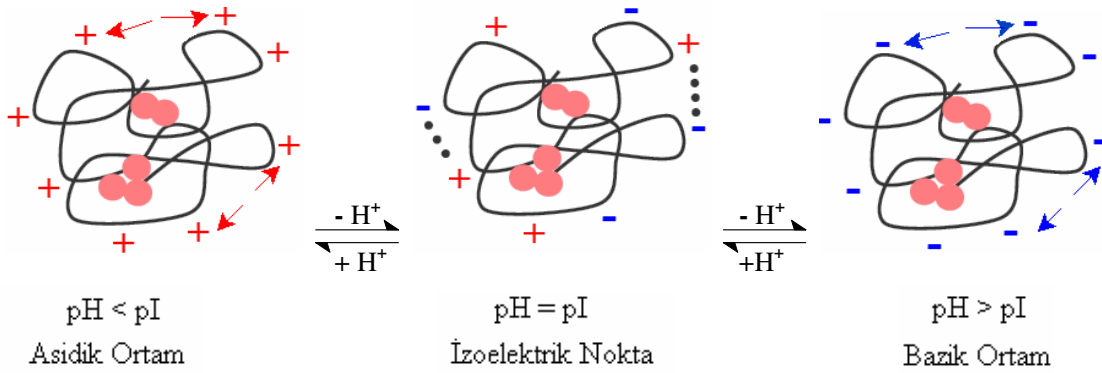
Birincil yapıdaki asimetrik yük dağılımına karşın, üçüncül (tersiyer) yapıda molekülün yüzeyinde yükler düzenli bir dağılım göstermektedir (Carter ve Ho, 1994).



Şekil 3.3 Bovin serum albuminin bazik yan zincirlerinin mavi, asidik yan zincirlerinin kırmızı ve nötral yan zincirlerinin sarı ile gösterildiği yük dağılımı modeli. Önden (a), arkadan (b), soldan (c) ve sağdan (d) görünüm (Friedli, 1996)

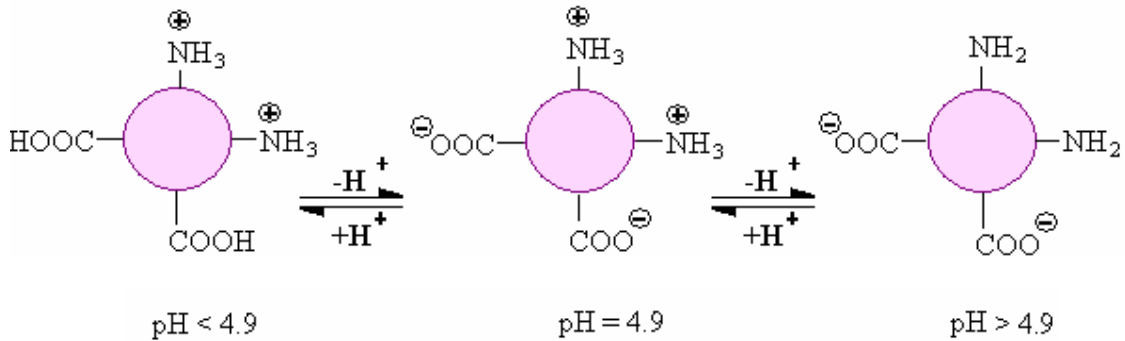
BSA'nın yapısındaki asidik (Asp ve Glu) ve bazik amino asitler (Arg, His, Lys) proteinin amfoterik özellik göstermesini sağlamakta böylece BSA proton verme ya da proton alma özelliğine sahip olmaktadır. pH'ın düşük olduğu asidik ortamlarda BSA ortamdan proton aldığı için pozitif olarak yüklenirken, pH'ın yüksek olduğu bazik ortamlarda ise molekül proton vererek negatif olarak yüklenmektedir.

Proteinlerin net elektrik yükünün sıfır olduğu pH'a o proteinin izoelektrik noktası denilmekte ve pI olarak gösterilmektedir. BSA için net yükünün sıfır olduğu izoelektrik nokta pI= 4.9'dur.



Şekil 3.4 Proteinlerin izoelektrik noktalarından düşük pH'da, izoelektrik noktalarında ve izoelektrik noktalarından yüksek pH'da gösterdikleri yük dağılımları

İzoelektrik noktasındaki pH değerinde BSA molekülleri yapılarında hem pozitif hem de negatif yükler içermekte ve bu yükler arasındaki elektrostatik çekme kuvvetlerinden dolayı bir araya gelme söz konusu olmaktadır. Bundan dolayı BSA izoelektrik noktasındaki pH'da en az çözündüğü durumdadır (Çimen, 2006).

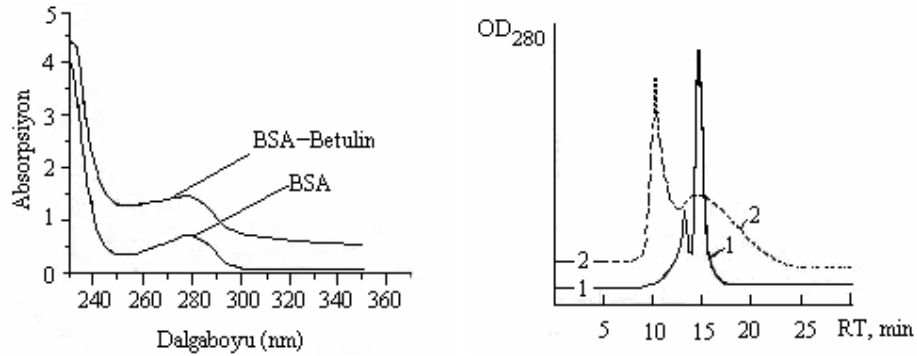


Şekil 3.5 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi

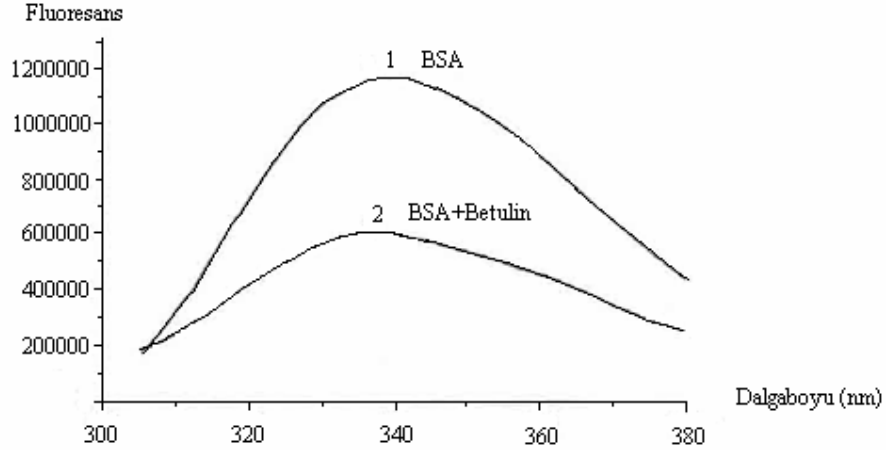
3.1.2 BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar

Mustafaev ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan ve düşük immunolojik 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. Mustafaev ve arkadaşları öncelikle 60 mg/ml BSA molekülünü 4 mg EDC ile pH 6.2'de 2 saat 4 °C'de karıştırarak aktive etmiştir. Daha sonra dimetilformamitte çözünen 15 mg betülin, BSA-EDC karışımına eklenmiş ve 4 °C'de 2 saat daha inkübasyon yapılmıştır. Oluşturulan konjugatın suya karşı diyalizi yapılmış ve saflaştırılan konjugatlar liyofilizatörde kurutulmuştur. Saflaştırılan BSA*B konjugatları UV, Floresans ve HPLC analizleri ile karakterize edilmiştir.

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 3.6 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, kromatogramda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002)



Şekil 3.7 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Fluoresans 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 reaktif 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 immunojenliği 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 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 immun cevaplar oluşturduğu saptanmıştır (Deen vd., 1990).

3.2 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) Proteini

KLH bir deniz yumuşakçası olan *Megathura crenulata*'dan izole edilen ve yaklaşık olarak 4.5×10^5 - 1.3×10^7 Da arasında değişen molekül ağırlığına sahip bir proteindir. KLH genel olarak antijenik özellikteki peptidler, haptenler ya da diğer immunolojik 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 molekül 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. Peptidin serbest sülfidril gruplarının KLH'ın amino gruplarına bağlandığı prosedürde önce MBS N,N-Dimetilformamid içerisinde çözülmüş sonrasında KLH ile karıştırılıp 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra bağlanmayan MBS Saphadex G-25 kolondan geçirilip uzaklaştırmış, maleimid tarafından aktive edilen KLH'a daha sonrasında serbest sülfidril grubu içeren peptid eklenmiş ve 3 saat inkübasyon yapılarak konjugatlar sentezlenmiştir [(Kagan vd., 2005) Detaylı reaksiyon mekanizması Bölüm 5.2.1'de verilmiştir.]

Reaksiyona girmemiş serbest antijenlerin 30,000 MW ayırmaya sahip membranlı tüplerden geçirilmesinden ve saflaştırılan konjugatlar ile diğer kontrol gruplarının (taşıyıcı proteine bağlanmayan antijen vb.) farelere immunizasyonundan 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 antijenileri (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), (Detaylı reaksiyon mekanizması Bölüm 5.1.1.3’de verilmiştir).

Boersma ve arkadaşları (1988) ise taşıyıcı protein olarak KLH’nin kullanıldığı konjugasyon reaksiyonunda 10 aminoasid zincirinden oluşan sentetik dekaeptidi, MBS yöntemi ile taşıyıcı proteine bağlanmıştır. Konjugasyon prosedüründe 10 mg/ml KLH çözeltisine dimetilformamidde 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’nin yüksek molekül ağırlığı, büyük molekül boyutları ve yapısında taşıdığı divalent katyonlar nedeni ile oldukça geniş yapılı agregat oluşturmaya meyilli olmasından dolayı çözeltilerinde tam çözünme gerçekleşmemekte bu da konjugasyon prosesinde zorluklara neden olmaktadır. Çözünmeyen KLH partiküllerinin çözeltiliden uzaklaştırılması için santrifüj edilmesi gerekmekte bu ise protein miktarını saptama işini zorlaştırmaktadır [10].

3.3 OVA (Ovalbumin) Proteini

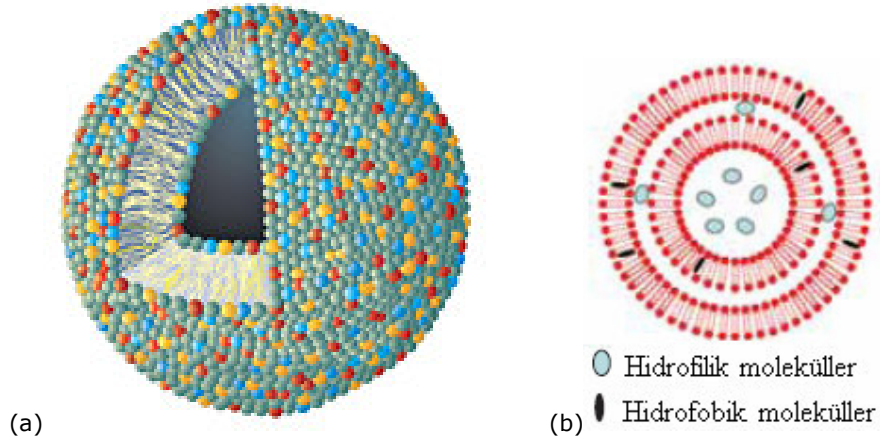
Ovalbumin proteini yumurta akında bulunan 45 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir ve izoelektrik noktası 4.6’dır [12]. OVA proteini de BSA ve KLH gibi sentetik peptidlerin immunojenik özelliklerini arttırmak için taşıyıcı protein olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla (Ghetie vd., 1991) OVA proteininin SPDP [N-hidroksisüksinimidil-β-(2-piridilditiyopropiyonat)] çapraz bağlayıcısı kullanılarak kısa molekül zincirli peptidlerle kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Önce OVA SPDP ile aktive edilmiş sonrasında tiyollenerek aktif hale getirilen OVA çapraz bağlayıcının fazlasından Saphadex G-25M kolon kullanılarak jel filtrasyon yöntemi ile ayrılmıştır. Saflaştırılan aktive edilmiş OVA sonrasında peptid ile karıştırılarak iki saat inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyondan sonra bağlanmayan peptidlerin Saphadex G-50 kolon kullanılarak jel filtrasyon ile ayrılmasından sonra konjugatlar farelere enjekte edilmiştir. OVA-peptid konjugatlarının, tek başına verilen serbest peptidlere göre daha yüksek antijenik özellik gösterdiği tespit edilmiştir .

4. DİĞER TAŞIYICI MOLEKÜLLER

4.1 Liposom Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Liposomlar; fosfolipidlerin suyla karıştırılması sonucu, eş merkezli bir ya da birden çok fosfolipid çiftli tabakalarından oluşan keseciklerdir. Liposomlar, sulu bir çekirdek kısmı ile lipid çift tabakasının arasındaki lipofilik boşluktan oluşan iki tabakadan meydana gelmektedir (Chen vd., 2005) ve aşırı sulu ortamda askıda olduklarında, lipid tabakalar kendiliğinden toplanarak, aralarında sulu fazların bulunduğu çok katmanlı eş merkezli ikili tabakalar halini almaktadırlar. İkili tabakaların oluşumu sırasında kesecik kapanırken de hidrofilik özellikteki ilaç, peptid, protein, nükleik asid ve boya gibi molekülleri çekirdekteki sulu fazda hapsederler (Latif ve Bachhawat, 1984).

Makromolekül boyutu 60-120 nm olan liposomlar tedavi edici ajanlar ya da antijenik özellikteki sentetik peptidlerden fazla miktarda taşıma kapasitesine sahiptir. Biocompatible (biyolojik sisteme uygun) liposomların oluşturulmasında lipidler kullanıldığından liposomlarla; hem hidrofobik hem de hidrofilik özellikteki sentetik peptid, ilaç, antijen, protein gibi moleküllerin aynı anda taşınması gerçekleştirilmekte [Şekil 4.1 (b)], bu da liposomların verimli ve güçlü taşıyıcı olmasını sağlamaktadır (Mohammed ve Perrie, 2005).



Şekil 4.1 (a) Tek katmanlı liposomun sulu çekirdek kısmı ve fosfolipid ikili tabakasının yapısı
(b) Polar ve apolar ilaç maddelerinin aynı anda liposomlarla taşınabilmesi [13]

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 immunolojik 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 toxoidi* 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 immunojenliğindeki anlamlı artışlar birçok bilim adamının tarafından gösterilmiştir.

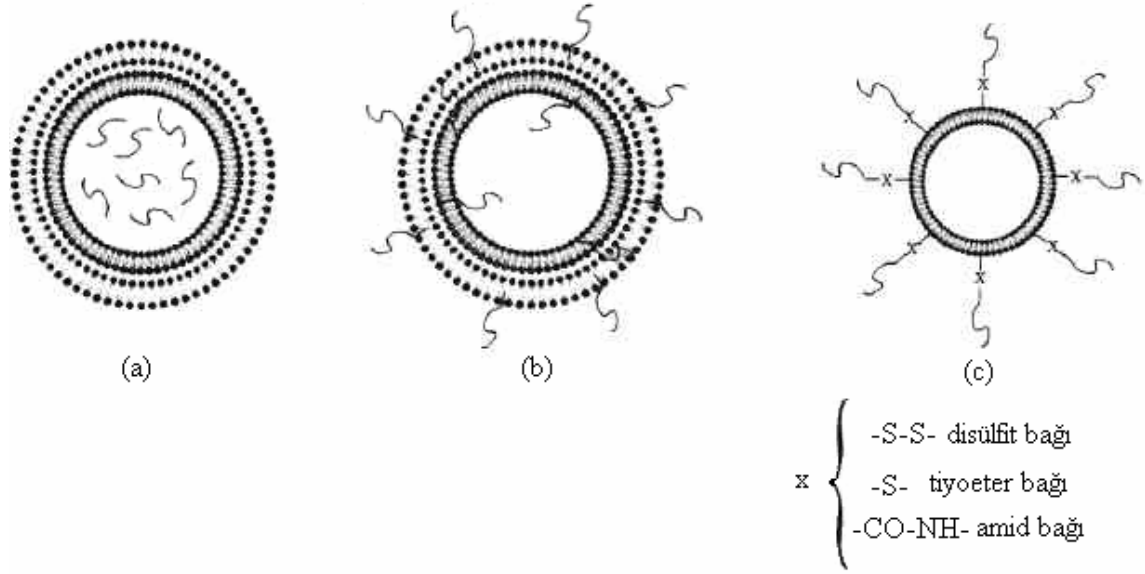
Hidrofilik peptid moleküllerinin liposomlara yerleştirilmesi keseciğin kapanırken suda çözünen peptidi keseciğin sulu kısmına hapsedilmesi ile gerçekleşir. Sanchez vd. (1980) tarafından yapılan çalışmada; Hepatid B yüzey antijeninden elde edilen polipeptidin büyük bir yüzde oranı ile liposomların sulu 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 immunojen 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 α -kimotripsini liposomun yüzeyine stabil olarak immobilize etmiştir.

Liposomlarla yapılan diğer bir çalışmada ise Laserman ve arkadaşları (1980) liposomlarla hücresel hedefleme amaçlı olarak, heterobifonksiyonel özellikteki SPDP [N-

hidroksisüksinimidil- β -(2-piridilditiyopropiyonat)]'ı kullanarak liposoma, antikor (hücresel 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 4.2 (a) Suda çözünebilir sentetik peptidler liposomlara direkt olarak hapsedilebilir, (b, c) Sentetik peptidler liposomlara kovalent olarak bağlanabilir (Haro ve Gómara, 2000)

4.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

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

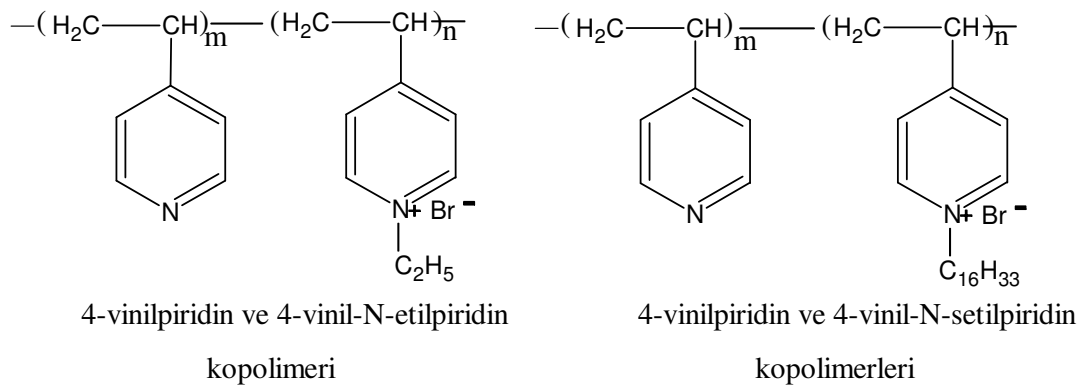
Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptenerler vb. spesifik antikor oluşturmak için günümüzde

oldukça yaygın kullanılmaktadır. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immunojenliğini 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,
- İmmunojenik etkilerini ve immunoreaktivliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002).

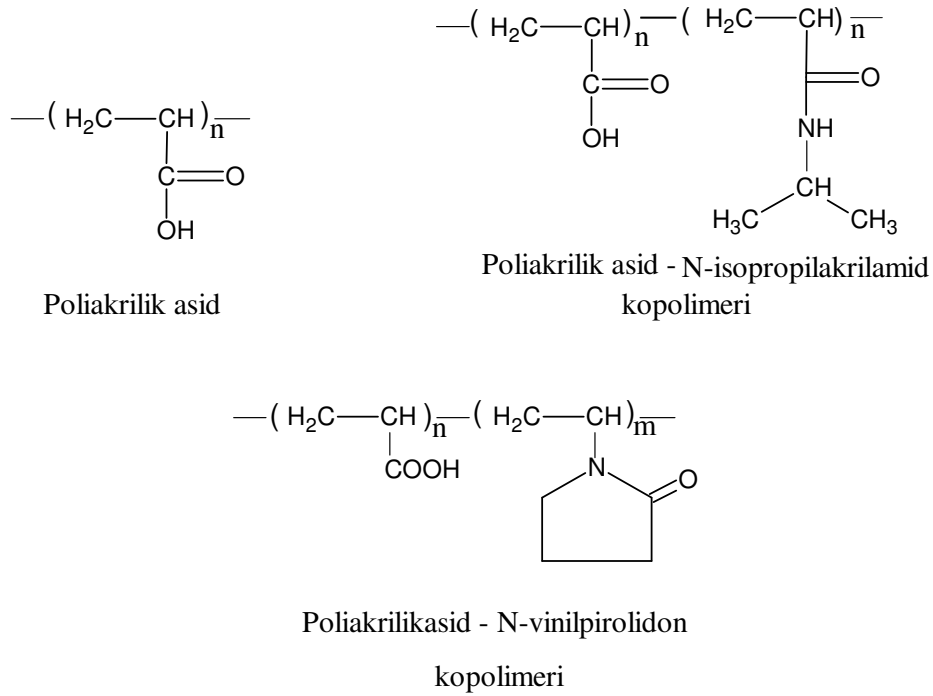
Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immunolojik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımıdır (Mustafaev, 1996). Polimerik taşıyıcı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

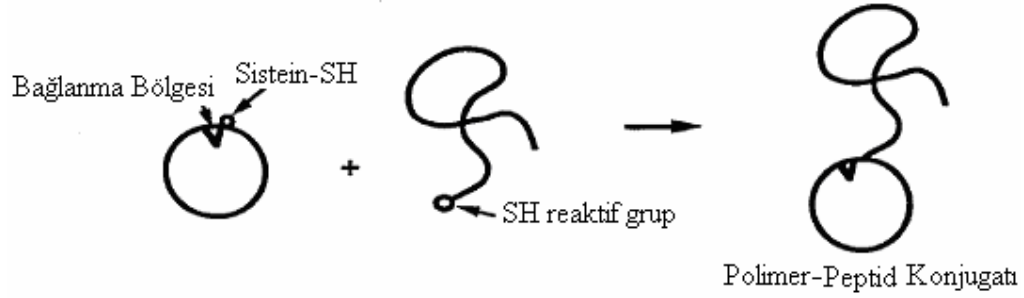
➔ Katyonik Polielektrolitler



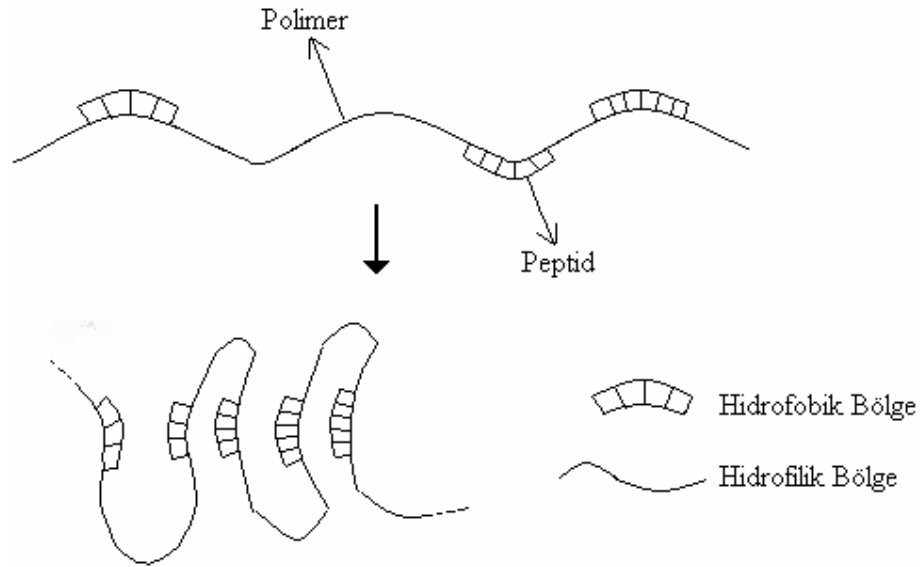
Şekil 4.3 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler

→ Anyonik Polielektrolitler





Şekil 4.5 Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000)



Şekil 4.6 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996, Mustafaev, 2004)

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

5. ÇAPRAZ BAĞLAMA REAKTİFLERİ

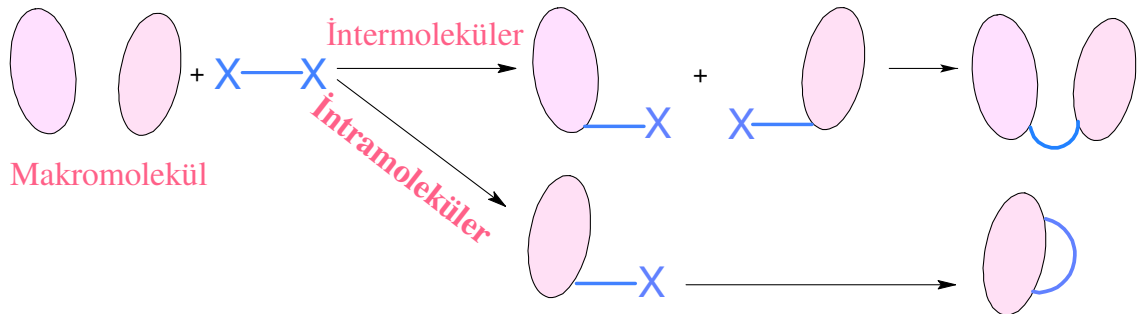
Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugat prosedürlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasal reaktiflerdir. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük 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). 2³

Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 Å (1 Å=1x10⁻¹⁰ 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 immunolojik cevapların oluşumunu önleyecektir.

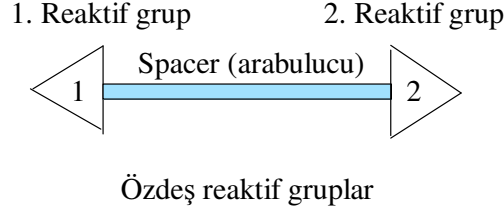
Çapraz bağlanma reaktifleri kullanılarak kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır.



Şekil 5.1 Makromoleküllerin İntermoleküler ve İntramoleküler olarak bağlanması

5.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

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



Şekil 5.2 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 basamları 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).

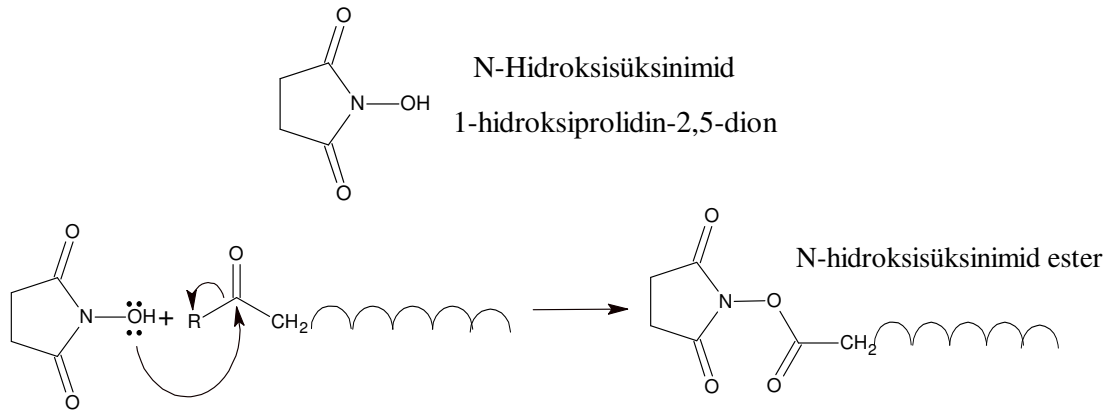
- **Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**
 1. NHS Esterleri
 2. Bis-imidoesterler
 3. Bis-aldehidler
 4. Bis-izosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar
 5. Diflorobenzen Türevleri
 6. Amino Gruplarının Yönlendirdiği Diğer Çapraz Bağlayıcılar
- **Sülfidril (Tiyol) Grubuna Yönelen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

5.1.1 Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Amino grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri amino grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır.

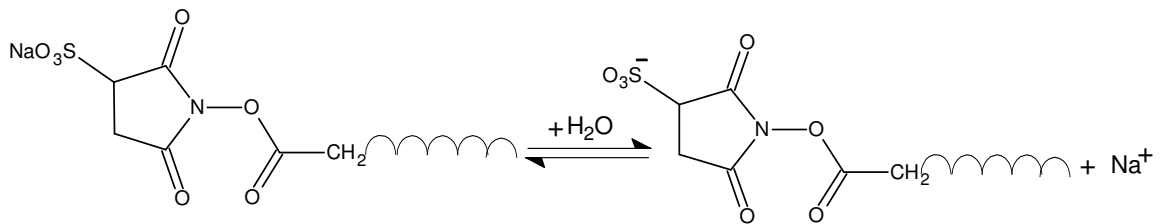
5.1.1.1 Homobifonksiyonel N-Hidroksisüksinimid (NHS) Esterleri

N-hidroksisüksinimid tarafından aktive edilmiş karboksil grupları içeren NHS esterleri nükleofilik aminlere karşı oldukça reaktiftir. Farklı uzunluk ve yapıdaki arabulucuların her iki yanında simetrik NHS esterleri bulunduran bu grup bağlayıcılar ilk olarak 1970'lerin ortalarında tanımlanmışlardır (Bragg ve Hou, 1975; Lomant ve Fairbanks, 1976).



Şekil 5.3 NHS molekülünden NHS ester oluşumu

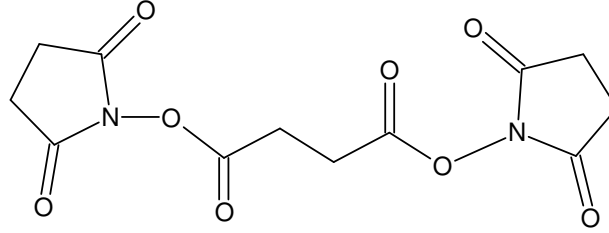
Ancak birçok NHS esteri içeren çapraz bağlayıcılar suda çözünemediklerinden oluşturulan çoğu prosedür NHS esterleri için önce yüksek konsantrasyonda organik çözücülerde çözünmesini sonrasında aliquotlanarak konjugasyon için saklanmalarını gerekli kılmaktadır. Çözünme probleminin giderilmesi için 1980'lerde J.V. Staros tarafından bir NHS ester türevi olan, N-Hidroksisülfosüksinimid esterler hazırlanmıştır (Staros, 1982). Sülfon-NHS esterler süksinimid halkasındaki 2. ya da 3. karbon atomunda negatif yüklü sülfonat grubuna sahiptirler.



Şekil 5.4 Sülfon NHS ester molekülü

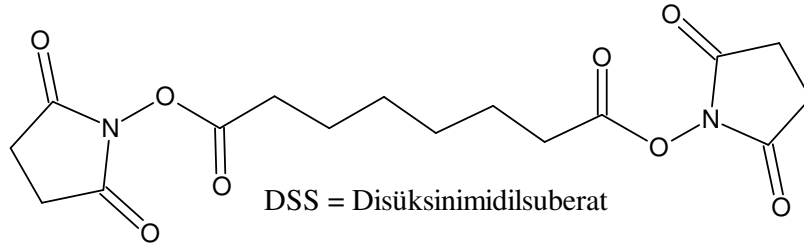
NHS ve sülfo-NHS ester içeren çapraz bağlayıcılar nükleofiller ile reaksiyona girerek NHS ya da sülfo-NHS açığa çıkarılırlar ve bunun yanında açillenmiş ürün oluştururlar. Bu çapraz bağlayıcıların sülfidril ya da hidroksil grupları ile reaksiyonları ve bunun sonucunda tiyoester ya da ester oluşturmaları olasıdır ancak oluşan ürünler kararlı değildir ve sulu ortamda hidrolizleri söz konusudur. Ancak primer ya da sekonder aminlerle oluşan reaksiyonlar sonucu meydana gelen amid ya da imid bağları oldukça stabildir ve hidrolize karşı daha kararlıdır. NHS esterlerin proteinlerle muamelesinde çapraz bağlayıcılar ilk olarak N-ucundaki α amino grubunda daha sonrasında da lizin zincirindeki ϵ amino grubuna saldırırlar.

Genel Olarak Kullanılan NHS Ester Türevleri



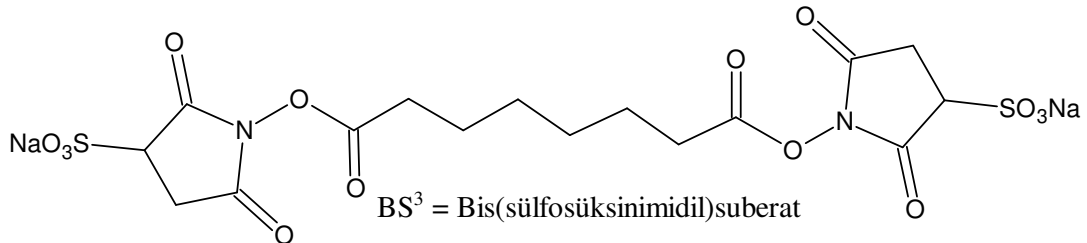
Süksinat bis(N-hidroksisüksinimidester)

(4.8 A°)



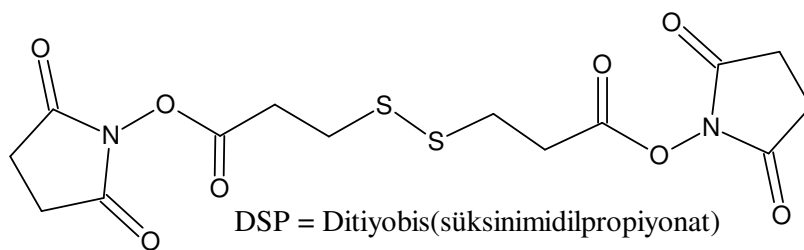
DSS = Disüksinimidilsuberat

(11.4 A°)

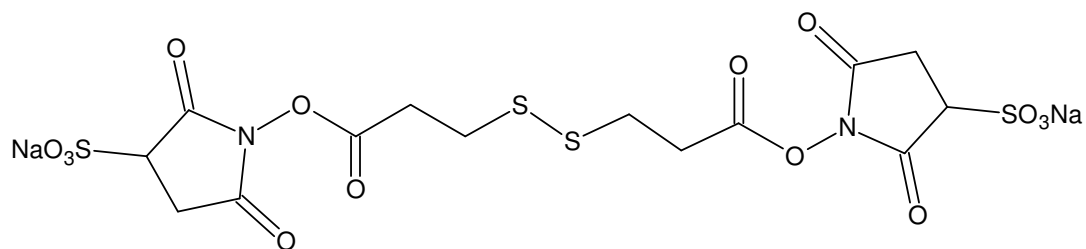


BS³ = Bis(sülfosüksinimidil)suberat

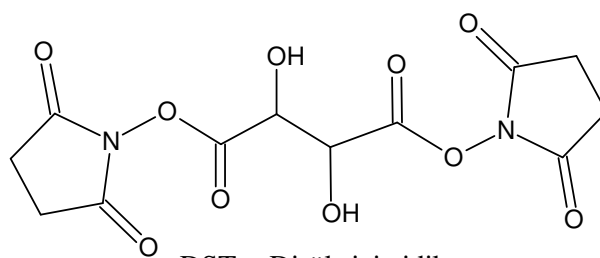
(11.4 A°)



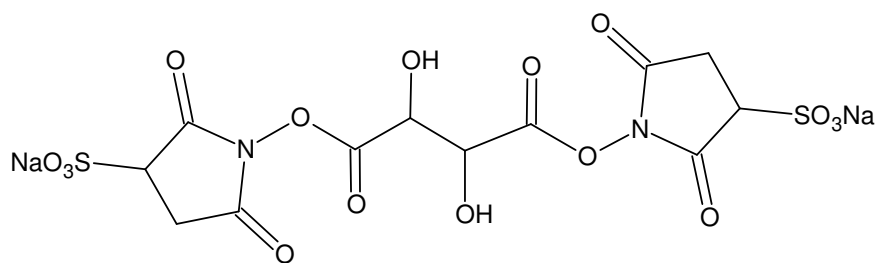
(12 A°)



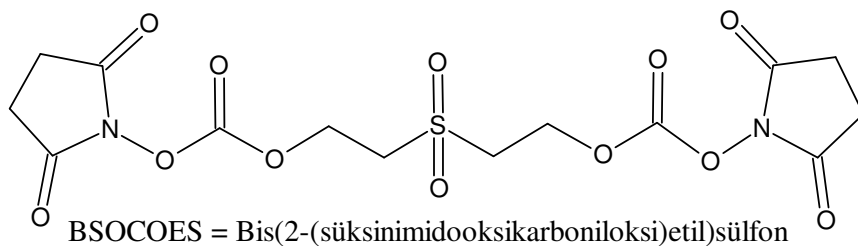
(12 A°)



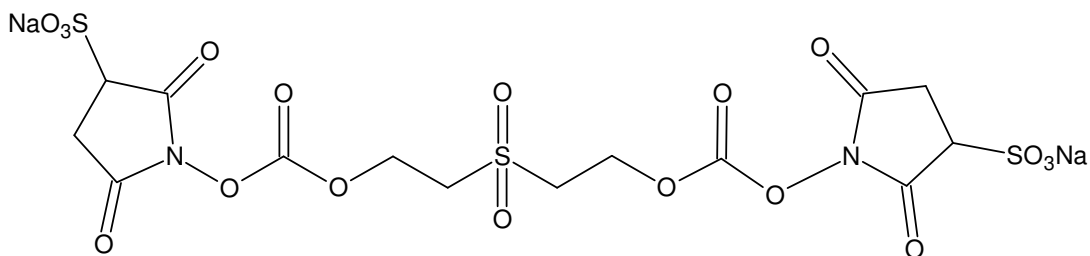
(6.4 A°)



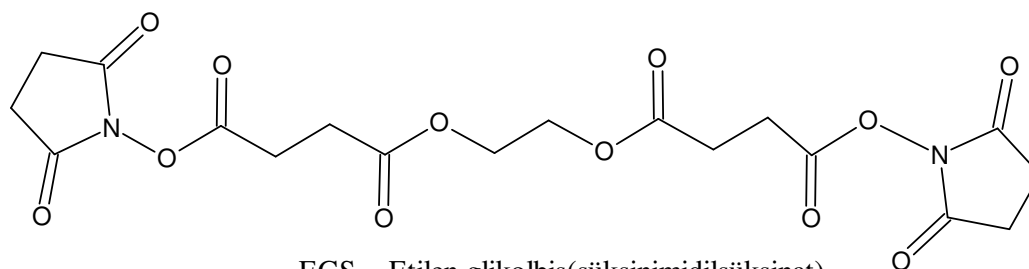
(6.4 A°)



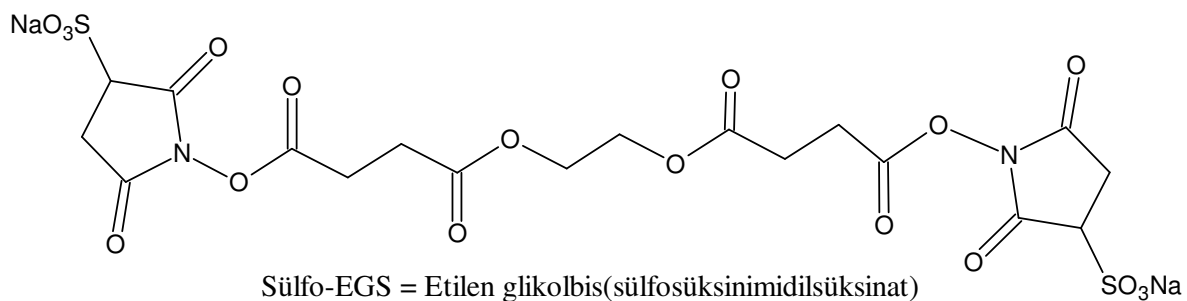
(13 A°)



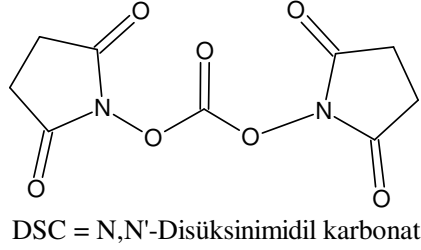
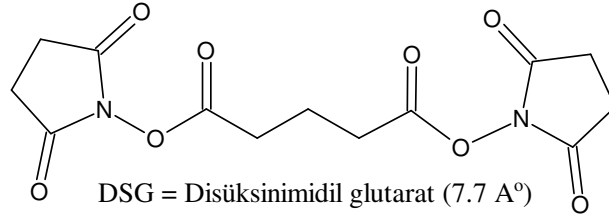
(13 A°)



(16.1 A°)

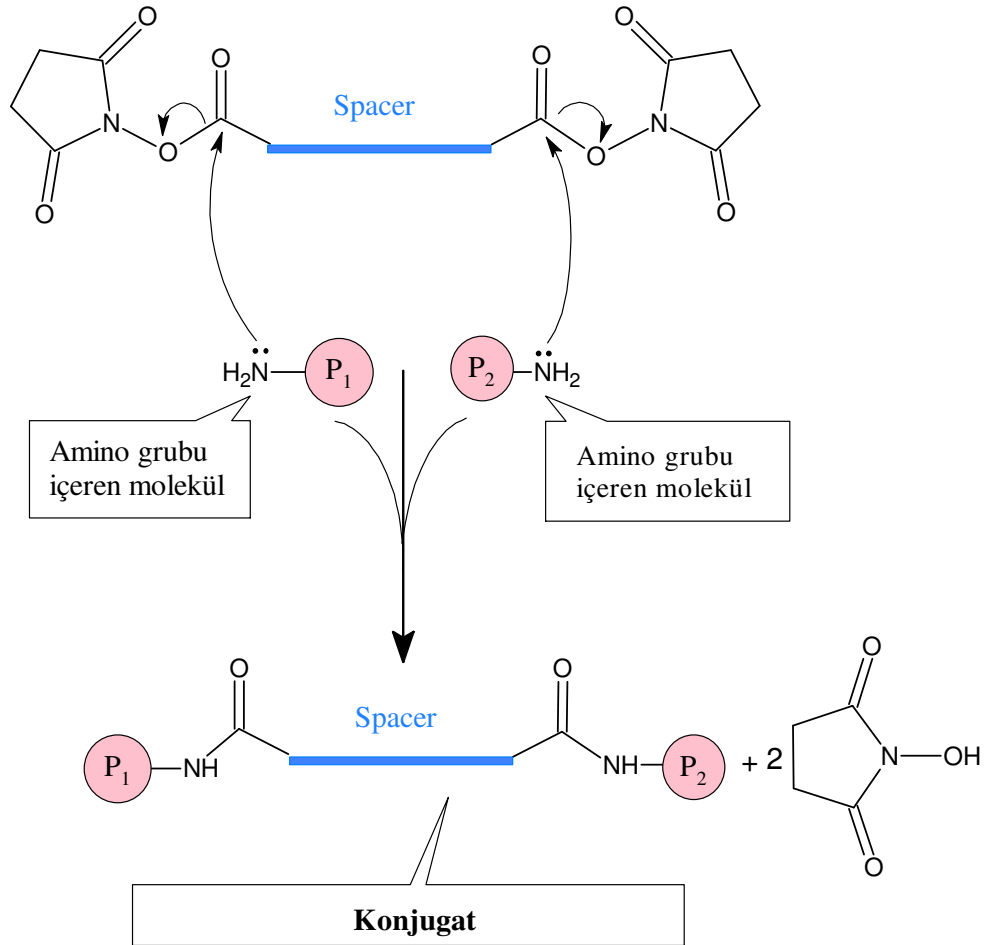


(16.1 A°)



Şekil 5.5 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan N-Hidroksisüksinimid esterleri

NHS Esterlerinin Genel Reaksiyon Mekanizmaları

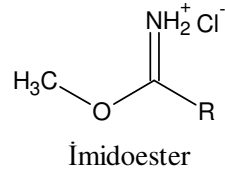


Şekil 5.6 NHS ester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

5.1.1.2 Homobifonksiyonel İmidosterler

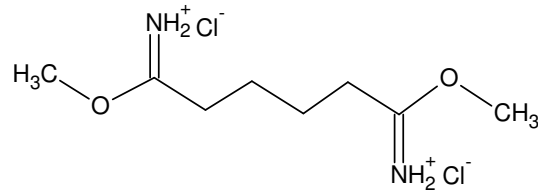
Proteinlerin konjugasyonunda en uzun süreden beri kullanılan ve arabulucunun her iki ucunda imidoester bulunduran çapraz bağlayıcılardır (Hartman and Wold, 1966). Primer aminler için imidoester fonksiyonel grupları, en spesifik açillendirme gruplarıdır ve proteinlerdeki diğer nükleofilik gruplara karşı çok düşük çapraz bağlama reaktivitesi göstermektedir. Proteinlerdeki α amino ve ϵ amino grupları pH = 7-10 arasında homobifonksiyonel imidoesterler ile etkileştirilerek hedefleme ve çapraz bağlanama gerçekleştirilebilir (En iyi pH aralığı 8-9). Bu reaksiyonun ürünü olan imidoamid (amidin) fizyolojik pH değerinde protonlanmakta ve bunun sonucunda pozitif yüklü olmaktadır (Liu vd., 1977; Kiehm ve Ji, 1977; Ji, 1979; Wilbur, 1992). Bu sonuç çapraz bağlanmış proteinin karakteristik yükünü değiştirmemektedir. İmidoamid bağı asidik pH değerinde oldukça kararludur ancak yüksek pH değerlerinde yani bazik koşullarda ise kolay hidroliz olmaktadır.

İmidoester çapraz bağlayıcılar suda çözünebilir özelliktedirler ancak sulu ortamda fazla kaldıklarında hidroliz nedeni ile bozunmaya uğrayabilmektedirler (Hermanson, 1996).



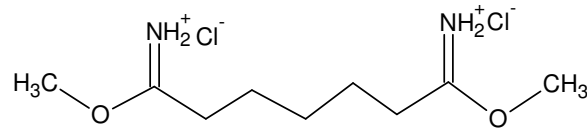
Şekil 5.7 İmidoester molekülü

Genel Olarak Kullanılan İmidoester Türevleri



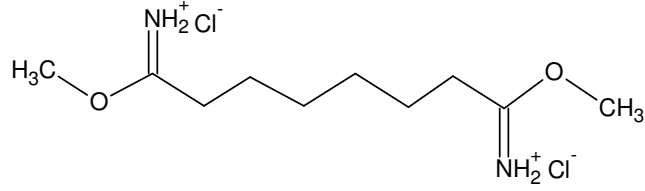
DMA = Dimetil adipimidat dihidroklorür

(8.6A°)



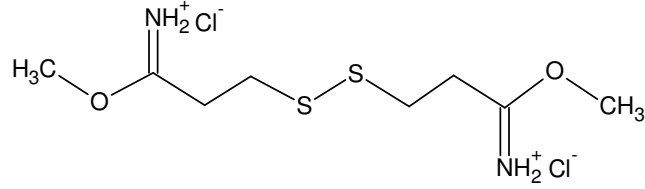
DMP = Dimetil pimelimidat dihidroklorür

(9.2A°)



DMS = Dimetil suberimidat dihidroklorür

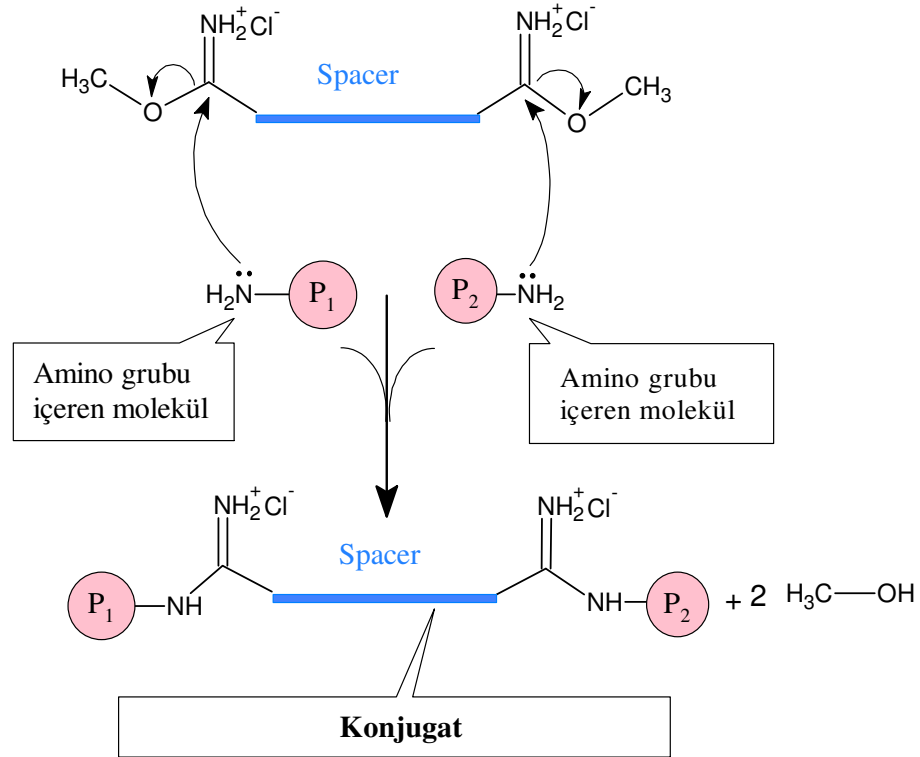
(11 A°)



DTBP = Dimetil 3,3'-ditiyobispropionimidat dihidroklorür

(11.9 A°)

Şekil 5.8 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan İmidoester türevleri

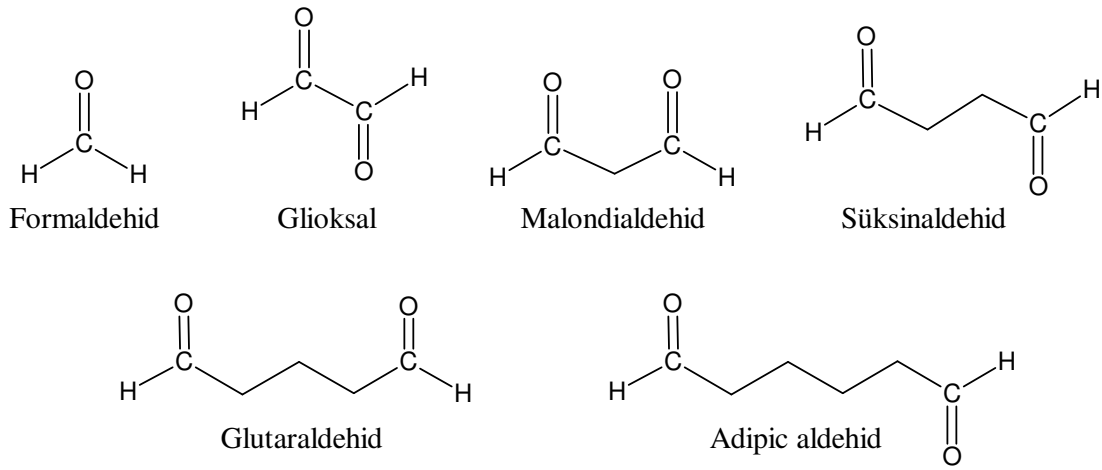
İmidoesterlerin Genel Reaksiyon Mekanizmaları

Şekil 5.9 İmidoester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

5.1.1.3 Homobifonksiyonel Dialdehidler

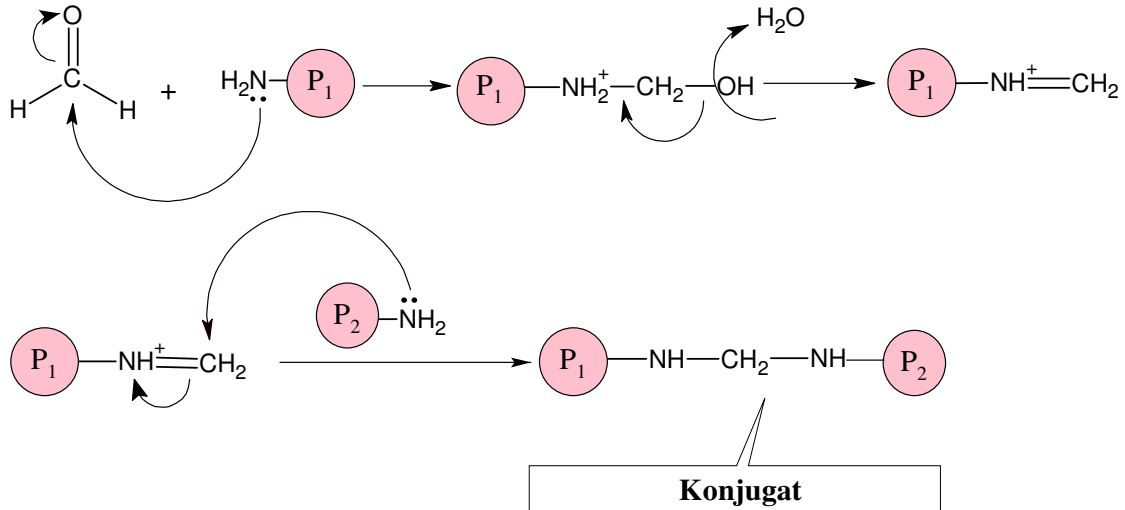
Sayırsız birçok dialdehid bileşenleri biyomoleküllerin çapraz bağlanmasında kullanılmaktadır. Hemen hemen yapısında iki aldehid grubu içeren her bir küçük organik molekül çapraz bağlama reaksiyonlarında denenmiştir. Reaksiyonlar için genel olarak ulaşılabilir homobifonksiyonel aldehidler tek karbonlu formaldehid, 2 karbonlu glioksal (Brooks ve Klammerth, 1968), 3 karbonlu malondialdehid (Cater, 1963), 4 karbonlu süksinaldehid (Cater, 1963), 5 karbonlu glutaraldehid ve 6 karbonlu adipaldehide (Cater, 1963; Richard ve Knowles, 1968; Fein ve Flachione, 1957; Seligsberger ve Sadler, 1957; Hopwood, 1969) kadar sınıflandırılabilir.

Genel Olarak Kullanılan Dialdehid Türevleri



Şekil 5.10 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan dialdehid türevleri

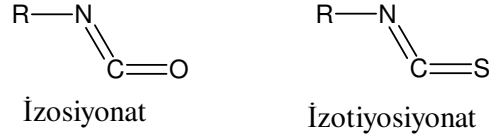
Formaldehidin Genel Reaksiyon Mekanizması



Şekil 5.11 Formaldehid kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

5.1.1.4 Homobifonksiyonel Bisizosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar

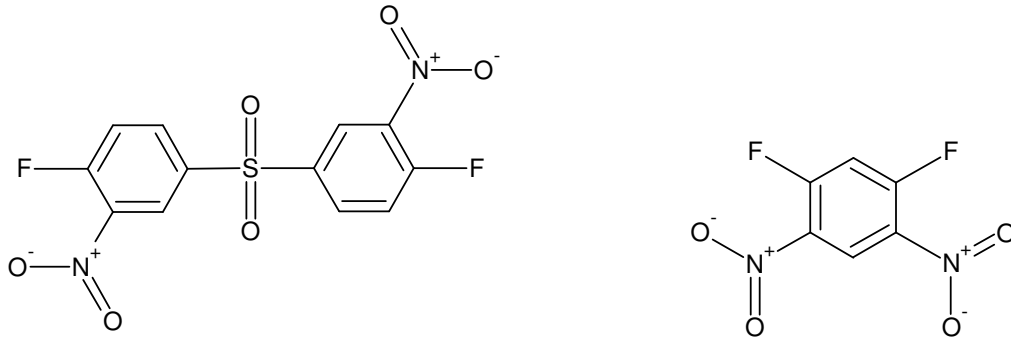
İzosiyonat ve izotiyosiyonat yapısındaki çapraz bağlayıcılar komşu nükeofil atomların (S, N, O) elektron çekmesi sonucu aktive edilmiş karbon atomları içerirler. Böylece nükleofilik azot içeren proteinler ortama eklendiğinde, aktive edilmiş karbon atomu amino gruplarının saldırabileceği bir bölge olarak davranırlar ve üre ya da tiyoüre oluştururlar. İkincil makromolekülün ortama katılması ile de çapraz bağlanma gerçekleştirilir (Aslam ve Dent, 1998).



Şekil 5.12 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan İzosiyonat ve İzotiyosiyonat

5.1.1.5 Homobifonksiyonel Diflorobenzen Türevleri

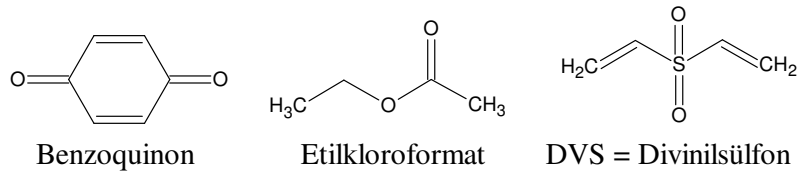
Diflorobenzen türevleri amino grupları ile reaksiyona giren küçük molekülü çapraz bağlayıcılarıdır. Bu bağlayıcılar kullanılarak oluşturulan kovalent bağlı bileşiklerin arasındaki uzaklık sadece 3-6 Å boyutları arasındadır ve bağlanan iki makromolekülün etkileşimi oldukça azdır (Hermanson, 1996).



Şekil 5.13 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Diflorobenzen türevleri

5.1.1.6 Amino Gruplarına Yönelen Diğer Çapraz Bağlayıcılar

Amino grubuna yönelen ve makromoleküllerin çapraz bağlanmasında daha az yaygın kullanılan benzoquinon, etilkloroformat, divinilsülfon gibi bileşikler de mevcuttur.



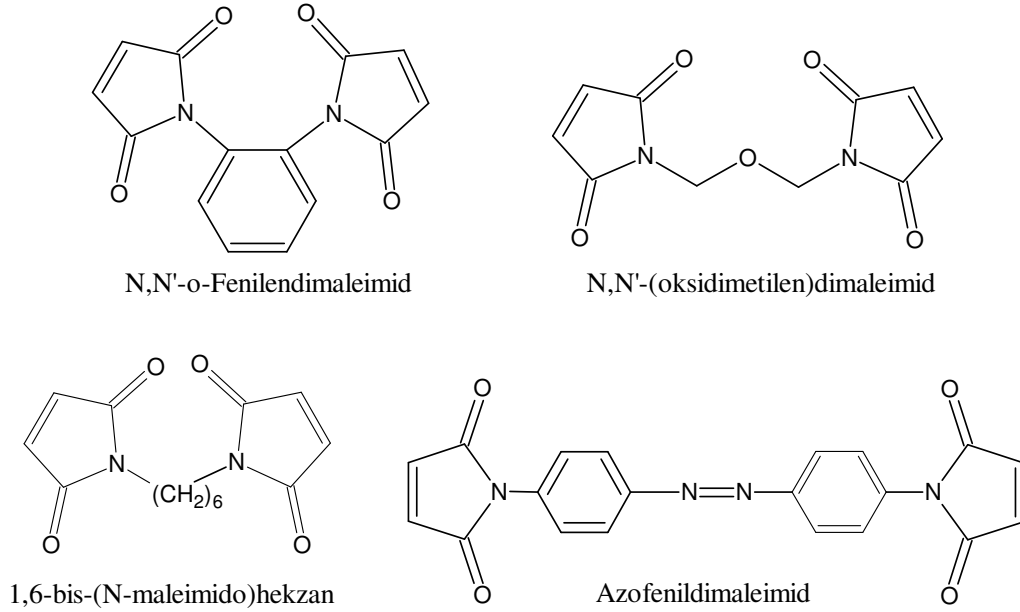
Şekil 5.14 Amino grubuna yönelen diğer Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar

5.1.2 Sülfidril Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri sülfidril grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin tiyol bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır (Hermanson, 1996).

5.1.2.1 Bismaleimidler

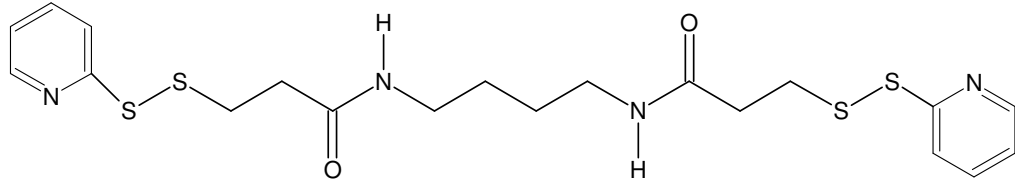
Maleimidlerin yapısındaki homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların her bir yarısı; iki komşu karbonil gruplarından dolayı nükleofilik ataklarla aktive edebilecek birer çiftli bağ içerirler. Sülfidril (tiyol) gruplarının reaksiyonu sonucu doymuş süksinimid halkasına oldukça kararlı olan tiyoeter bağı ile bağlanmış konjugatlar elde edilir. Reaksiyon yüksek pH'da tiyolat anyonunun artan konsantrasyonuna bağlı olarak daha verimli olarak gerçekleşir (Aslam ve Dent, 1998).



Şekil 5.15 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan Bismaleimid türevleri

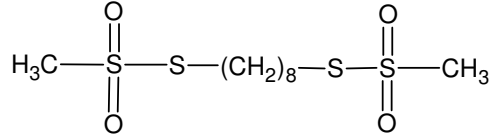
5.1.2.2 Disülfid Oluşturan Reaktifler

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak disülfid oluşumu ile konjugasyon uygulamaları az olmakla birlikte oldukça yüksek seçicilikte gerçekleşmektedir. En yaygın kullanılan disülfid oluşturan kimyasal reaktifler; DPDPB kısa adıyla bilinen 1,4-di-[3'-(2'-piridilditiyo)propionamido]-bütan ve 8-8'-Oktametilen-di-metantiyosülfonattır (Aslam ve Dent, 1998).



DPDPB = 1,4-di-(3'-(2'-piridilditiyo)propionamido)bütan

19.9 Å°

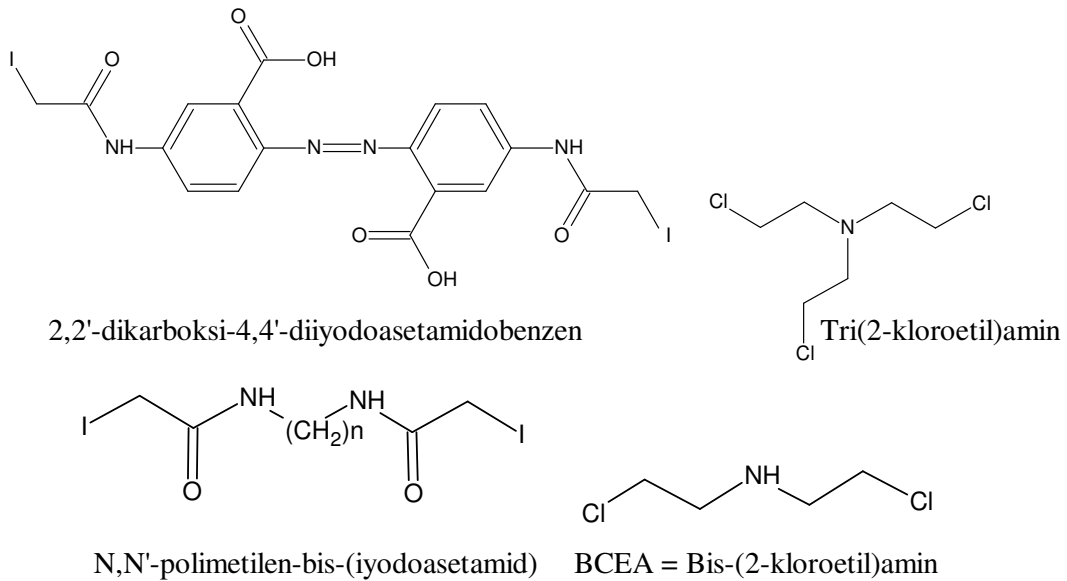


8,8'-Oktameten-bis-(metantiyosulfonat)

Şekil 5.16 Disülfid bağı üzerinden konjugat oluşturan moleküller

5.1.2.3 Dialkilhalojenürler

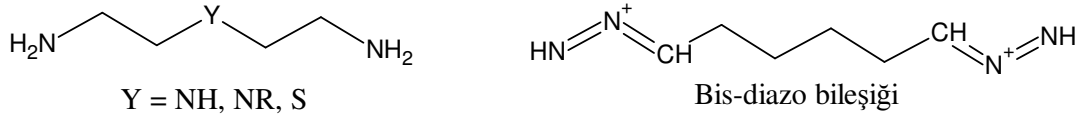
Oldukça farklı bir yapıya sahip olmalarına rağmen, α -karbonil alkil halojenürler maleimidlere benzer reaktif özellik göstermektedirler. Yapıdaki CH_2 grubu karbonil grubu ve halojenür atomları sayesinde nükleofilik bir saldırı ile aktive edilirler. Bu kategorideki birçok farklı grup tiyollere karşı reaktif özelliktedir. Bunlardan en önemlileri ise; Dihaloasetik asit, dihaloasetamid ve dihaloketonlardır. Ancak bu bileşikler özel bir seçiciliğe sahip değildirler, bundan dolayı seçiciliğin artırılması pH kontrollü olarak yapılmakta ve düşük pH değerleri ile çalışılarak dialkilhalojenürlerin sülfidril grupları için daha seçici olması sağlanmaktadır (Aslam ve Dent, 1998).



Şekil 5.17 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan Dialkilhalojenürler

5.1.3 Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

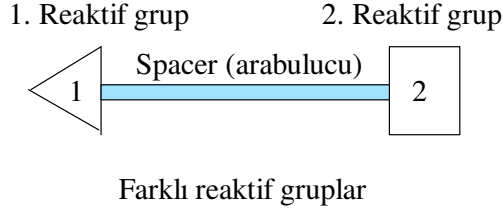
Karboksil anyonu nükleofilik yapıdadır ancak nötral ve oldukça bazik pH değerleri arasında elektrofiller için reaktifliği amino ya da tiyol grubunun yanında oldukça zayıf kalmaktadır. Ilımlı asidik koşullarda (karboksil grubunun pKa değerleri arasında; yaklaşık pH=3-5) amino ve tiyol grupların protonlanmış formları (NH_3^+ , SH) baskın olduğundan reaktivlikleri azalmakta ve karboksil grupları reaksiyon için tercih edilmektedir. β -karbonildiazo bileşikler bu koşullar altında konjugasyon reaktifi olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler fotoaktif edilebilir formda olup sonrasında karanlık koşullarda nükleofilleri hedefleyerek reaksiyona girmektedir. Genel olarak kullanılan karboksil grubuna yönelen homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar diazo bileşikleridir (Aslam ve Dent, 1998).



Şekil 5.18 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar

5.2 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

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



Şekil 5.19 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 kararlıdır. 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

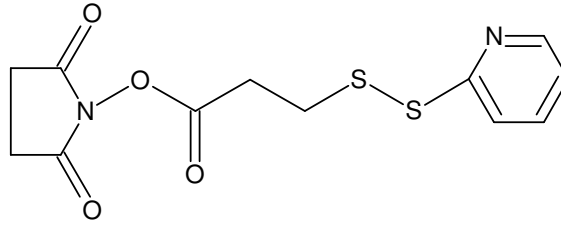
Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir (Aslam ve Dent, 1998).

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

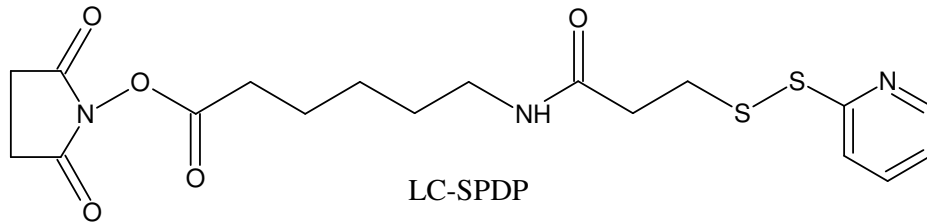
5.2.1 Amino ve Sülfidril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar içerisinde yaygın olarak kullanılan türlerden bir tanesi Amino ve Sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlayıcılardır. Amino grubuna yönelenler genel olarak ester (özellikle NHS ester) yapısında iken sülfidril reaktif uç değişik fonksiyonel gruplar içerebilmektedir. Çapraz bağlayıcının amino grubuna yönelen ucu tipik olarak açillendirme ajanıdır ve primer aminlere nükleofilik katılma sonucu yapıdan ayrılarak amid bağı oluşturmaktadır. Çapraz bağlayıcının sülfidril grubuna yönelen ucu ise genel olarak alkilendirme ajanı özelliğindedir ve sülfidril grubu içeren bileşik ile tiyoeter ya da disülfid bağı oluşturarak bağlanmaktadır.

Amino ve Sülfidril grubuna yönelen heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı reaktifler oldukça çeşitli olup bunlardan en yaygın kullanılanı MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hidroksisüksinimid) ester ve SPDP [N-Süksinimidil 3-(2-piridilditiyo)propiyonat]'dır. Genel olarak NHS ester içeren birçok çapraz bağlayıcının LC (Long Chain) ve daha önce 5.1.1.1 numaralı bölümde anlatıldığı gibi sülfö formları da mevcuttur (Hermanson, 1996).



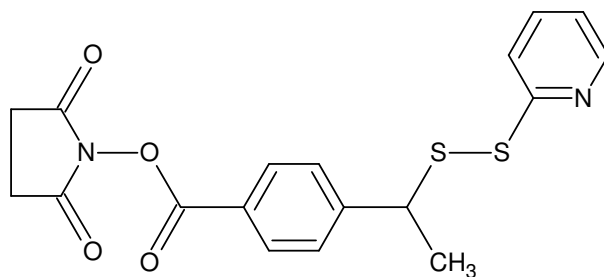
SPDP = N-süksinimidil 3-(2-piridilditiyo)propiyonat



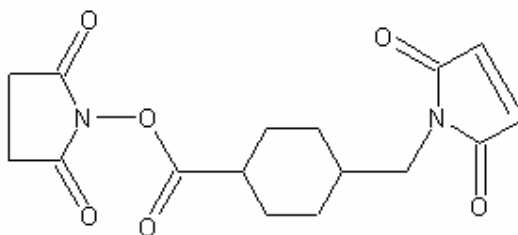
LC-SPDP



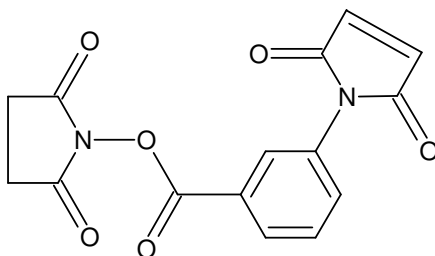
Sülfö LC-SPDP



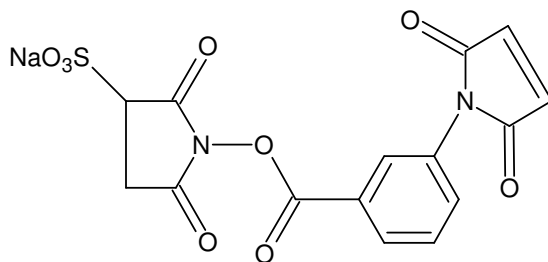
SMPT = 4-Süksinimidiloksikarbonil- α -metil- α -(2-piridilditiyo)toluen



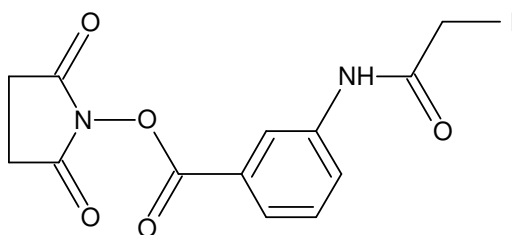
SMCC = Süksinimidil 4-(N-maleimidometil)siklohegzan-1-karboksilat



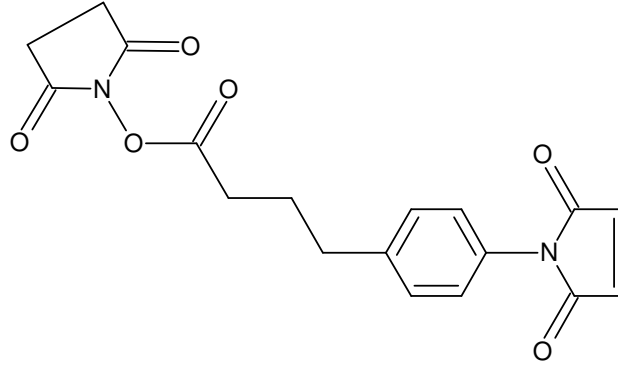
MBS = m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester



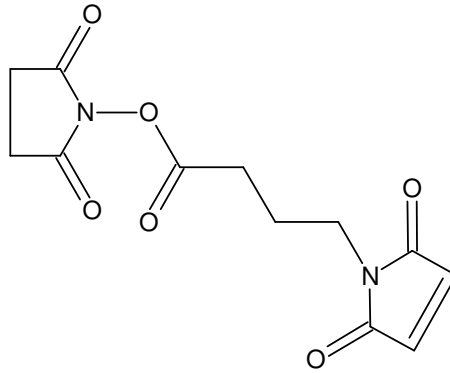
Sülfo MBS = Sülfo (m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester)



SIAB = N-süksinimidil(4-iyodoasetil)aminobenzoat



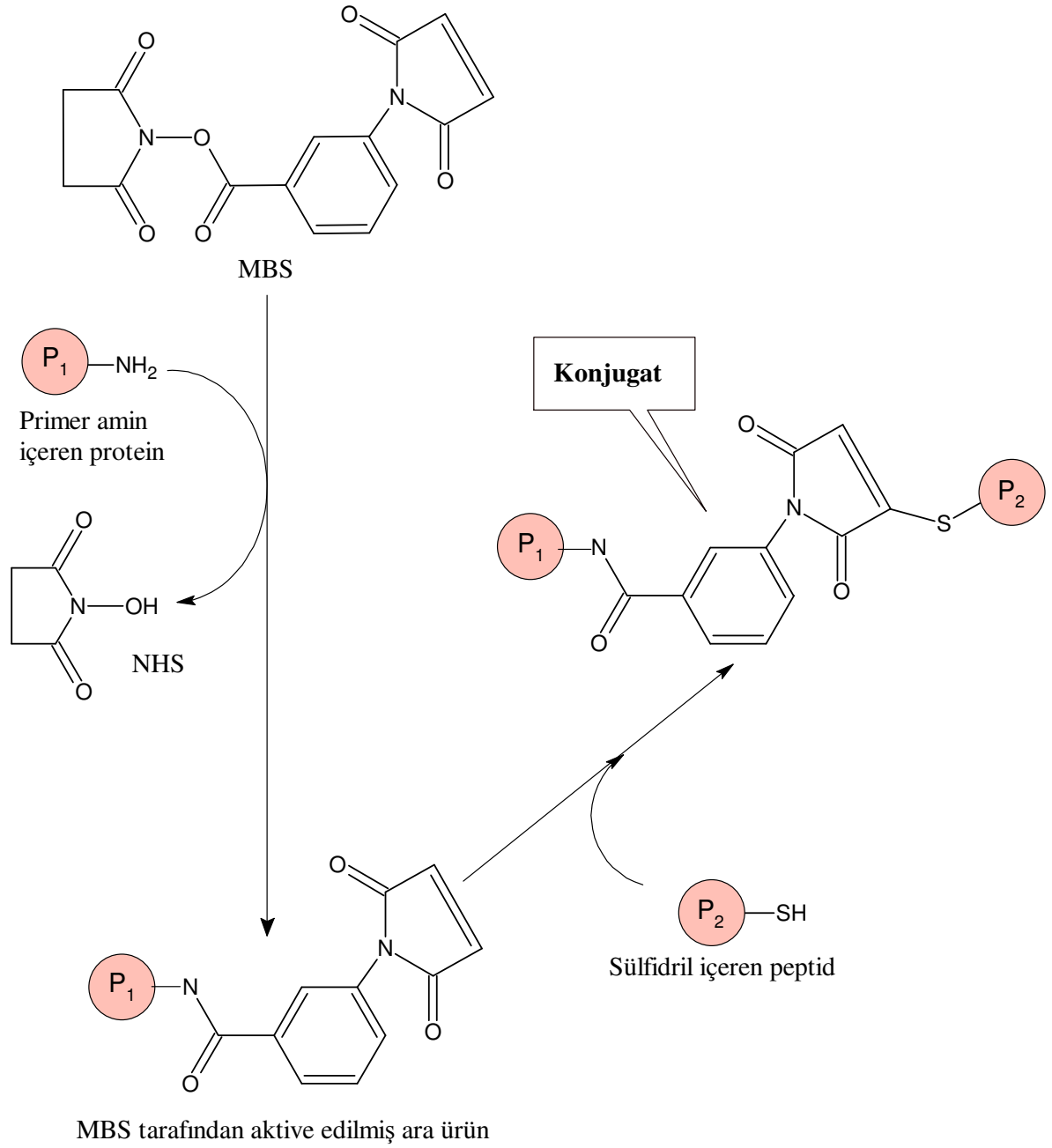
SMPB = Süksinimidil 4-(p-maleimidofenil)bütirat



GMBS = N-γ-maleimidobütiril-oksisüksinimid ester

Şekil 5.20 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan amino ve sülfidril grubuna yönelik heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar

MBS'nin Genel Reaksiyon Mekanizması

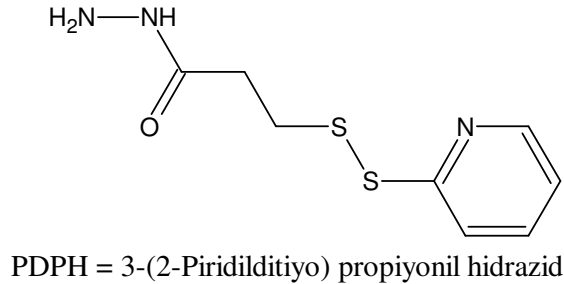
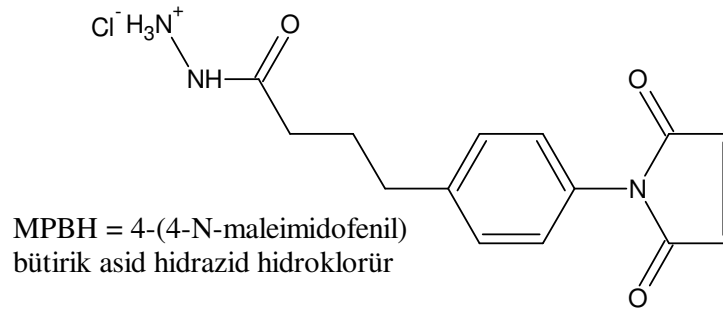


Şekil 5.21 MBS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

5.2.2 Karbonil ve Sülfidril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların oldukça yeni oluşturulmuş bir alt grubu olan karbonil ve sülfidril gruplarına yönelen bu çapraz bağlayıcıların bir ucunda sülfidril grubuna reaktif, diğer ucunda ise amino grubuna reaktif gruplar bulunmaktadır. Bu çapraz bağlayıcıların konjugasyondaki en büyük avantajları glikoproteinler gibi karbonhidrat içeren bileşikler sülfidril grubu içeren moleküllere bağlayabilmesidir. Hem polisakkarid hem de sülfidril grupları proteinlerde birbirlerinden uzak bölgelerde ve belirli limitlerde bulunmaktadır. Buna bağlı olarak bu gruplar arasındaki konjugasyon aktivasyon merkezinden ya da bağlanma bölgesinden uzak bir noktada yönlendirilmekte böylece proteinin aktivitesi korunmaktadır. Böylece antikorlar aktivitelerini kaybetmeden kovalent olarak bağlanmaktadır.

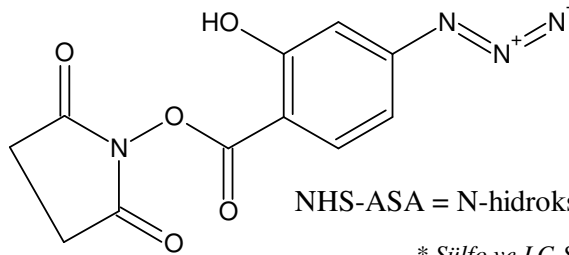
Bu tür çapraz bağlayıcıların karbonil gruplarına yönelen uçları hidrazid gruplarından oluşmaktadır ve aldehid uçları ile hidrazon bağı oluşturarak bağlanırlar. Sülfidril reaktif uçlarında ise iki farklı grup yer alabilmektedir, bunlardan bir tanesi piridil disülfid diğeri ise maleimid gruplarıdır (Hermanson, 1996).



Şekil 5.22 Karbonil ve sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar

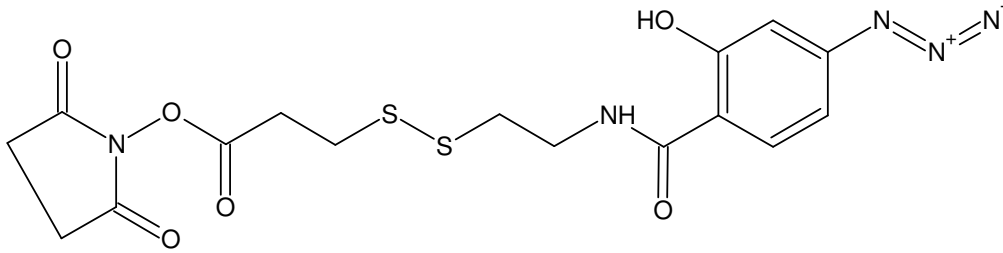
5.2.3 Amino Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların en önemli alt gruplarından bir tanesi tek ucunda ışık ile aktif hale getirilip konjugasyonu başlatacak gruplar içeren bağlayıcı ajanlardır. Bu tür grupları içeren çapraz bağlayıcılar karanlıkta sulu çözelti içerisinde kararlı bir şekilde saklanabilmekte ve kullanılacakları zaman kendilerine özgü dalga boyunda ışık ile muamele edilip aktive edilebilmektedirler. Fotoreaktif grup içeren çapraz bağlayıcıların diğer uçlarında ise genel olarak kendiliğinden reaktif özelliği olan gruplar bulunmakta ve bunlar da hedeflenen moleküldeki istenilen grup ile bağlanma reaksiyonuna girmektedirler (Hermanson, 1996).

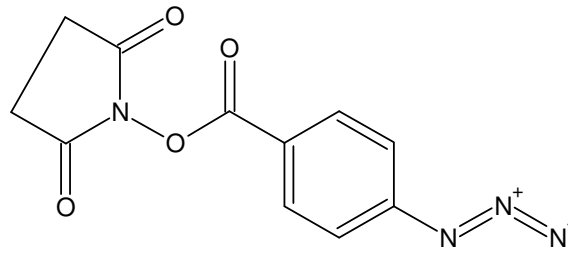


NHS-ASA = N-hidroksisüksinimidil-4-azidosalisilikasid

* Sülfö ve LC-Sülfö formları da mevcuttur



SASD = Sülfosüksinimidil-2-(p-azidosilamido)etil-1,3'-ditiyopropiyonat

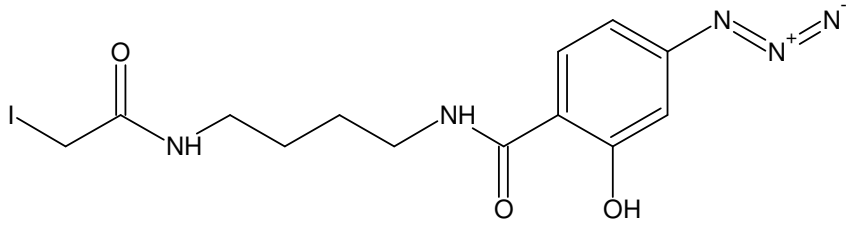


HSAB = N-hidroksisüksinimidil-4-azidobenzoat

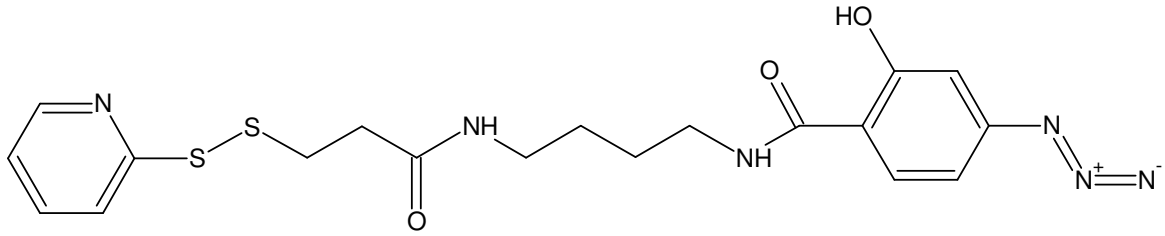
Şekil 5.23 Amino grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren çapraz bağlayıcılar

5.2.4 Sülfidril Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

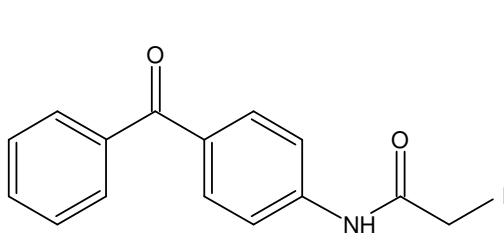
Seçici olmayan fotoreaktif özellikteki çapraz bağlayıcılar ile sülfidril reaktif fonksiyonel grupların direkt çapraz bağlama özellikleri bir araya getirilerek daha etkili çapraz bağlama ajanları oluşturulmuştur. Sülfidril reaktif grup içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan fotoreaktif gruplara göre konjugasyon başlangıcında seçici bağlama sağlamaktadır. Sülfidril reaktif uçlara sahip heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar genel olarak; iyodoasetil türevleri, maleimid bileşenleri ve piridildisülfid gibi gruplar içermektedir. Aynı çapraz bağlayıcıların fotoreaktif uçları ise arilazid, benzofenon vb. gruplardan oluşmaktadır (Hermanson, 1996).



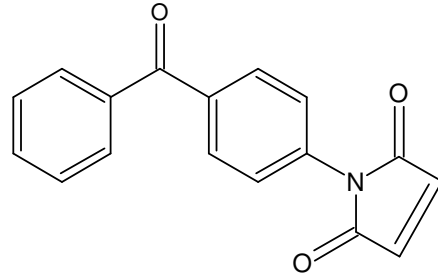
ASIB = 1-(p-Azidosalisilamido)-4-(iyodoasetamido)bütan



APDP = N-(4-(p-Azidosalisilamido)bütin)-3'-(2'-piridilditiyo)propionamid



Benzofenon-4-iyodoasetamid

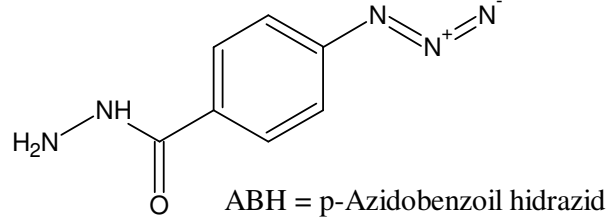


Benzofenon-4-maleimid

Şekil 5.24 Sülfidril grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren çapraz bağlayıcılar

5.2.5 Karbonil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

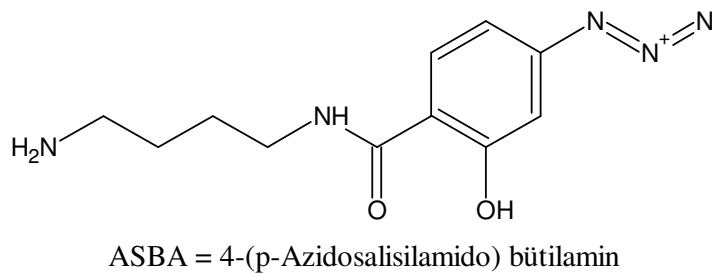
Bu tür çapraz bağlayıcılar bir ucunda fotoreaktif grupları diğer ucunda ise karbonil reaktif grupları içermektedir. Karbonil reaktif uçlar genel olarak hidrazid içermeye ve hidrazid grubu karbonile kendiliğinden saldırarak bağlanmaktadır. Karbonil grubuna yönelen ve fotoreaktif uç içeren çapraz bağlayıcıların en genel kullanılabilen ve ticari olarak ulaşılabilir olanı fenil azid fotoreaktif grup ve hidrazid fonksiyonel grubu içerenlerdir (Hermanson, 1996).



Şekil 5.25 Karbonil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren p-Azidobenzoil hidrazid

5.2.6 Karboksil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

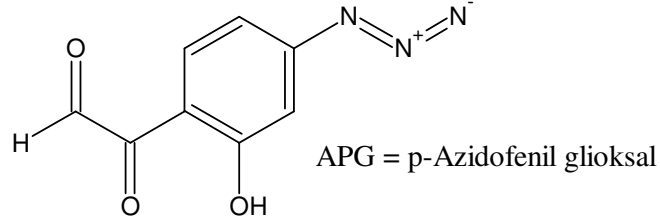
Karboksil grubuna saldıran diazoalkil türevleri ilk olarak floresans prob çalışmalarında kullanılmıştır. Günümüzde ise karboksil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren tek heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ASBA kısa adı ile bilinen 4-(p-Azidosalisilamido)bütülin'dir (Hermanson, 1996).



Şekil 5.26 Karboksil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren 4-(p-Azidosalisilamido) bütülin

5.2.7 Arginin Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Arginindeki guanido grupları; diketonlar gibi 1,2-dikarbonil reaktifleri kullanılarak spesifik olarak hedeflenebilmektedirler. Bazı koşullarda bu tür gruplar guanidil ucu ile kondenzasyon reaksiyonuna girip Schiff bazı benzeri kompleksler oluşturmaktadırlar (Hermanson, 1996).



Şekil 5.27 Arginin grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren p-Azidofenil glioksal

5.3 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

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

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

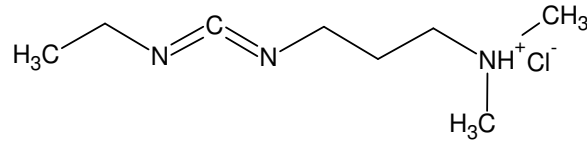
- Primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,
- Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,
- Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder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

5.3.1 Karbodiimidler

Peptid-protein, protein-protein, konjugatlarının oluşturulmasında kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilen karbodiimidlerdir. Suda çözünabilir ve çözünemeyen formlarının bulunduğu karbodiimidler; karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk ederler. Suda çözünabilir 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 çözünmemektedir (Hermanson, 1996).

5.3.1.1 EDC

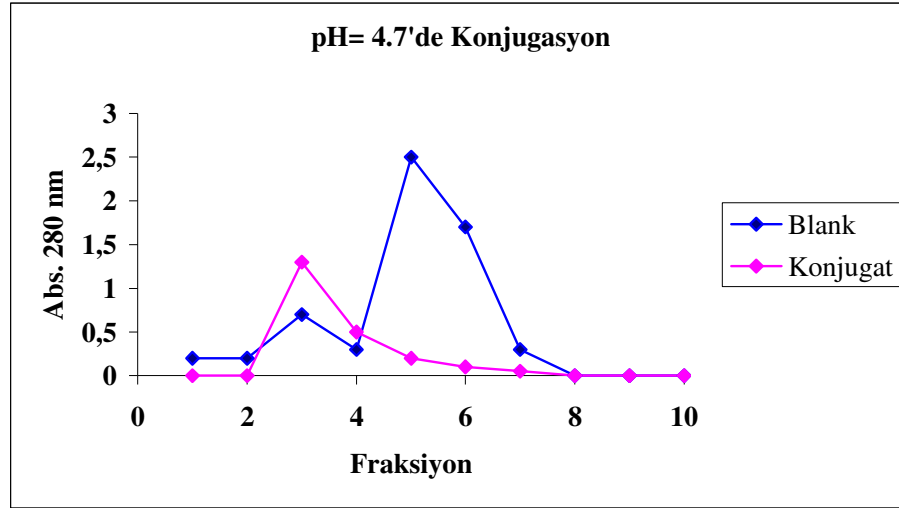
EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünabilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücünde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünabilir 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.



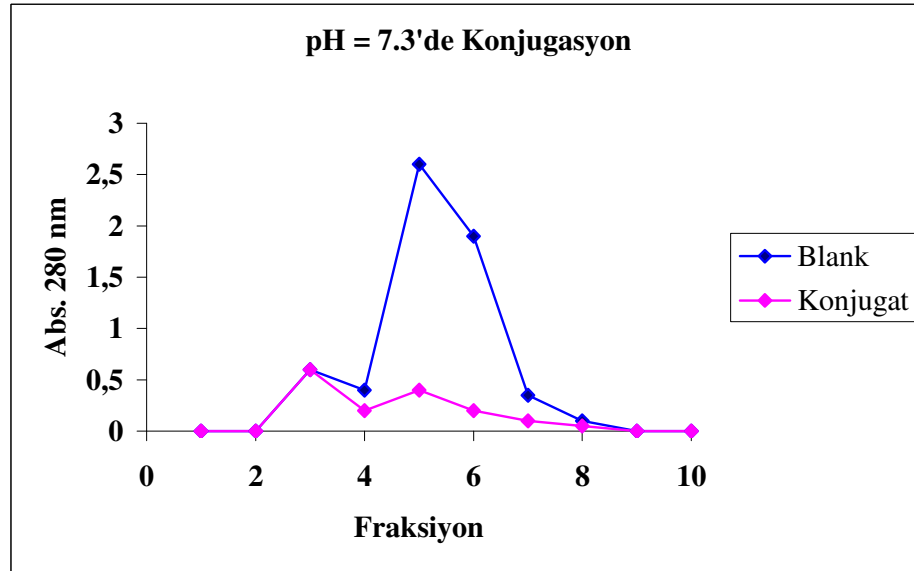
Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Yamada vd., 1981; Chase vd., 1983; Chu vd., 1976; Chu ve Ueno, 1977). Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu δ^+ yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisüre 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.

Ancak EDC peptidlerin proteinlerle konjugasyonu sırasında moleküllerin kendi içerisinde polimerizasyonu da söz konusudur. Örneğin peptid molekülü hem karboksil grubu hem de amino grubu içerdiğinden karbodiimid tarafından aktive edilen karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne yine peptid molekülünün amino grubu saldırabilmekte ve bunun sonucunda peptid-protein konjugatının yanı sıra peptidin oligomerlerinin oluşumu da söz konusu olabilmektedir. Birçok çalışmada karbodiimidler için refere edilen optimum pH aralığı 4,7 ile 6'dır. Bunun yanı sıra karbodiimid reaksiyonları pH 7,5'a kadar daha düşük

verimle de olsa gerçekleşebilmektedir. Aşağıdaki grafiklerde farklı pH değerlerinde bir ikili aminoasidden (Glisil-Tirozin) oluşan bir peptidin BSA ile EDC varlığında oluşturulan konjugatlarının Saphadex G 25 kolonda fraksiyonlarına ait sonuçlar verilmiştir. Burada blank olarak EDC eklenmemiş peptid BSA karışımı yani fiziki karışım ile karşılaştırma yapılmıştır. Birinci pikler taşıyıcı molekül olan BSA'ya ikinci pikler ise peptide aittir ve konjugasyon doğrultusunda peptid pikinin azaldığı görülmektedir (Şekil 5.28 ve Şekil 5.29, Hermanson, 1996).



Şekil 5.28 pH=4,7'de oluşturulan (♦) peptid-BSA konjugatı ve (♦) Fiziki karışımın Saphadex G-25 kolon fraksiyonları



Şekil 5.29 pH=7,3'de oluşturulan (♦) Peptid-BSA konjugatı ve (♦) Fiziki karışımın Saphadex G-25 kolon fraksiyonları

EDC ile konjugasyon reaksiyonlarında çözücü olarak su kullanılabilmekte ve pH ortamına HCl ilavesi ile sabitlenmektedir. Ancak çözücü olarak tampon kullanımı pH'ın reaksiyon süresince kontrolü söz konusu olamayacağından çok daha uygundur. Nötral pH'larda yapılacak konjugasyon için 0,1 M fosfat tamponu kullanılmaktadır ancak reaksiyon için amino ya da karboksilat içeren tamponlar (karbodiimid ile etkileşeceği için) uygun değildir.

Proteinlerin karboksil gruplarının EDC ile aktivasyonu sırasında bazı yan reaksiyonlar da oluşabilmektedir. Bunlardan bir tanesi yukarıda da değinildiği gibi peptid polimerizasyonu, diğerleri ise protein polimerizasyonu, EDC moleküllerinin peptid ya da protein yapısında açıkta bulunan sülfidril uçları ile reaksiyon girmesi (Carraway ve Triplett, 1970) ya da tirozin ucunun EDC ile reaksiyonu ve bunun sonucunda fenolat iyonu oluşumudur (Carraway ve Koshland, 1968).

Genel olarak EDC kullanılarak amino ve karboksil grupları içeren küçük peptid vb. moleküllerin proteinler ile konjugasyonu aşağıda verilen protokole göre yapılmaktadır. Protokol pH, kullanılan tampon, reaksiyona giren peptid ya da proteinin oranı, EDC'nin oranı değiştirilerek modifiye edilebilir. Bazı durumlarda ise protokol elde edilen konjugatın çözünürlüğünü ya da aktivitesini kaybetmemesi için modifiye edilmektedir. Örneğin hidrofobik bir peptidin protein yüzeyine kovalent konjugasyonu sırasında kısmi ya da tümüyle çökme problemi oluşabilmektedir. Bu problem EDC miktarının ya da ortama ilave edilen hidrofobik peptid miktarının düşürülmesi ile azaltılabilmektedir (Hermanson, 1996).

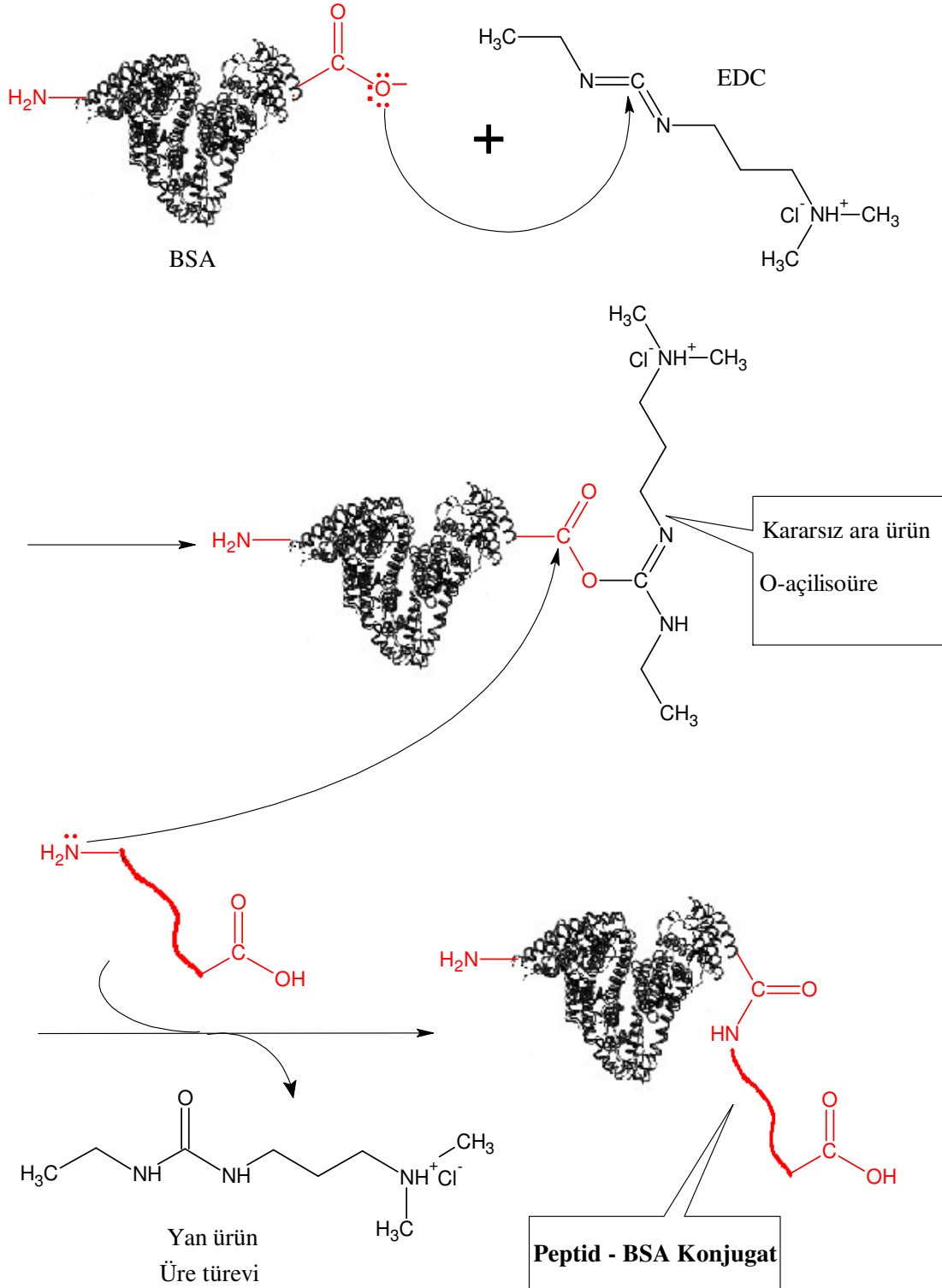
- 10 mg/ml konsantrasyonunda modifiye edilecek protein suda ya da fosfat tamponunda çözünür. Eğer daha az ya da daha fazla konsantrasyonda protein ile çalışılacak ise diğer reaktiflerin konsantrasyonları çalışılacak orana göre hesaplanarak eklenir.
- Konjugasyon yapılacak olan peptid de aynı çözücüde çözünür. Eğer belirli oranlar ile çalışılmıyor ise küçük molekül, reaksiyon ortamına proteinin en az 10 katı molar konsantrasyonda olacak şekilde eklenir. Eğer mümkün ise peptidin gereken miktarı direkt olarak protein çözeltisine ilave edilir. Az miktarlar ile çalışılacak ise peptidin stok çözeltisi hazırlanarak bundan reaksiyon için gereken miktar kullanılabilir.
- Eğer peptid çözeltisi ayrı olarak hazırlandı ise protein çözeltisine eklenir.
- Çözeltideki proteinin molar konsantrasyonunun 10 katı olacak şekilde ortama EDC ilave edilir. Eğer düşük miktarda EDC kullanılacak ise hemen tüketilmek

kaydı ile karbodiimidin stok çözeltisi hazırlanır ve gereken miktar bu çözeltiden eklenir.

- 2 saat oda sıcaklığında reaksiyon için bırakılır.
- Elde edilen konjugat jel filtrasyon ile ya da uygun bir tampon kullanılarak [birçok konjugat için 0.1 M sodyumfosfat tamponu (0.15 M NaCl, pH = 7.4) tercih edilir] diyaliz ile saflaştırılır. Eğer konjugasyon sırasında herhangi bir bulanıklık gözlenirse bu reaksiyon bitiminde santrifüj ile uzaklaştırılabilir. Ancak EDC ile immunojen konjugatların oluşturulması sırasında oluşan bu bulanıklık genel olarak sorun yaratmamaktadır çünkü çökelti halindeki bu immunojenik konjugatlar suda çözünebilir olanlarına göre daha yüksek immunojenlik göstermektedir (Hermanson, 1996).

Tüm bu yöntemler kullanılarak elde edilen konjugatların saflaştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Bölüm 5.4'te detaylı olarak anlatılmıştır.

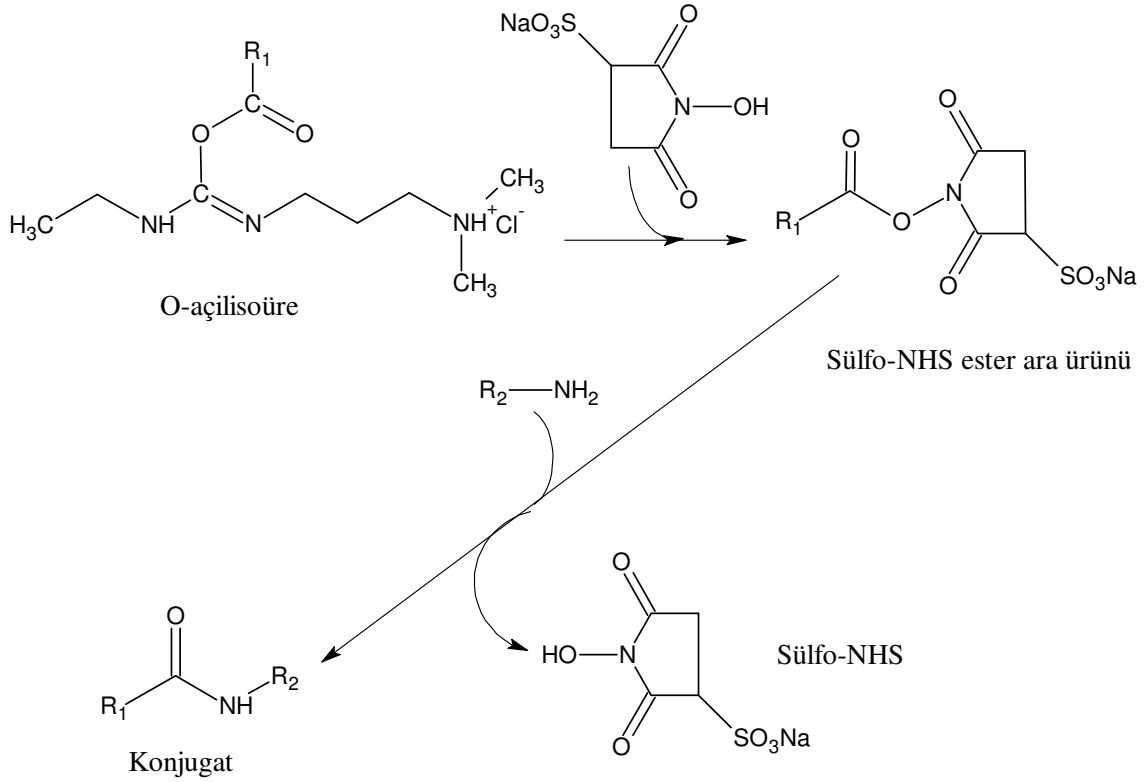
EDC ile Konjugasyonun Genel Reaksiyon Mekanizması



Şekil 5.30 EDC kullanılarak sentezlenen Peptid-BSA konjugatı reaksiyon mekanizması

5.3.1.2 EDC Plus Sülfo-NHS

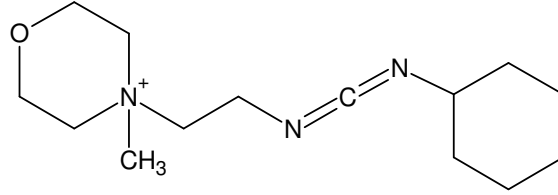
Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler; karboksil grubu ile aktif ester ara ürünü oluşturmak için suda çözünebilir sülfo-NHS ile birlikte kullanılırlar (Hermanson, 1996). Önce karbodiimid ile karboksil grubunun reaksiyonu sonucu O-açilisöre kararsız ara ürünü oluşur sonrasında sülfo-NHS ile bu ara ürünün reaksiyonundan sülfo-NHS ester ara ürünü oluşur ve bu ara ürünün primer amino grubu ile reaksiyona girmesi sonucu amid bağı üzerinden ile konjugat elde edilir.



Şekil 5.31 EDC Plus Sülfo-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

5.3.1.3 CMC

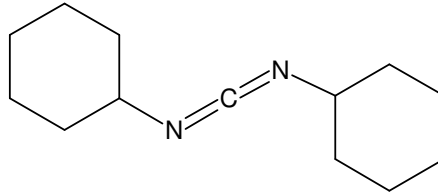
Suda çözünebilir özellikteki 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin konjugasyonunda kullanılmaktadır. Moleküle suda çözünebilme özelliğini sağlayan yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubudur (Hermanson, 1996).



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

5.3.1.4 DCC

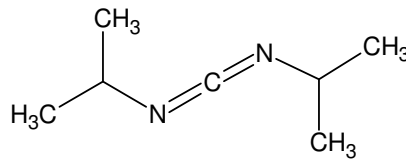
Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir ve 80 °C'a kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilir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



DCC = N,N' Disiklohegzil karbodiimid

5.3.1.5 DIC

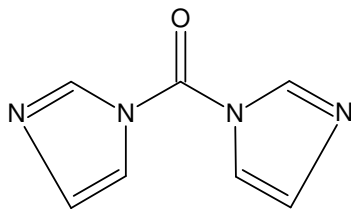
Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir (Hermanson, 1996).



DIC = Diizopropil karbodiimid

5.3.2 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

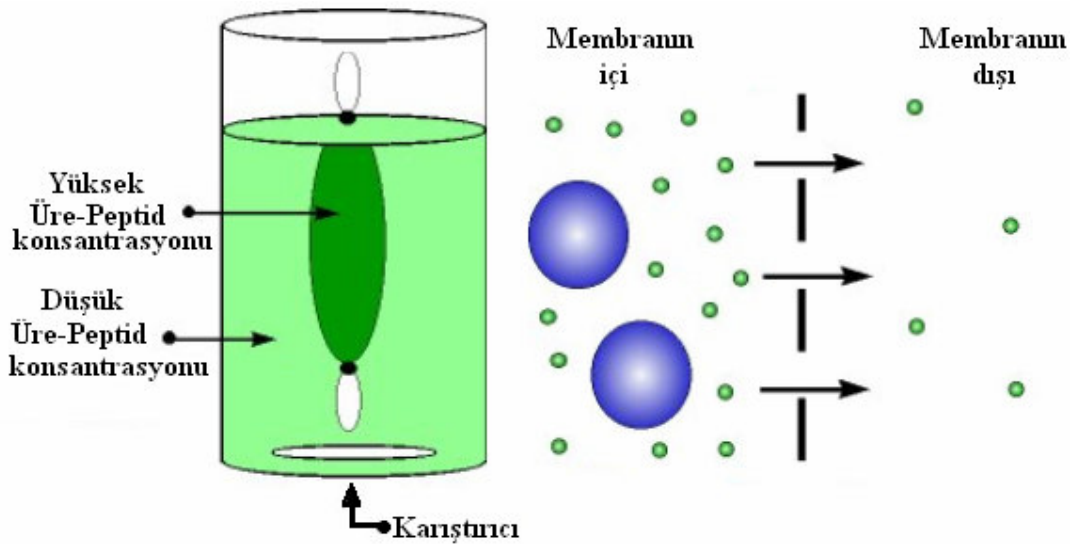
5.4 Konjugatların Saflaştırılması

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

5.4.1 Diyaliz

Diyaliz protein çözeltilerinde küçük iyonların veya moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Peptid-Protein konjugatlarının diyaliz işlemindeki asıl amaç, oluşan üre türevlerinin, reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlalarının ya da serbest peptidin ortamdan uzaklaştırılmasıdır ve aktivite kayıplarını en aza indirmek amacıyla diyaliz işlemi 4 °C'da gerçekleştirilir.

Diyalizde kullanılan yarı geçirgen diyaliz tüpleri genelde gözenek (por) çapı 1-20 nm arasında olan selüloz asetatından üretilmektedir. Şekil 5.32'de [14] şematik olarak gösterilen diyaliz işleminin temel prensibi, tüm maddelerin, kimyasal potansiyellerinin (madde akımının yürütücü kuvveti) büyük olduğu yerden küçük olduğu yere doğru kendiliğinden akmasıdır. Diyaliz işleminde küçük moleküllerin geçişi, membranın her iki yüzeyinde kimyasal potansiyel farkı eşit oluncaya kadar devam eder. Kimyasal potansiyellerin her iki tarafta birbirine eşit olduğu durumda dinamik denge söz konusu olur ve madde geçişi denge halinde devam ettiğinden konsantrasyon değişimi söz konusu olmaz.



Şekil 5.32 Diyaliz işleminin şematik görünümü

5.4.2 Moleküler Eleme Kromatografisi

Moleküler eleme kromatografisi Bölüm 6.2’de detaylı olarak anlatılmıştır.

5.4.3 Gaz Basıncı Filtrasyon

Ayrılacak olan moleküllerin boyutlarına ve membranların tipik ayırma performanslarına göre en uygun ayırıcı membran seçilmelidir. Membran seçiminden sonra filtrasyon için seçilen gözenek boyutlarına sahip membran filtrasyon yapılacak aparata takılır manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıcı ve basıncın da yardımı küçük moleküller (Sentetik peptid, üre türevleri, EDC, İmidazol) membranın altına geçerken büyük moleküller ise membranın üst kısmında (BSA ya da konjugat) kalır ve böylece konjugat saflaştırılmış olur.

5.4.4 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip membranları 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 [15].

6. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

6.1 UV-VIS Spektroskopisi

Önemli birçok biyolojik molekül ultraviyole ışığı absorplamaktadır. Proteinlerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonun ve saflığının tayininde kullanılmaktadır. Proteinler UV bölgede iki absorbands pikine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi 215-230 nm'de (peptid bağının absorpsiyonundan kaynaklanan), diğeri de 280 nm [yapıdaki aromatik aminoasidlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) absorbandsından kaynaklanan] gözlenmektedir [16]. Proteinlerin ultraviyole ışığı absorplaması özelliğinden yola çıkılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonlarının saptanmasında, UV-VIS Spektroskopisi oldukça yaygın kullanılmaktadır.

Absorpsiyon, saydam ortamda atom veya moleküllerin elektromagnetik ışımının bazı frekanslarının seçimli olarak şiddetini azaltmasıdır. Kalınlığı b cm olan tüp içerisindeki, c konsantrasyonlu çözeltiden tek renkli (monokromatik) P_0 şiddetindeki ışık geçirildiğinde, ışık demeti çözeltideki moleküller tarafından absorplanır ve ışık demeti tüpü P şiddetinde, şiddeti azalmış olarak terk eder. Lambert-Beer eşitliği bu azalmayı aşağıdaki şekilde ifade etmektedir (Çimen, 2006).

$$\log P_0/P = A \quad (A = \text{Absorbans ya da Optik yoğunluk}) \quad (6.1)$$

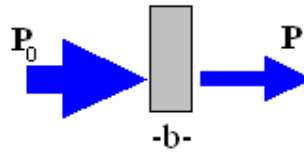
$$A = a.b.c \quad (6.2)$$

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

$A = a.b.c$ eşitliği de

$$A = \epsilon bc \quad (6.3)$$

halini alır.



Şekil 6.1 P_0 şiddetindeki ışığın b cm kalınlığında c konsantrasyonundaki bir çözeltiden geçerken şiddeti azalmaktadır

Absorbans;

$$A = \log P_0/P \quad (6.4)$$

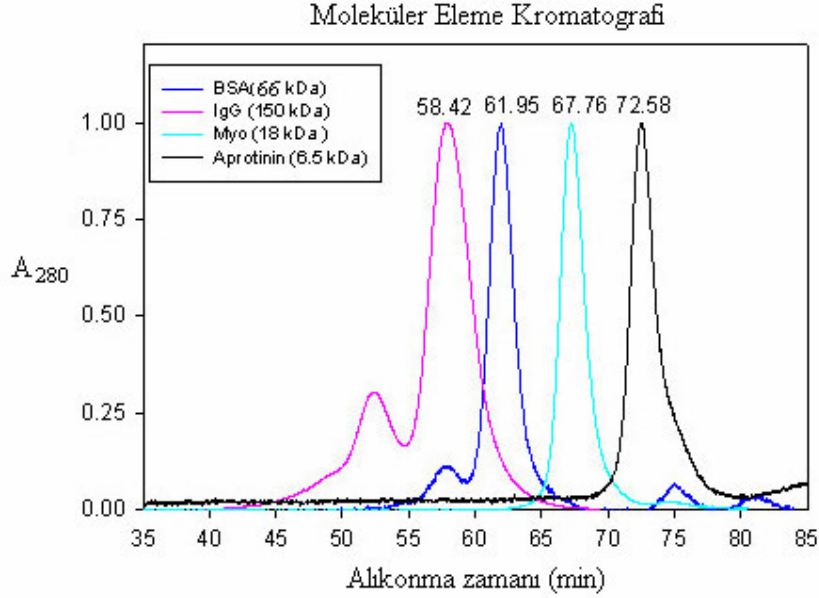
Protein çözeltileri için 280 nm'deki absorbans ile derişim arasında doğru orantılı bir ilişki vardır ve bundan yararlanarak protein çözeltilerinde konsantrasyon tayini yapılmaktadır.

6.2 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 [17]. 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 6.2) [18]. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite, Işık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.

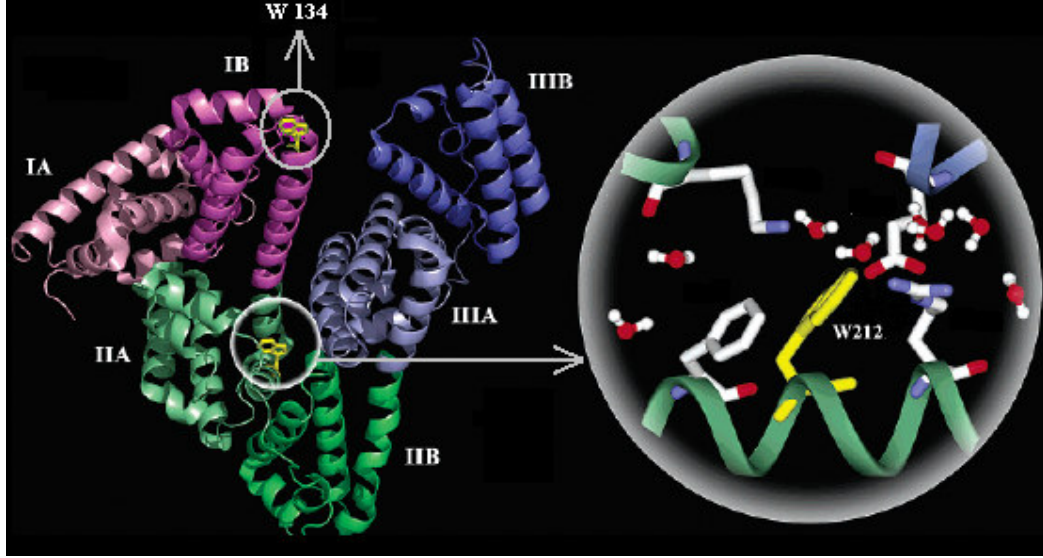


Şekil 6.2 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram

6.3 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 BSA'nın floresans özelliği; yapısında 134 ve 212 pozisyonlarda bulunan iki adet Triptofan'dan kaynaklanmaktadır. Bunlardan 134. konumdaki Triptofan daha dışta olduğundan etkileşimlere daha açıktır. 212. konumdaki Trp ise molekülün daha içinde kalmaktadır (Mustafaev vd., 2002).



Şekil 6.3 BSA molekülünde bulunan Triptofanların konumu (Qui vd., 2006)

Kullanılan şap peptidlerinin dizilimlerinde ise Triptofan bulunmamaktadır. Ancak konjugasyon mekanizmasının ve oluşumunun floresans spektroskopisi ile saptanabilmesi için sentezlenen peptid dizilerinin N- ucuna Trp eklenmiştir.

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

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (6.5)$$

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 ışığının $\lambda_{\max}$ değeri de buna bağlı olarak küçülecek ve blue shift verecektir.

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

6.4 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

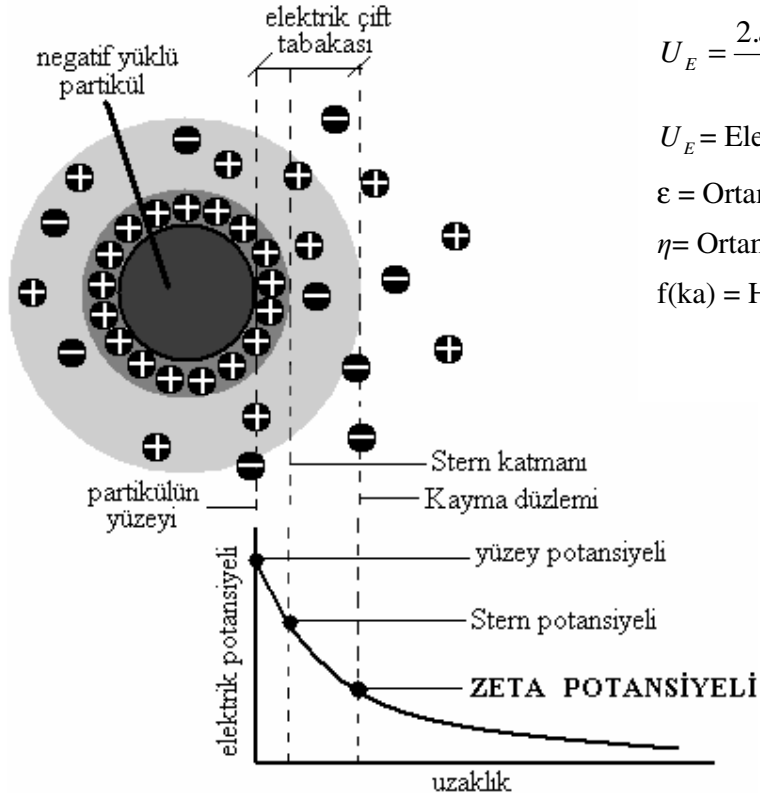
En az bir boyutu 1nm–1µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir.

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. Vizkozitenin 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.

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad k = \text{Boltzman Sabiti, } T = \text{Mutlak sıcaklık, } \eta = \text{Çözücü vizkozitesi} \quad (6.6)$$

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. Vizkozitenin 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 BSA molekülü temel alınmıştır. BSA 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.



$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta} \quad (6.7)$$

U_E = Elektroforetik hareketlilik,

ϵ = Ortamın dielektrik sabiti,

η = Ortamın vizkozitesi ve

$f(ka)$ = Henry Fonksiyonu

Şekil 6.4 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual)

7. DENEYSEL KISIM

7.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

7.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hanna Instruments pH 211
- WTW pH level 1 pH metre
- Precisa XB 220A Hassas Terazî
- Sartorius CP 225D
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos
- Heildolph MR 3001 Isıticılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Finnpiette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Partikül boyut ölçüm cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrofluorometre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı

7.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Aşağıda belirtilen bütün kimyasallar satın alındığı gibi kullanılmış olup herhangi bir ön işleme tabi tutulmamışlardır.

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Kodu
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 170-188 dizilimli sentetik peptidi	Sigma	
Şap hastalığı VP1 kapsid proteini 135-161 dizilimli sentetik peptidi	Sigma Genosys	
Bovin serum albumin, (BSA)	Sigma	A-4503
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
1-Metil imidazol (NMI)	Sigma	M-8878
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Amresco	0231
Asetik asit, (CH ₃ COOH)	Riedel-de Haën	27225
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430

7.2 Şap Hastalığı 170-188 Dizilimli Sentetik Peptid Sentezi

Konjugasyonda birinci peptid olarak; Sigma tarafından Fmoc Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile % 91 saflıkta sentezlenen Şap hastalığı VP1 Kapsid Proteini 170-188 (Trp-Ala-Thr-Asp-Ile-Ser-Glu-Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu-Tyr-Cys-Pro) dizilimli sentetik peptidi kullanılmıştır.

7.3 Şap Hastalığı 135-161 Dizilimli Sentetik Peptid Sentezi

Konjugasyonda kullanılan bir diğer sentetik peptid ise; Sigma tarafından Fmoc Solid Phase (Katı Faz)Yöntemi ile % 89 saflıkta sentezlenen Şap hastalığı VP1 Kapsid Proteini 135-161 (Trp-Ser-Lys-Tyr-Ser-Thr-Thr-Gly-Glu-Arg-Thr-Arg-Gly-Asp-Leu-Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Thr-Gln-Leu-Pro-Ala) dizilimli sentetik peptiddir.

7.4 Peptid/BSA Konjugatları

Deneysel çalışmalarda iki farklı peptid ile 6 farklı yöntem denendi bunlardan en iyi sonuç alınan yöntemle $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}$ oranı = 1,3,5,7 ve 9 olmak üzere 5 farklı oranda konjugatlar sentezlendi ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC, Viscotek Floresans ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

7.4.1 Konjugasyonda Kullanılan Çözeltiler

- **0.01 mol/l'tik PBS Tamponu (pH=7)**

2.6807g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268.07$ g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 1.56g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=156.01$ g/mol) tartılarak 450 mL ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 mL'lik NaH_2PO_4 çözeltisi 1 Lt'lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH ya da 1 M HCl kullanılarak pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 1 Lt olacak şekilde hacim tamamlanır.

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

Hesaplama : $d=1.03$ g/ml $M_w=82.1$ 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 ultra saf su ilave edildi. pH ölçüldü (10.3) ve pH 2M NaOH kullanılarak 5.65'e ayarlandı. Son hacim ultra saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

7.4.2 Hesaplamalar

Konjugasyon için; BSA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı peptid konsantrasyonlarına sahip peptid çözeltileri ile çalışılmıştır. 170-188 dizilimli sentetik peptid için 3 (1,3,5) 135-161 dizilimli sentetik peptid için 5 (1,3,5,7,9) farklı orana sahip konjugat sentezlenmiştir. Konjugatlar için hesaplamalar aşağıda gösterilmektedir.

- 170-188 dizilimli sentetik peptid için;

$$\frac{n_{pep}}{n_{BSA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{BSA}}{c_{BSA} \cdot M_{pep}} = 1; 3; 5$$

- 135-161 dizilimli sentetik peptid için;

$$\frac{n_{pep}}{n_{BSA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{BSA}}{c_{BSA} \cdot M_{pep}} = 1; 3; 5; 7; 9$$

BSA'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 0.5 mg/mL (% 0.05 sabit) olarak çalışılmıştır.

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

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

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

- 170-188 dizisi için;

1. $n_{pep}/n_{BSA} = 1$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{BSA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{BSA}}{M_{pep} \cdot c_{BSA}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{xmg}{12ml} \cdot 66000}{2395 \cdot \frac{6mg}{12ml}}$$

$$\Rightarrow x = 0.217 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

2. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 3$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2395 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 0.651 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

3. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 5$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2395 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 1.085 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

- 135-161 dizisi için;

1. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 1$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2975 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 0.27 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

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

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

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

3. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 5$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2975 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 1.35 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

4. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 7$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 7 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2975 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 1.89 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

5. $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 9$ olan 12 mL Pep-BSA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

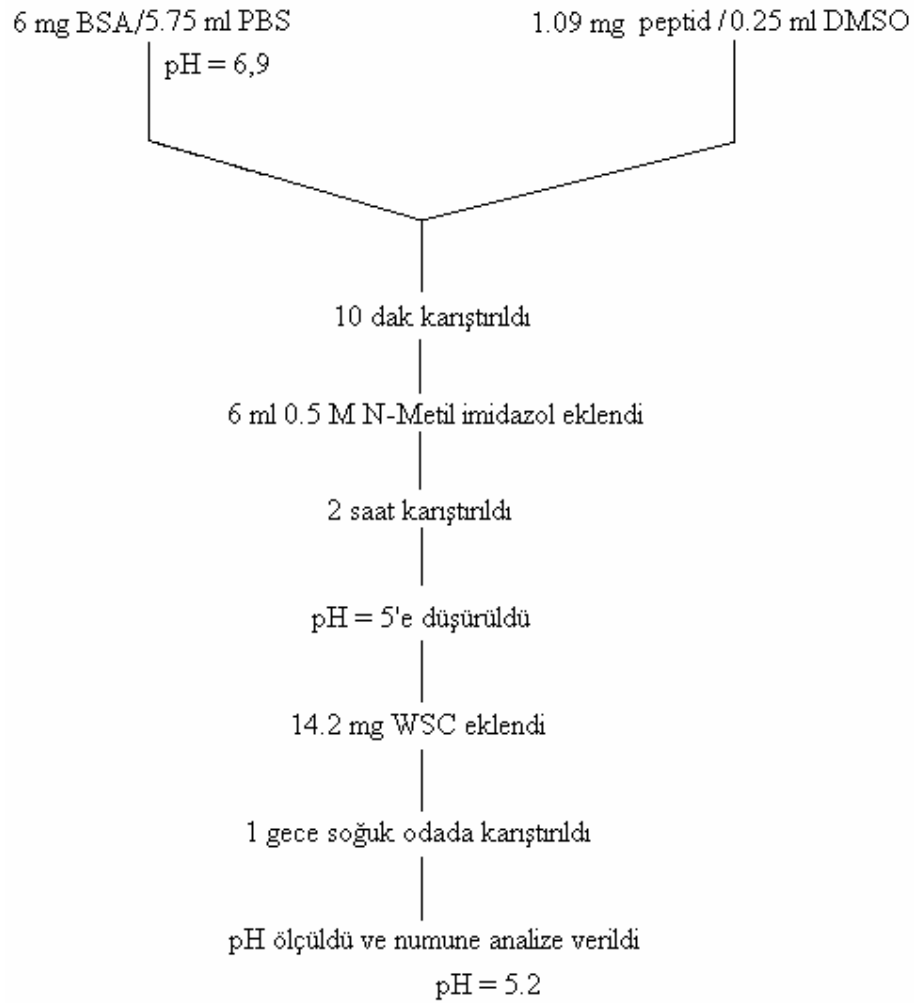
$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{BSA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{BSA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{BSA}}} \Rightarrow 9 = \frac{\frac{x \text{mg}}{12 \text{ml}} \cdot 66000}{2975 \cdot \frac{6 \text{mg}}{12 \text{ml}}}$$

$$\Rightarrow x = 2.43 \text{ mg peptid/12 mL'de}$$

7.5 170-188 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı

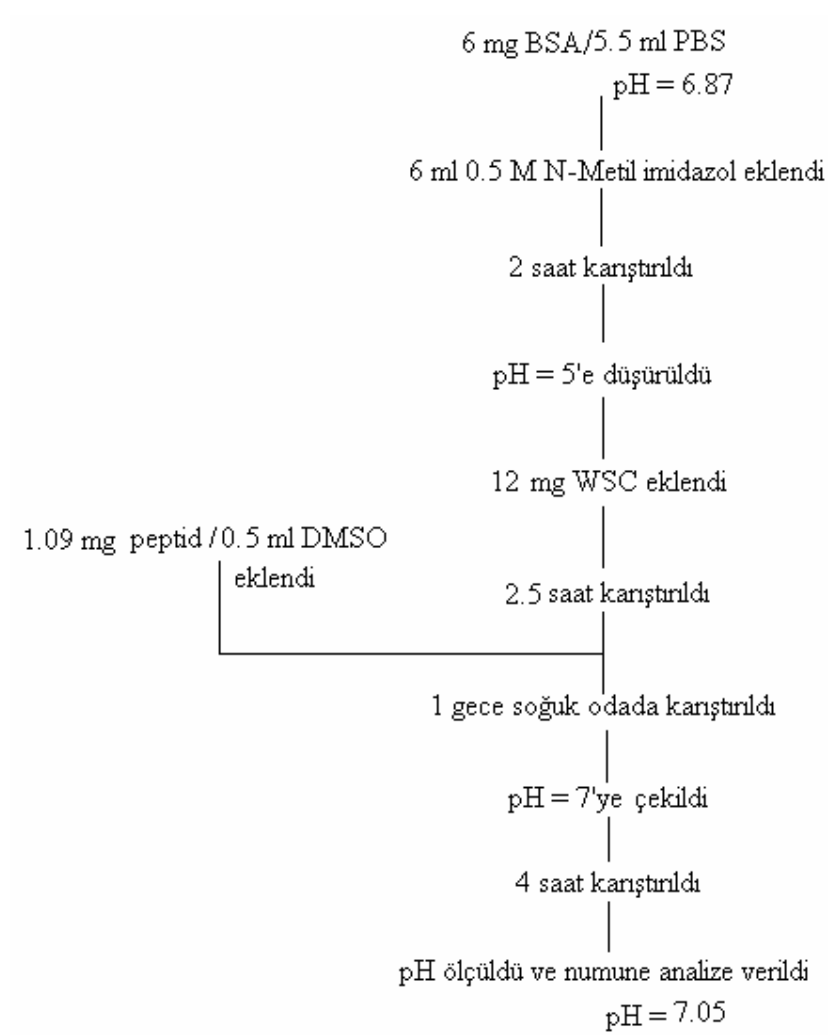
Deneylerde 170-188 peptid dizisi için öncelikle $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 5$ oranında ve ikisi fiziksel karışım yolu ile kompleks oluşumu olacak şekilde 6 farklı reaksiyon yöntemi uygulanmış bunlardan HPLC ve Viscotek sonuçlarına göre en iyi konjugasyon gözlemlediğimiz yöntem seçilmiş ve 170-188 dizisi ile yapılan tüm konjugatlar bu yöntem kullanılarak sentezlenmiştir.

7.5.1 1. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



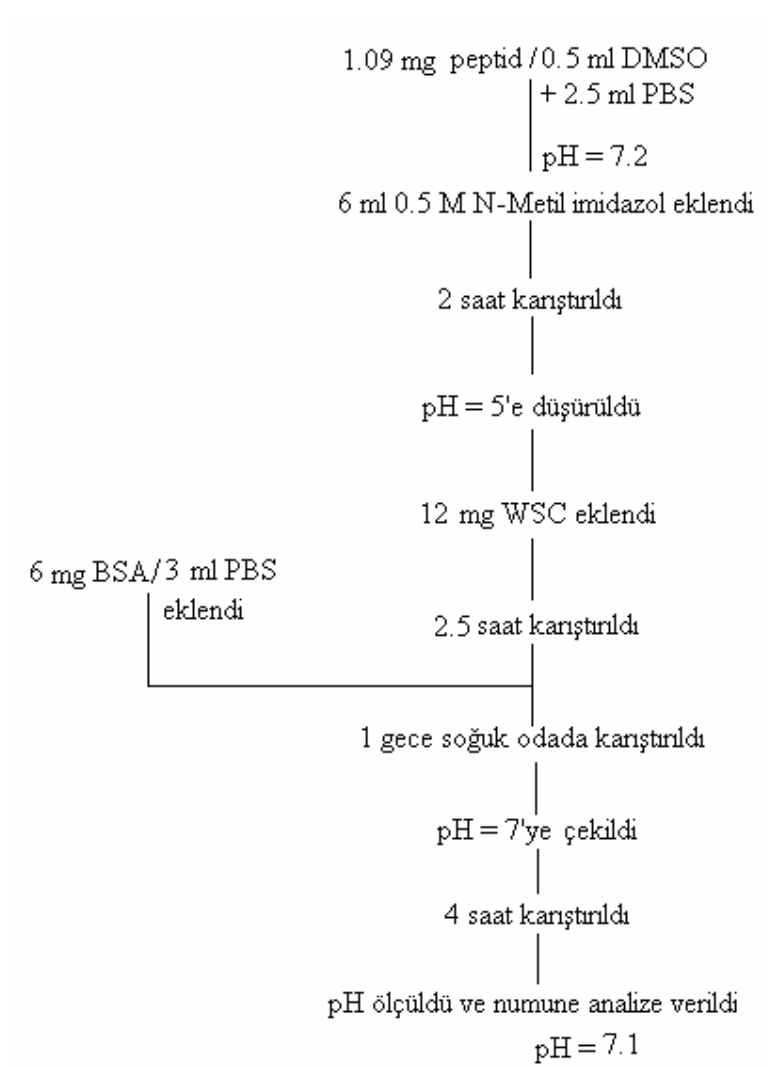
Şekil 7.1 1.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.5.2 2. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



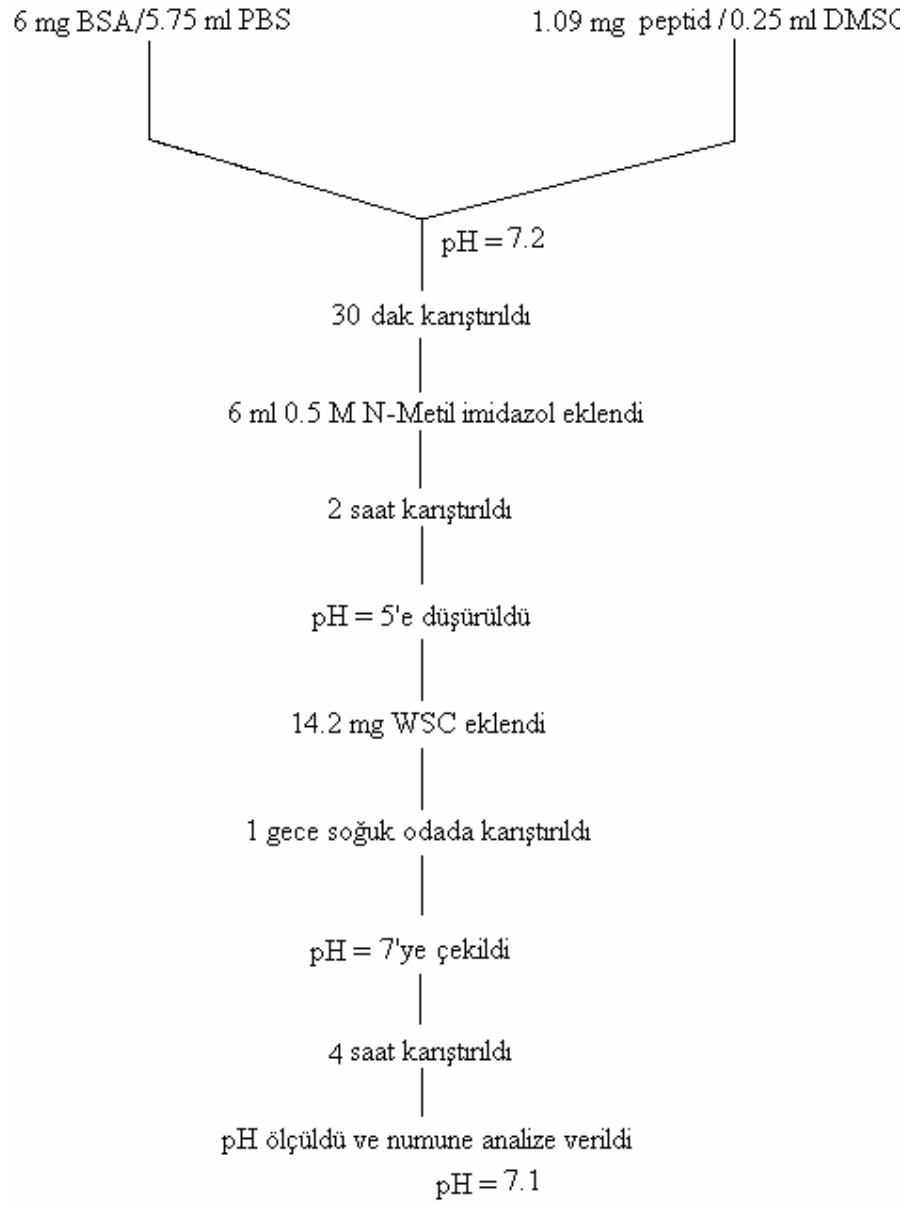
Şekil 7.2 2.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.5.3 3. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



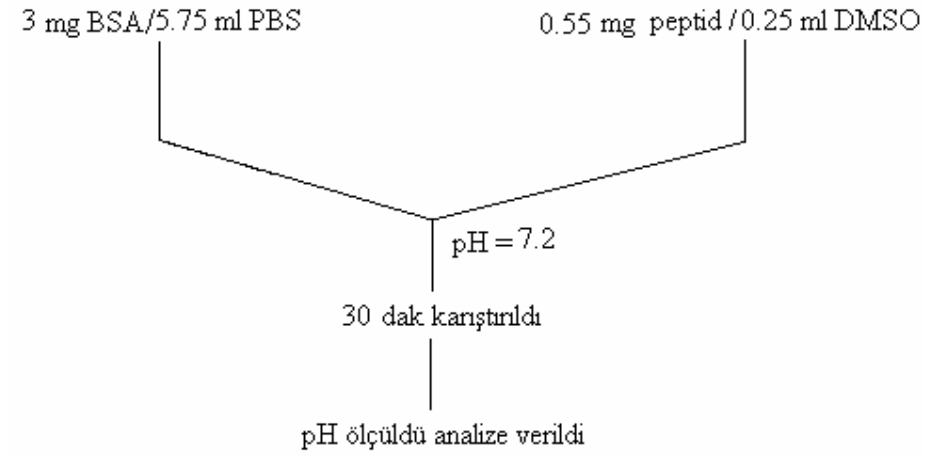
Şekil 7.3 3.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.5.4 4. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



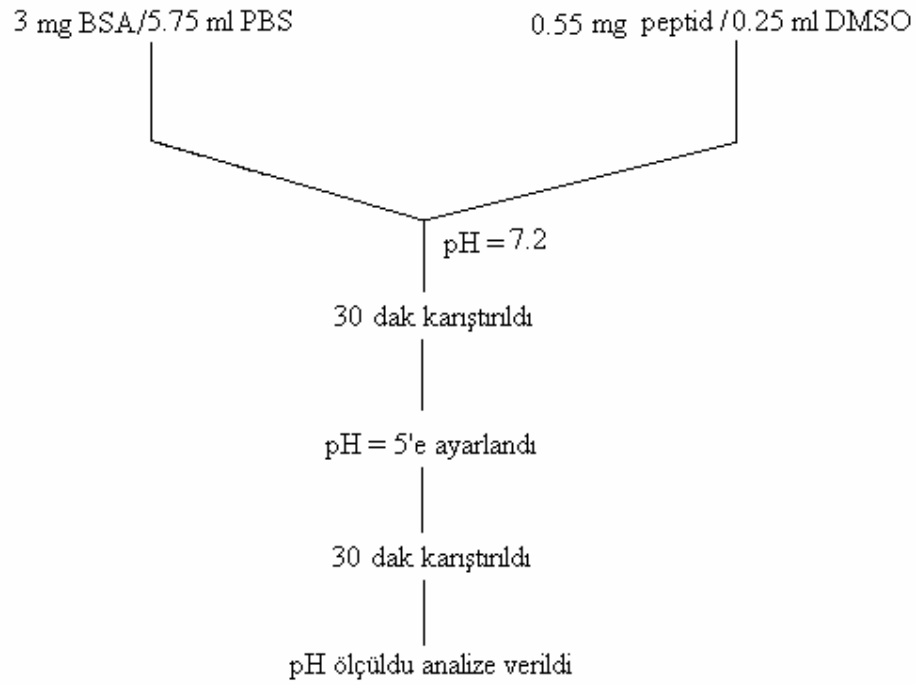
Şekil 7.4 4.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.5.5 5. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



Şekil 7.5 5.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.5.6 6. Yönteme Göre Komplekslerin Hazırlanışı

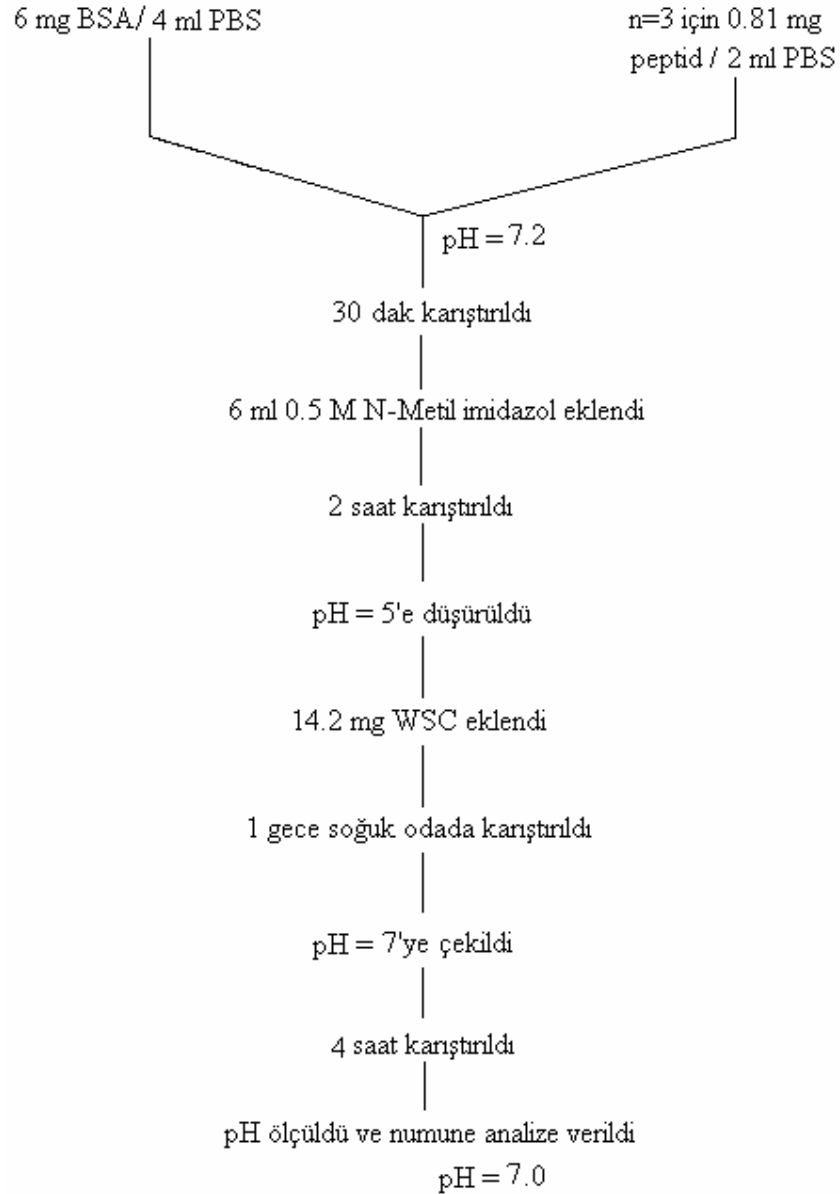


Şekil 7.6 6.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.6 135-161 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı

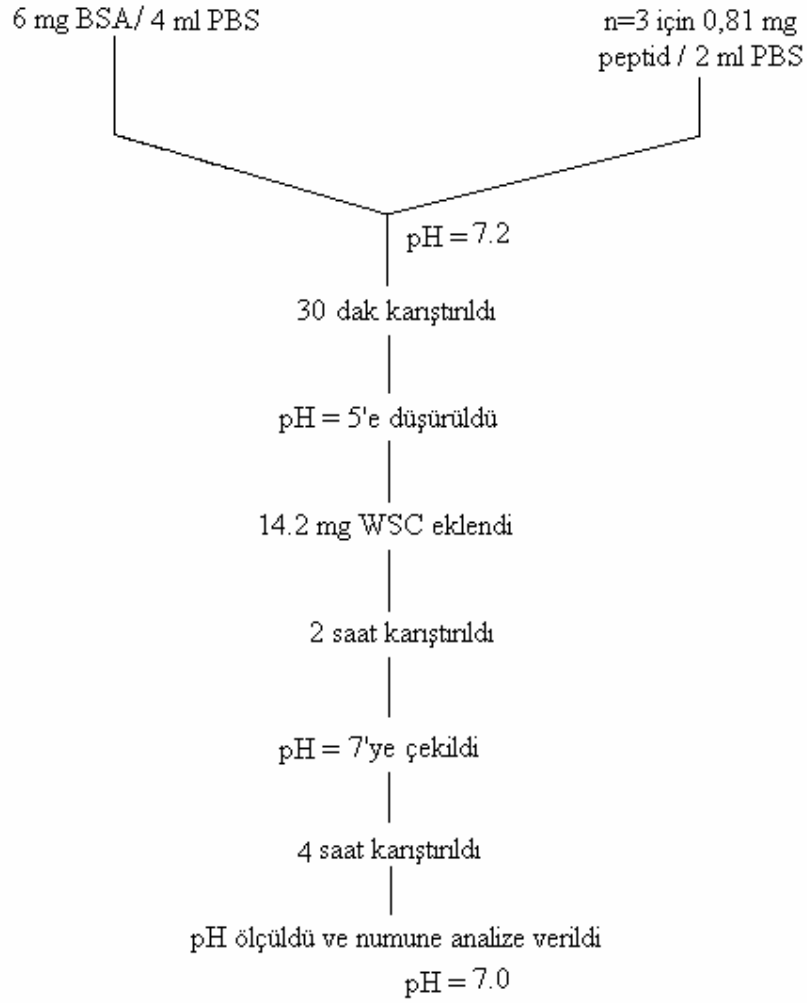
Deneylerde 135-161 peptid dizisi için 170-188 dizilimli peptidde en iyi sonuç alınan 4. yöntemle göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}} = 1,3,5,7,9$ oranlarında ve 7. yöntemle (NMI yok ve 2 saat aktivasyon) göre $n=3$ oranında konjugatlar sentezlenmiştir.

7.6.1 4. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



Şekil 7.7 4.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.6.2 7. Yönteme Göre Konjugatların Hazırlanışı



Şekil 7.8 7.Yönteme göre konjugat sentezi basamakları

7.7 UV-VIS Spektrofotometre Ölçümleri

Konjugasyon olduktan sonra bulanıklık gözlediğimiz bazı konjugat çözeltilerinin 400 nm deki absorbansları ölçüldü. Sonrasında bu çözeltiler santrifüj edilip çökeltiler ayrıldıktan sonra üst kısımların 280nm'deki absorbanslarına bakıldı.

7.8 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri

Bulanıklık gözlemlenmeyen konjugat çözeltileri direkt olarak, bulanık çözeltiler ise santrifüj edildikten sonra, 0.45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek HPLC cihazına verilmiştir. 25 °C'de, 1.0 mL/dk akış hızında, 20 µL enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV detektörüyle (280 nm'de) çalışılmıştır. pH = 7'deki konjugatlar için PBS tamponu, pH = 5'deki konjugatlar için ise Asetat tampunu (pH=5) hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

7.9 4 Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografi (Viscotek) Analizleri

Bulanıklık gözlemlenmeyen konjugat çözeltileri direkt olarak, bulanık çözeltiler ise santrifüj edildikten sonra, 0.45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek Viscotek cihazına verilmiştir. 25 °C'de, 0.8 mL/dk akış hızında, 100 µL enjeksiyon hacminde ve TSK Gel G3000 SW_{XL} kolonunda UV (280 nm'de), Kırılma İndisi, Işık Saçılması ve Vizkozite detektörleri ile çalışılmıştır. pH = 7'deki konjugatlar için PBS tamponu, pH = 5'deki konjugatlar için ise Asetat tampunu (pH=5) hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

7.10 Floresans Spektrofotometre Ölçümleri

Elde edilen konjugatların 1/12 oranında seyreltimle elde edilen çözeltilerinin floresans emisyon spektrumları QM-4/2005 Steady State Spektrofluometre kullanılarak, 2 nm slit aralığı ve 280 nm'de uyarma yapılarak alınmıştır.

7.11 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

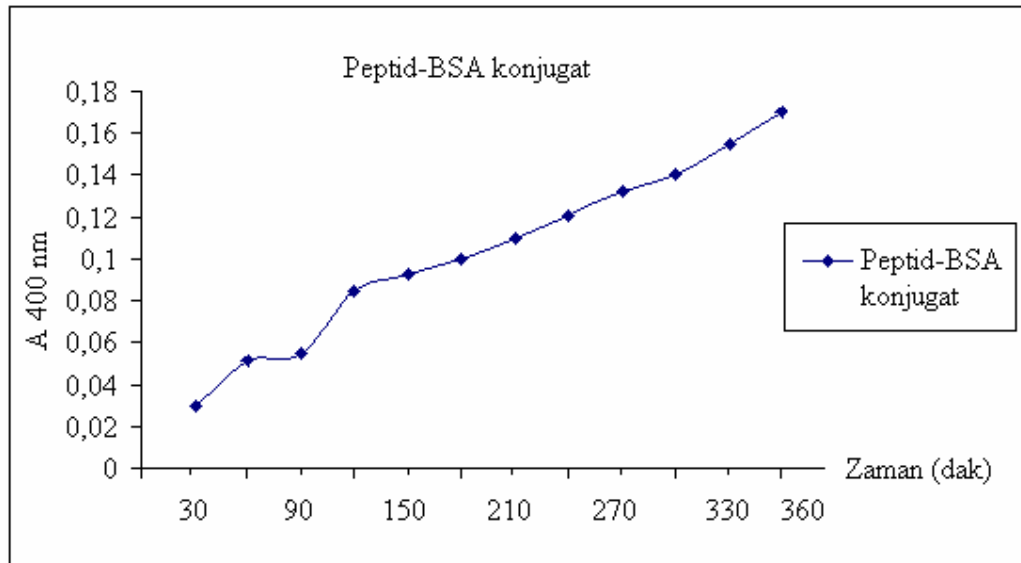
Elde edilen konjugatların yaklaşık % 0.1 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan çözeltileri 0,22 µm lik membranlardan filtre edilerek Malvern Nano ZS Zetasizer cihazına verilmiş ve Zeta Potansiyeli ile boyut ölçümleri yapılmıştır.

8. DENEY SONUÇLARI

8.1 170-188 Dizilimli Peptid-BSA Konjugatlarına Ait UV Ölçümü

170-188 dizilimli sentetik peptid ile BSA'nın 4. Yönteme göre elde edilen konjugatları için 400 nm'de bulanıklık ölçümleri yapılmış ve bu ölçümler sonucu konjugat oluşumunda agregatlaşmanın da mevcut olduğu 400 nm'de ölçülen absorpsiyon değerinin yaklaşık 8 kat artması ve 0,165 değerine ulaşması ile gösterilmiştir (Şekil 8.1). Çözeltide oluşan bulanıklık santrifüj ile giderilmiş ve çökeltilinin uzaklaştırılması sonucu elde edilen sıvı fazlar analize verilmiştir.

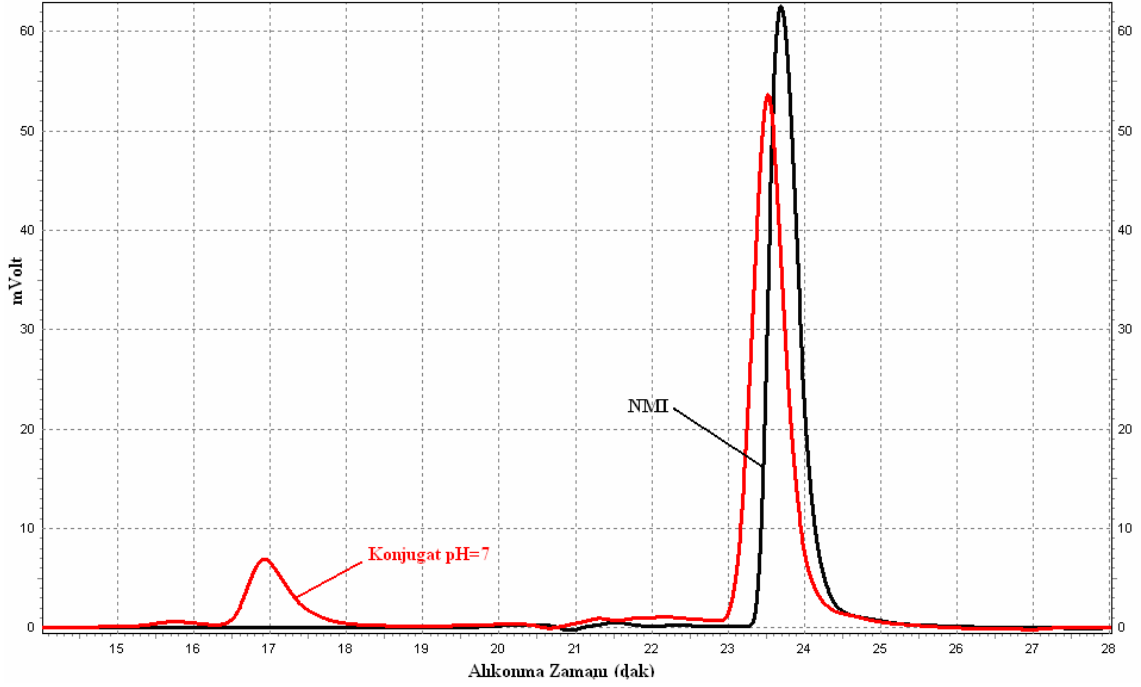
Çalışmamız süresince bulanıklık gözlenen tüm konjugatlar önce santrifüj edilmiş daha sonra HPLC, Viscotek, Floresans ve Zeta sizer cihazları ile analiz edilmiştir.



Şekil 8.1 (♦) Peptid-BSA n=3 konjugatının zamana bağlı UV absorpsiyonu (400 nm)

8.2 170-188 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin HPLC-Viscotek ve Floresans Sonuçları

170-188 dizilimli sentetik peptid ile BSA'nın 4. Yönteme göre elde edilen konjugatı ve tek başına NMI (N-metil imidazol)'e ait HPLC kromatogramları Şekil 8.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Daha sonraki HPLC ve Viscotek kromatogramlarda, konjugatlara ait piklerin daha detaylı görünebilmesi için NMI piki tam boyut ile gösterilmeyecektir.

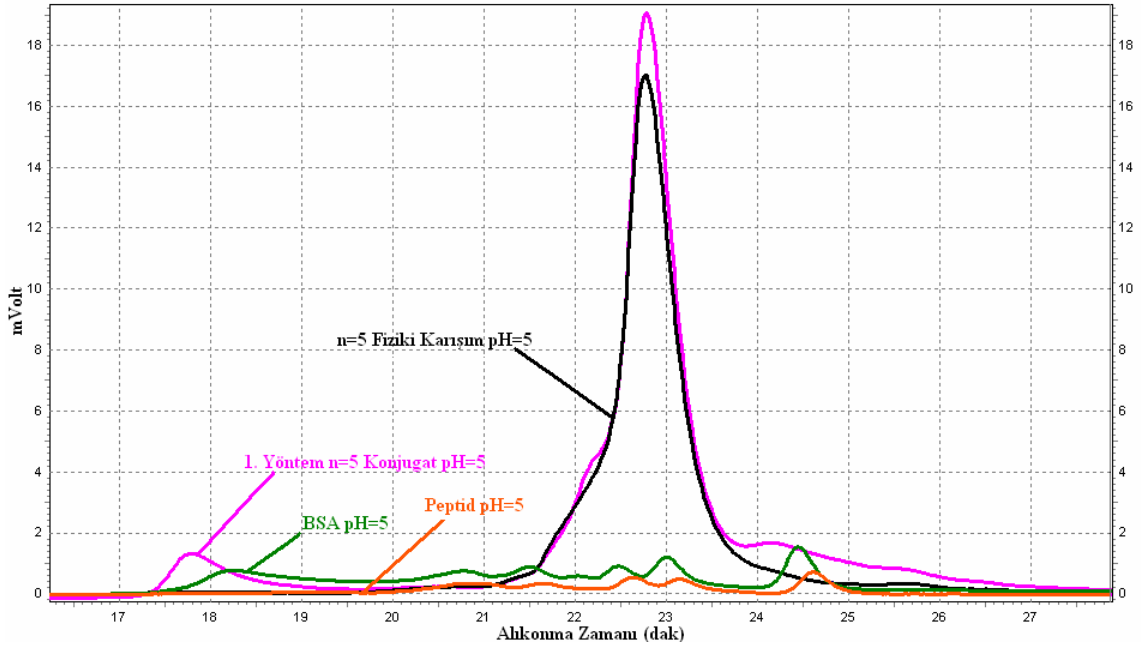


Şekil 8.2 (♦) NMI'a ait kromatogram ve (♦) pH 7'de hazırlanan konjugatlar için NMI pikinin geliş zamanı

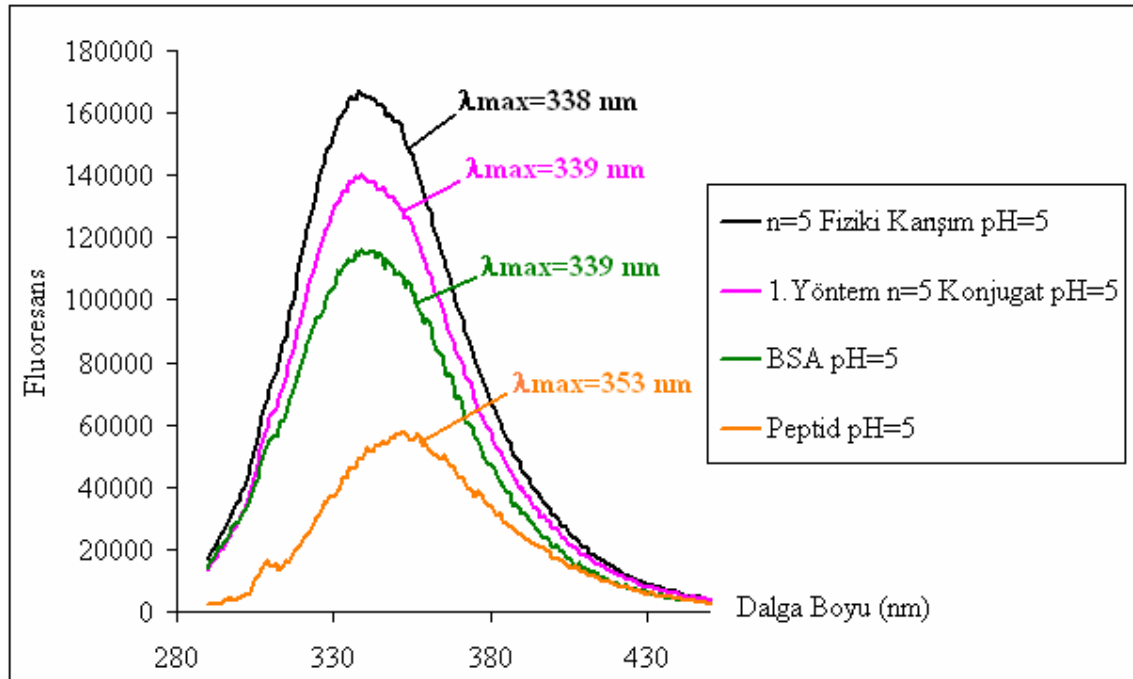
1. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarlarda peptid DMSO'da, BSA ise PBS tamponunda (toplam hacim 6 mL olacak şekilde) çözünmüş sonrasında 6 mL 0,5 M NMI çözeltisi eklenmiş ve pH 5,8 olarak ölçülmüştür. Daha sonra pH damla damla HCl eklenerek 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karboksil gruplarının bir gece aktivasyonu yapılmış ve ertesi gün elde edilen konjugatlar HPLC, Floresans ve Viscotek cihazları ile analiz edilmiştir.

Elde edilen HPLC kromatogramında pH=5 değerinde BSA ve peptid moleküllerine ait piklerin şiddetlerinin oldukça düştüğü ve piklerin yayıldığı gözlenmiş ve bu yöntemin BSA ile peptidin konjugasyonu ve çalıştığımız cihazlar ile analiz için çok verimli olmadığı düşünülmüştür (Şekil 8.3).

Aynı konjugata ait Floresans spektrumunda ise BSA'nın 339 nm'de Pepid'in ise 353 nm'de maksimum absorpsiyon yaptığı görülmüş pH=5'de oluşturulan fiziki karışım ve konjugatların emisyonlarındaki λ_{max} değerinin daha küçük dalga boyuna doğru kaydığı gözlenmiştir (Şekil 8.4).



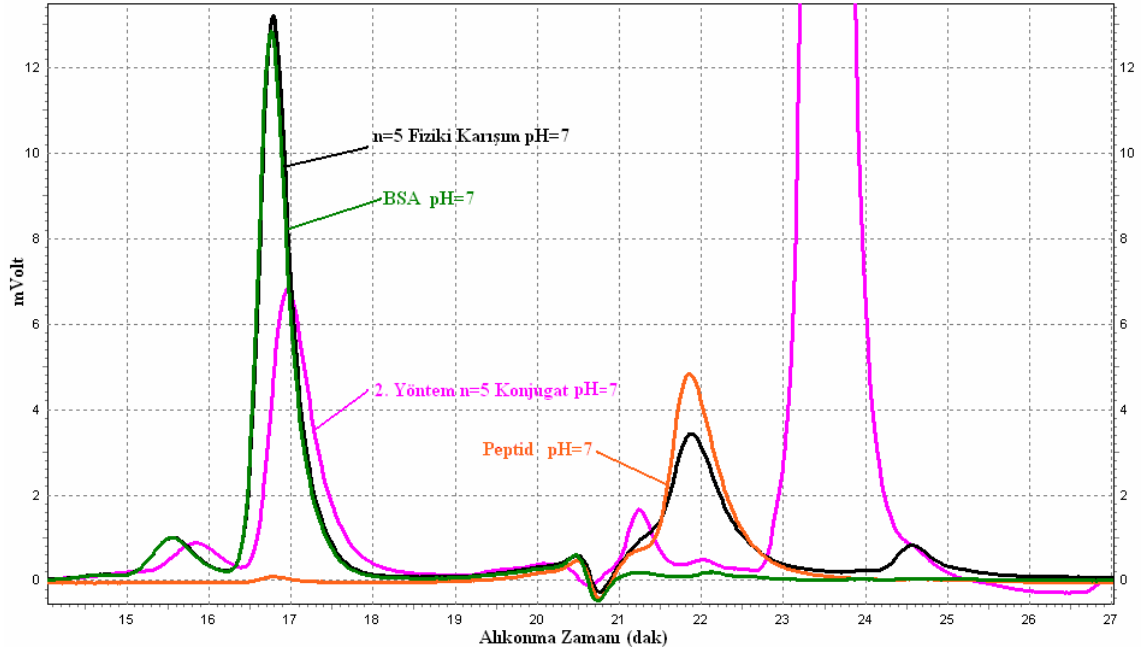
Şekil 8.3 pH 5’de hazırlanmış (◆) Konjugat (1. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



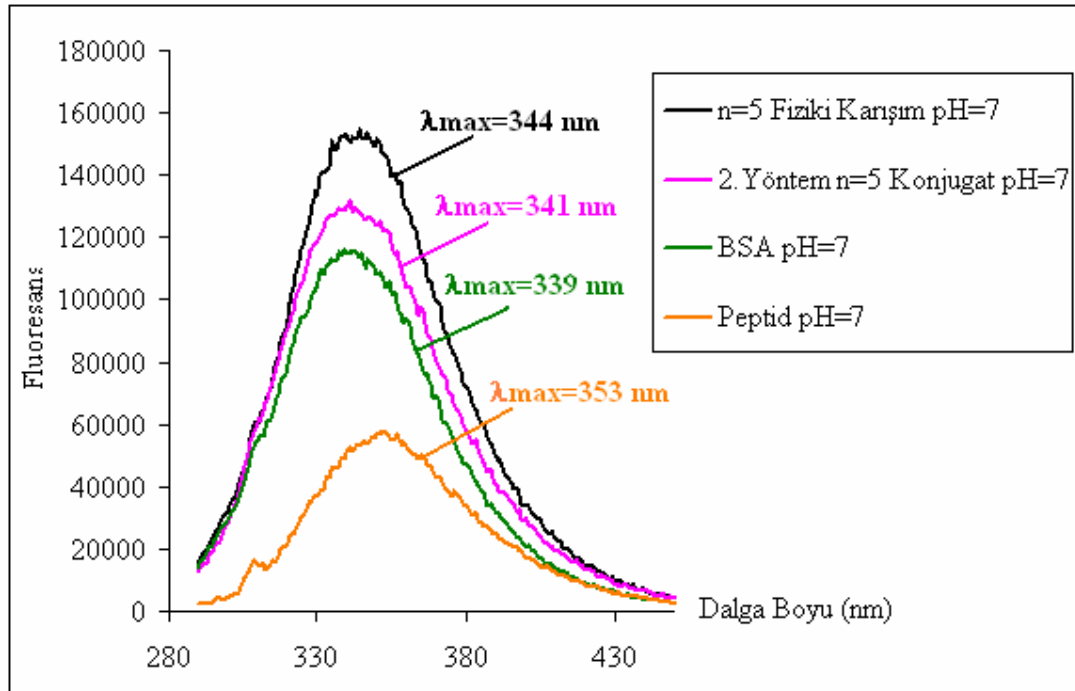
Şekil 8.4 pH 5’de hazırlanmış (◆) Konjugat (1. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Floresans spektrumları

2. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarda BSA, PBS tamponunda çözünmüş ve üzerine 6 mL 0,5 M NMI çözeltisi eklenmiştir. pH'ın 5,9 olarak ölçülmesinden sonra pH damla damla HCl eklenerek 5'e ayarlanmış ve ortama EDC eklenerek 2,5 saat süresince BSA'nın karboksil gruplarının aktivasyonu yapılmıştır. Aktivasyondan sonra gereken miktarda peptid DMSO'da çözünerek eklenmiş, karışım 1 gece soğuk odada karıştırılmıştır. Ertesi gün çözeltinin pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiş ve 4 saat konjugasyon için soğuk odada karıştırılmıştır.

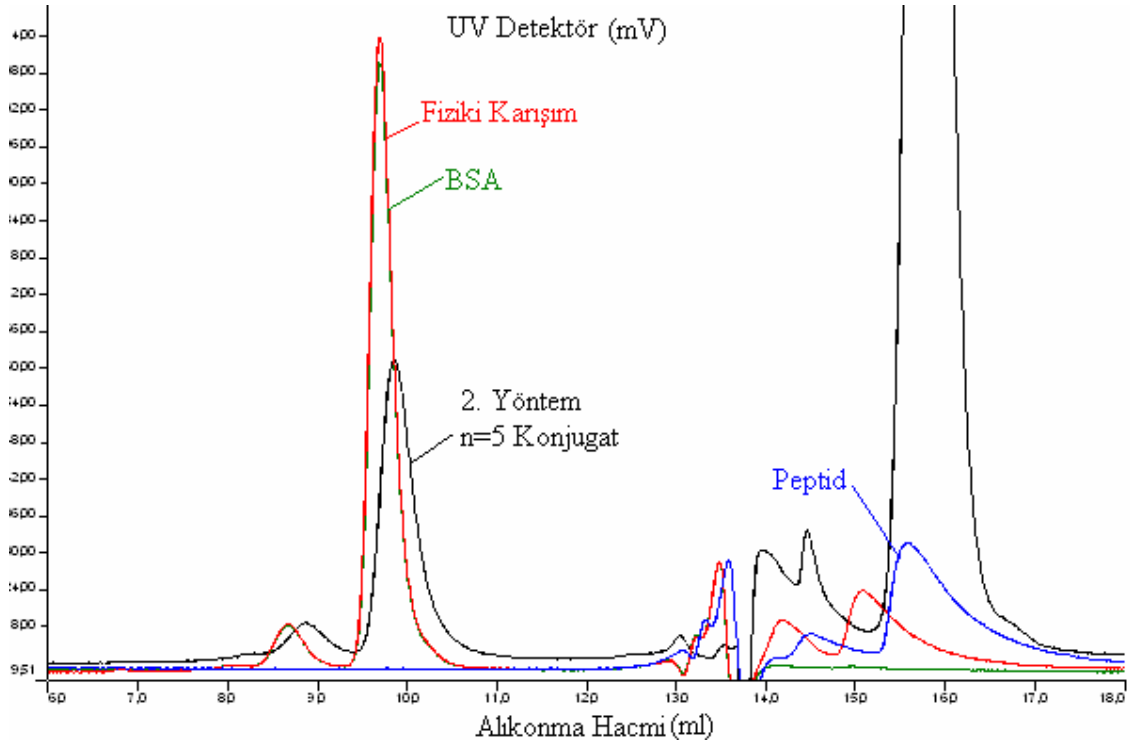
Sentezlenen konjugata ait HPLC kromatogramı Şekil 8.5'de, Floresans spektrumu Şekil 8.6'da, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramı Şekil 8.7'de Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramı Şekil 8.8'de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramı Şekil 8.9'da ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramı da Şekil 8.10'da verilmiştir.



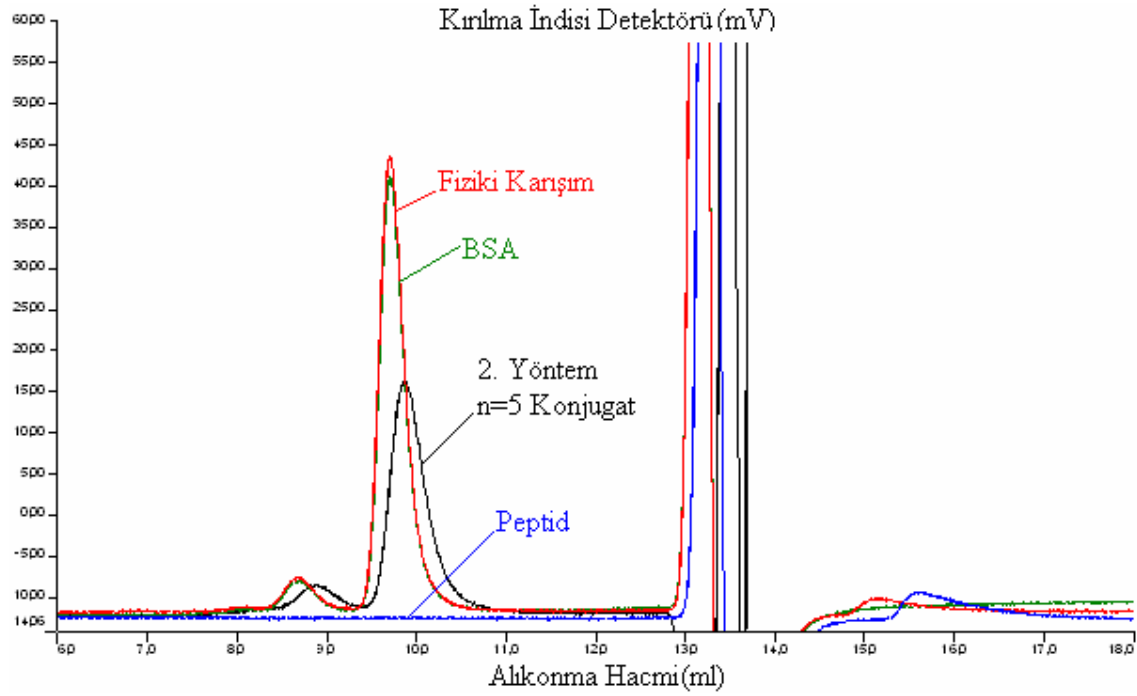
Şekil 8.5 pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



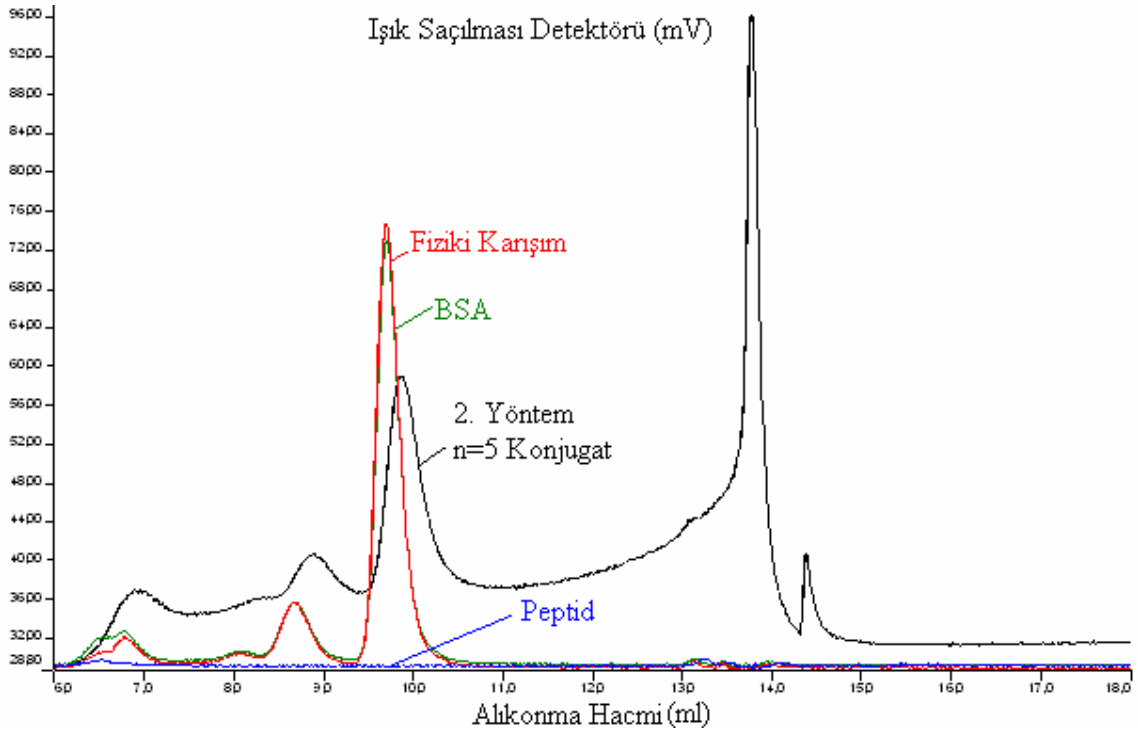
Şekil 8.6 pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Floresans spektrumları



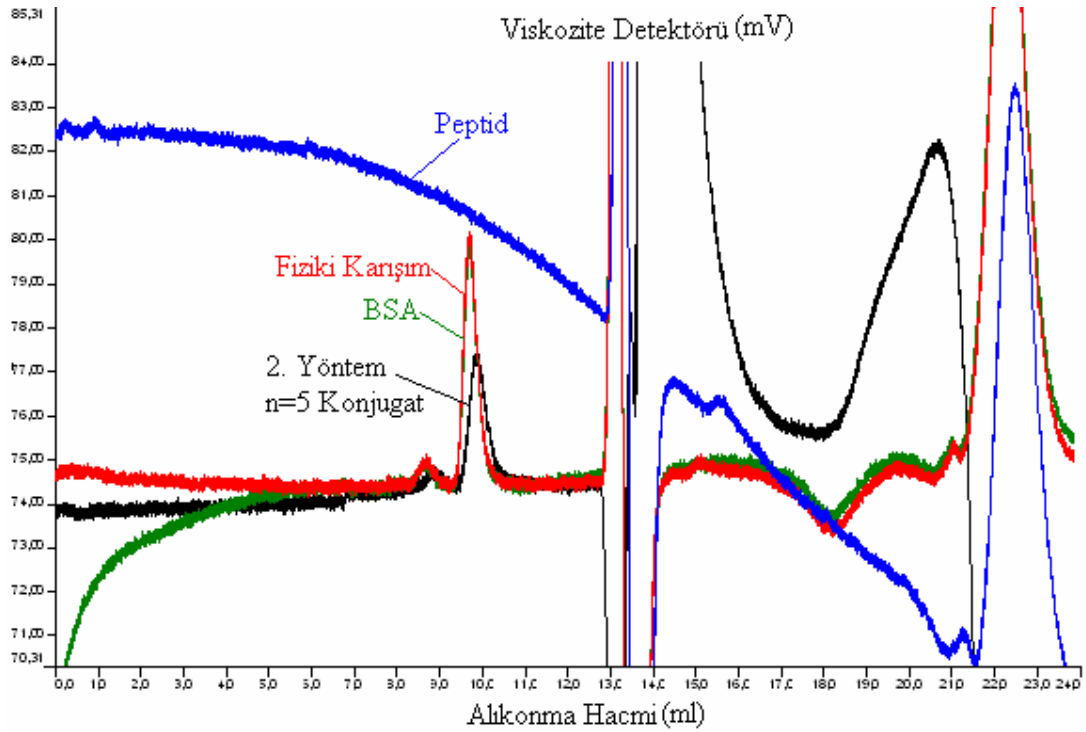
Şekil 8.7 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.8 pH 7’de hazırlanan (♦) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



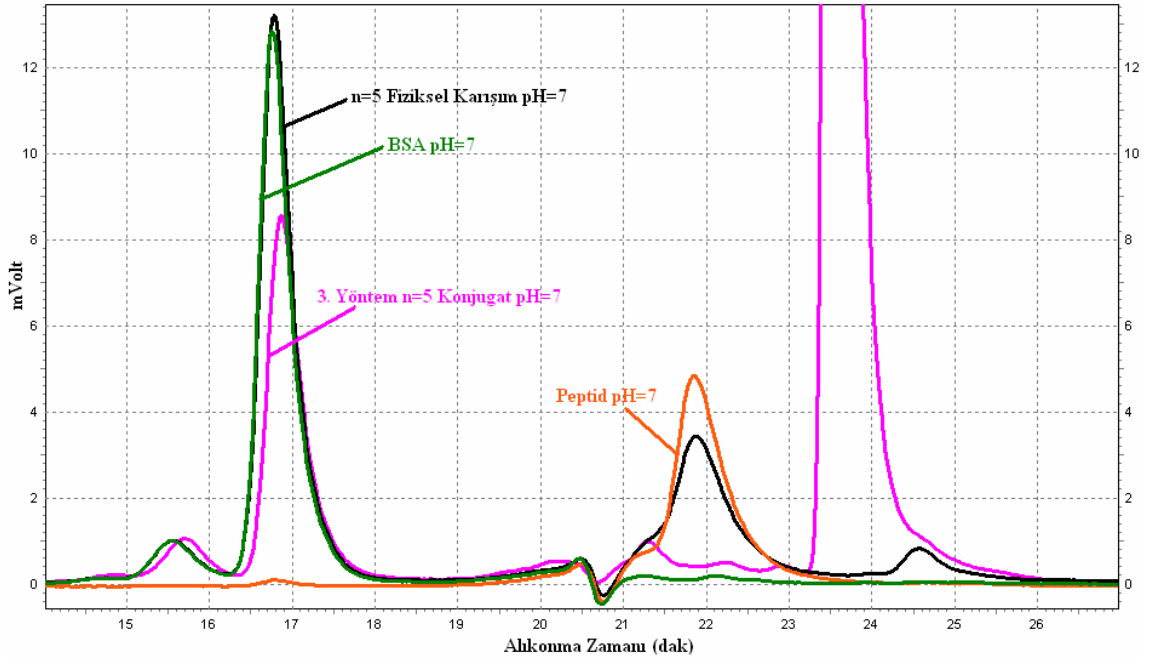
Şekil 8.9 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları



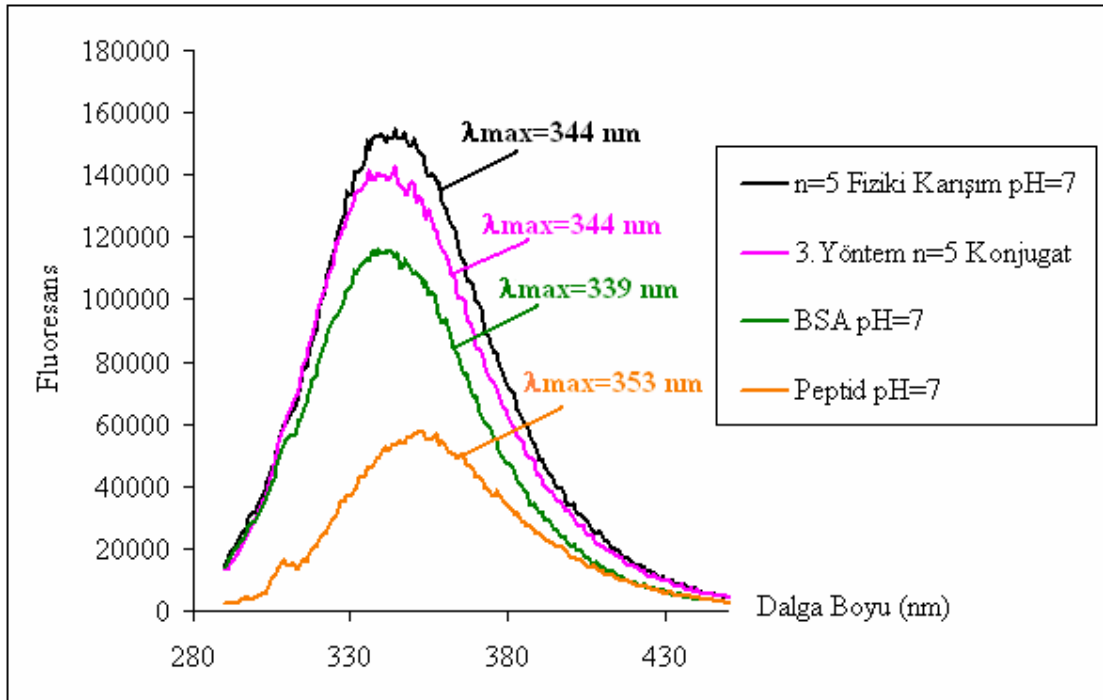
Şekil 8.10 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

3. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarda peptid DMSO'da çözünmüş ve üzerine 6 mL 0,5 M NMI çözeltisi eklenmiştir. pH'ın 5,85 olarak ölçülmesinden sonra pH damla damla HCl eklenerek 5'e ayarlanmış ve ortama EDC eklenerek 2,5 saat süresince peptid'in karboksil gruplarının aktivasyonu yapılmıştır. Aktivasyondan sonra gereken miktarda BSA PBS'de çözünerek eklenmiş, karışım 1 gece soğuk odada karıştırılmıştır. Ertesi gün çözeltinin pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiş ve 4 saat konjugasyon için soğuk odada karıştırılmıştır.

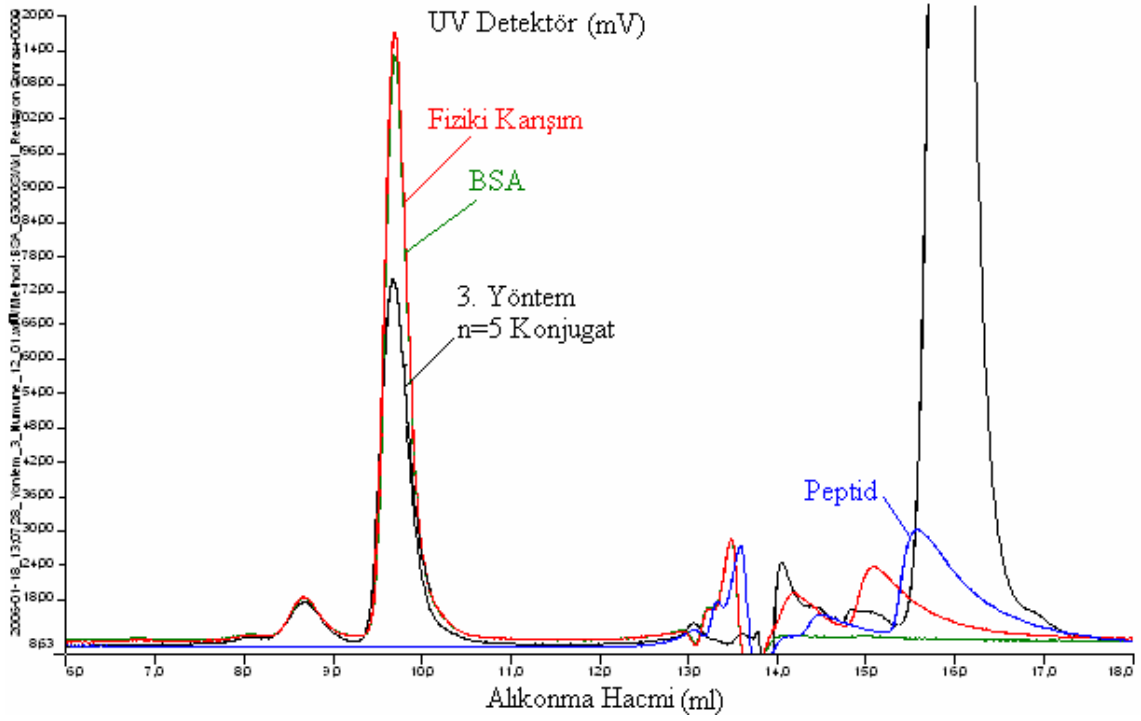
Sentezlenen konjugata ait HPLC kromatogramı Şekil 8.11'de, Floresans spektrumu Şekil 8.12'de, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramı Şekil 8.13'de Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramı Şekil 8.14'de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramı Şekil 8.15'de ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramı da Şekil 8.16'da verilmiştir.



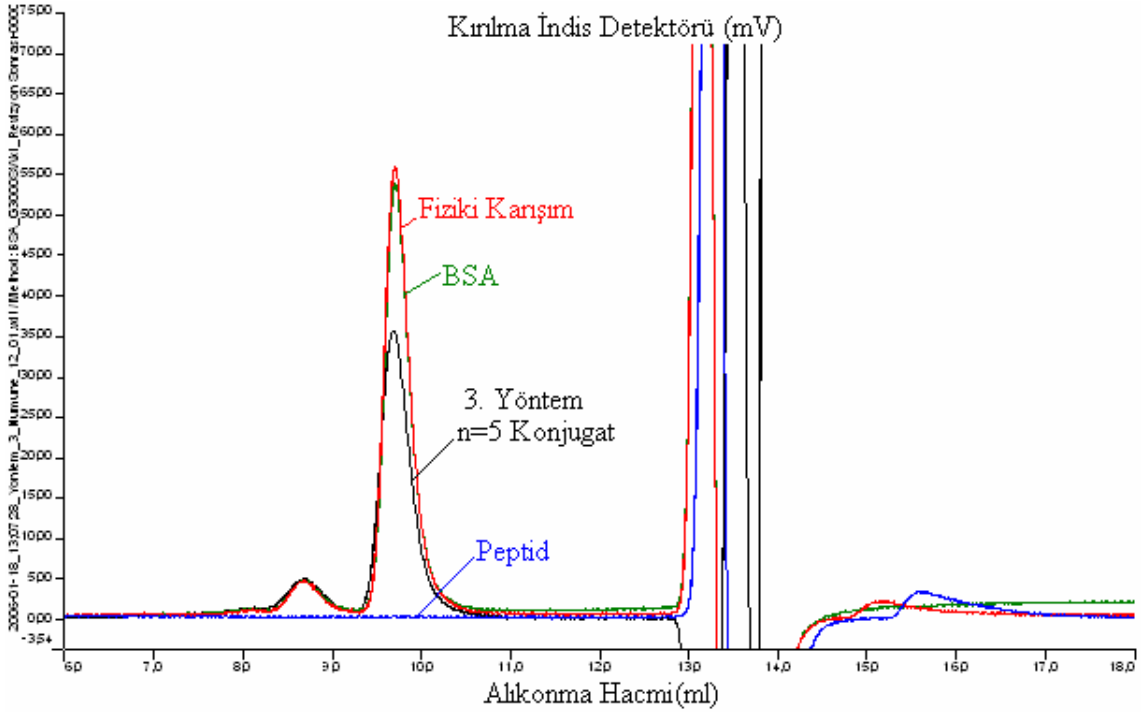
Şekil 8.11 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



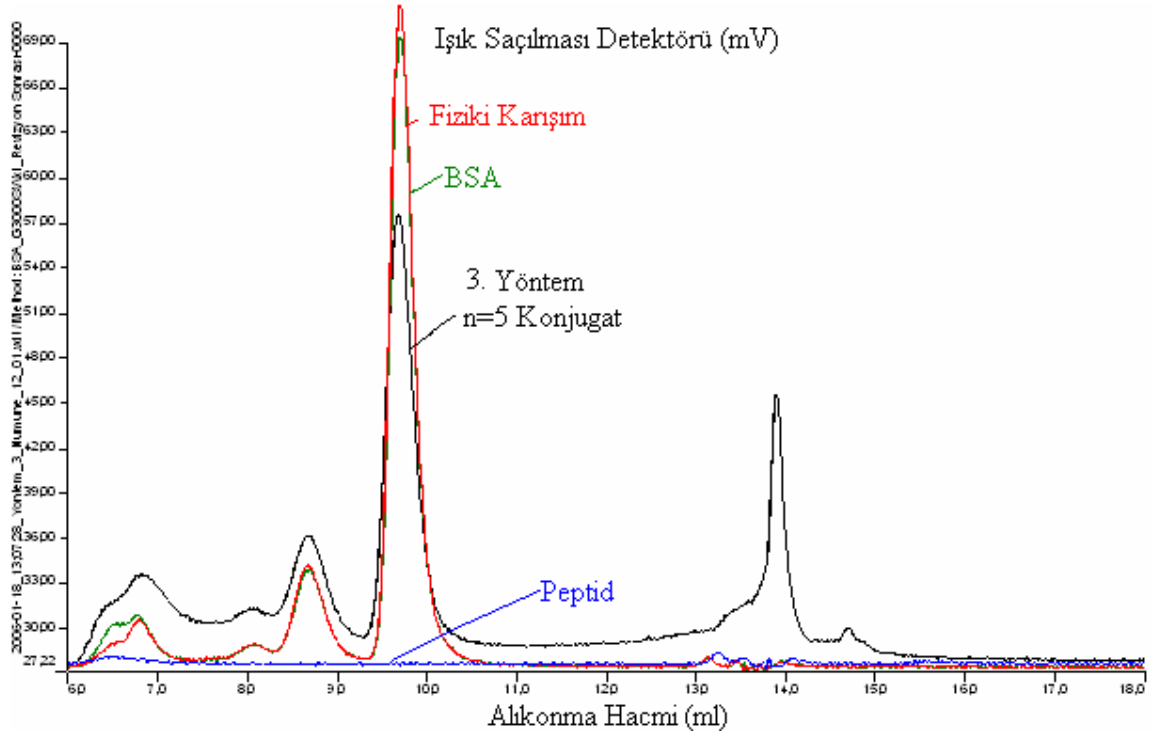
Şekil 8.12 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Floresans spektrumları



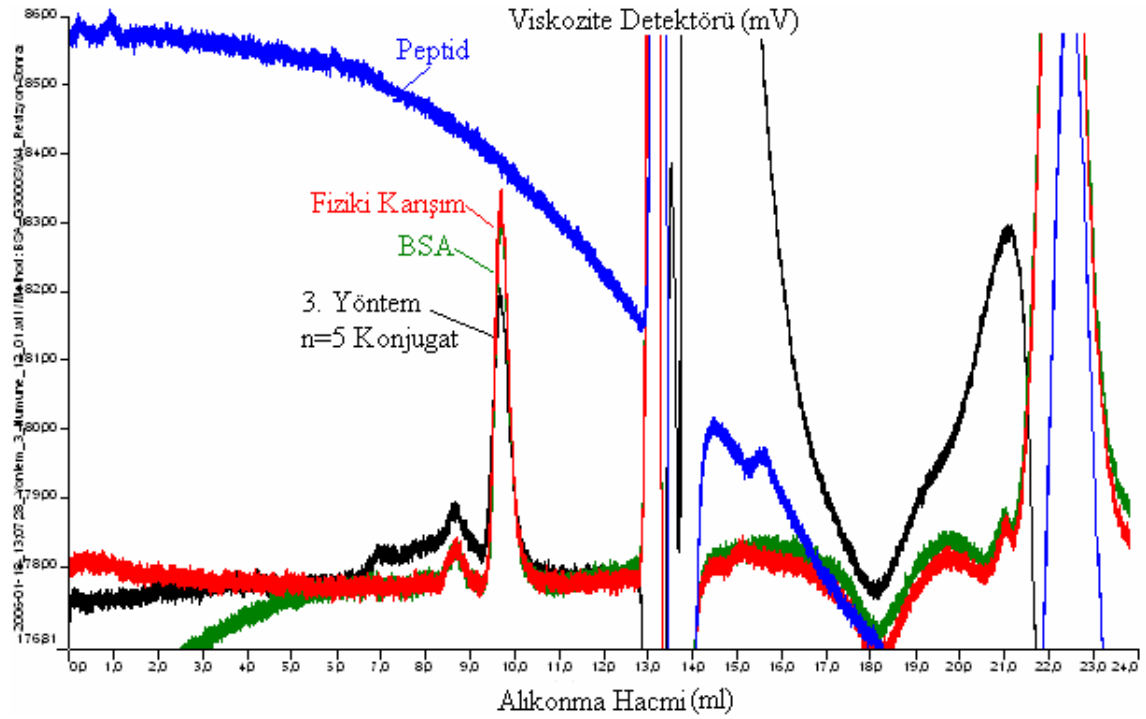
Şekil 8.13 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.14 pH 7’de hazırlanan (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



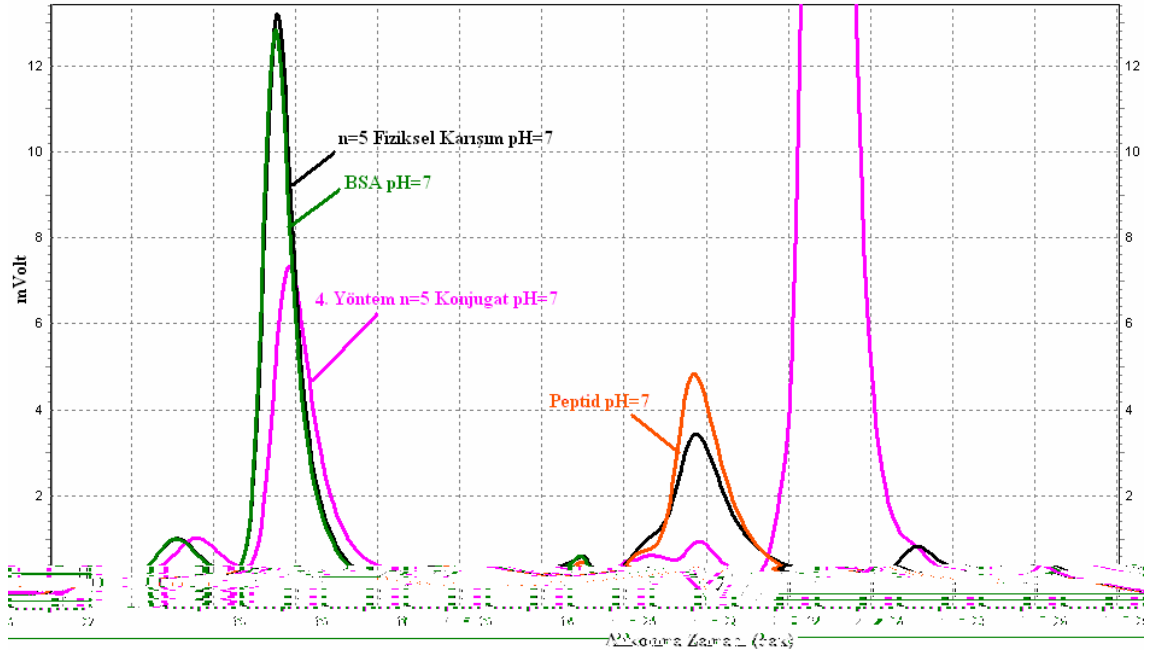
Şekil 8.15 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları



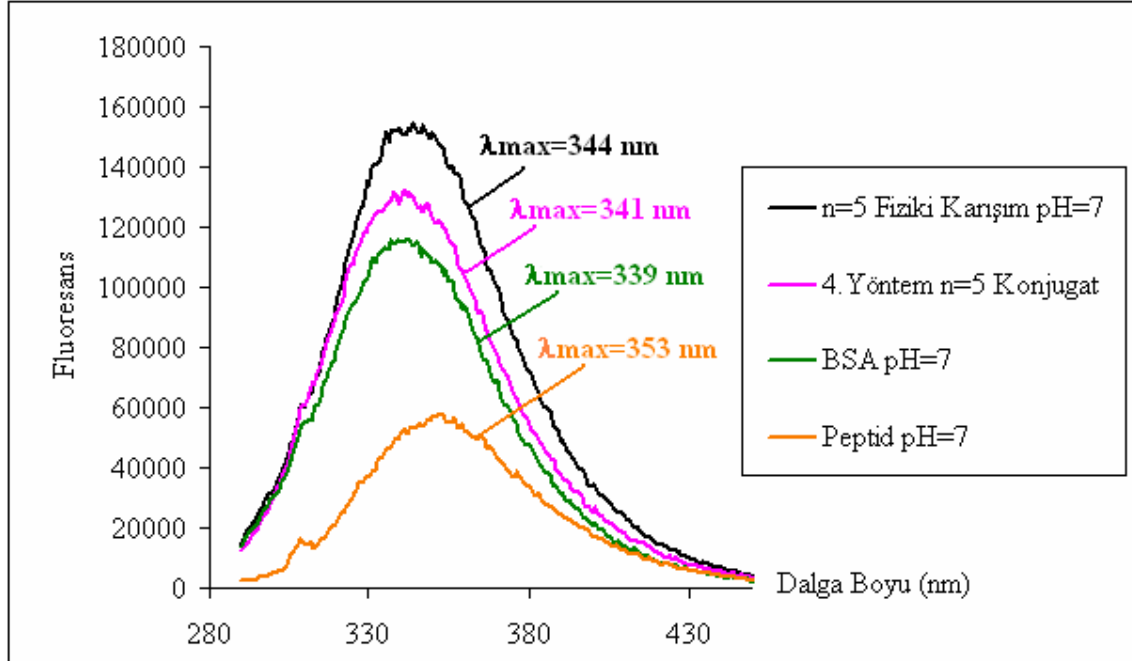
Şekil 8.16 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (3. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

4. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarlarda peptid DMSO'da, BSA ise PBS tamponunda (toplam hacim 6 mL olacak şekilde) çözünmüş sonrasında 6 mL 0,5 M NMI çözeltisi eklenmiş ve pH 5,8 olarak ölçülmüştür. Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının bir gece aktivasyonu yapılmış ve ertesi gün çözeltinin pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 4 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra elde edilen konjugatlar HPLC, Floresans ve Viscotek cihazları ile analiz edilmiştir.

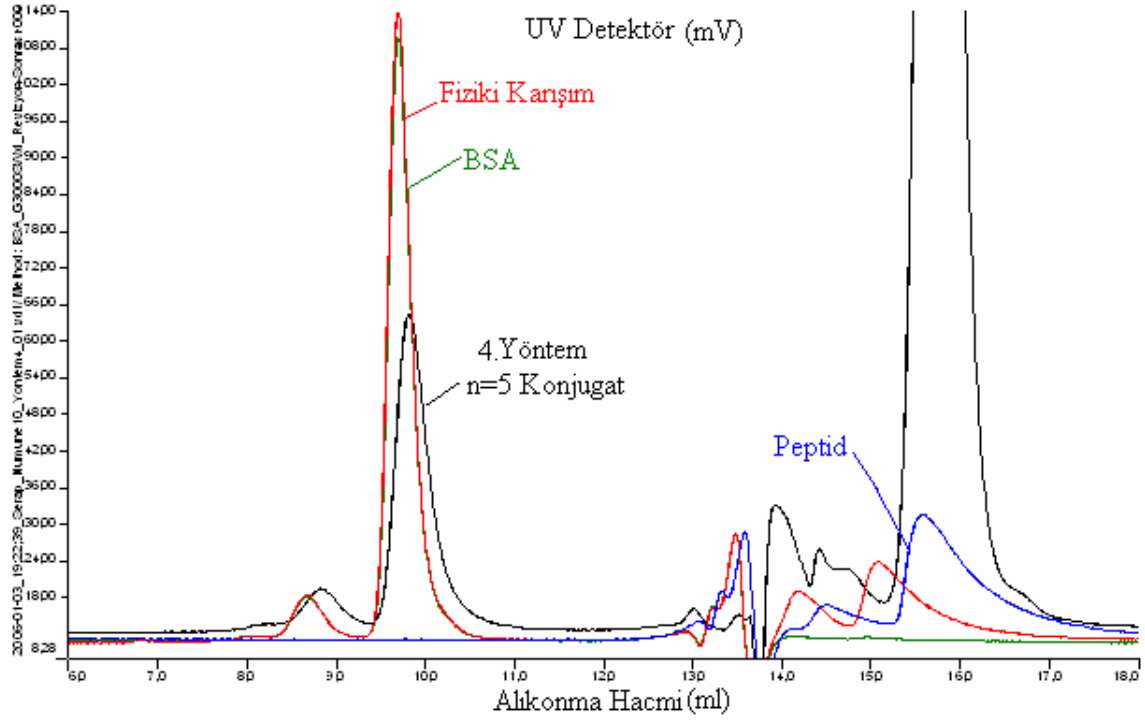
Sentezlenen konjugata ait HPLC kromatogramı Şekil 8.17'de, Floresans spektrumu Şekil 8.18'de, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramı Şekil 8.19'da Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramı Şekil 8.20'de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramı Şekil 8.21'de ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramı da Şekil 8.22'de verilmiştir.



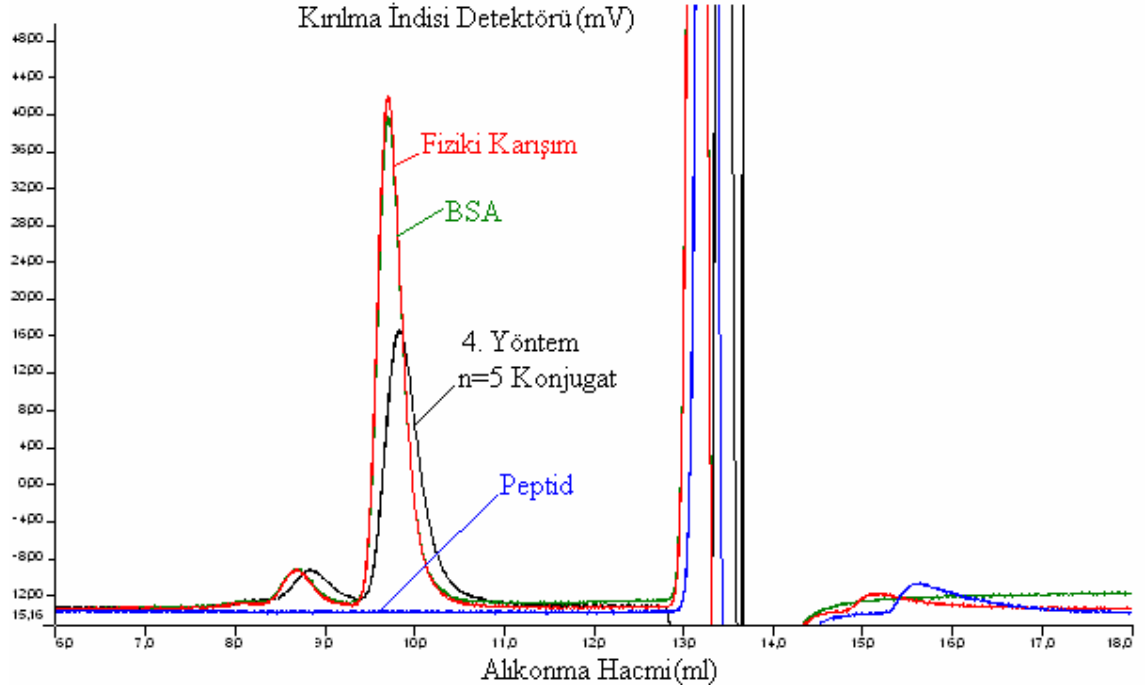
Şekil 8.17 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (♦) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



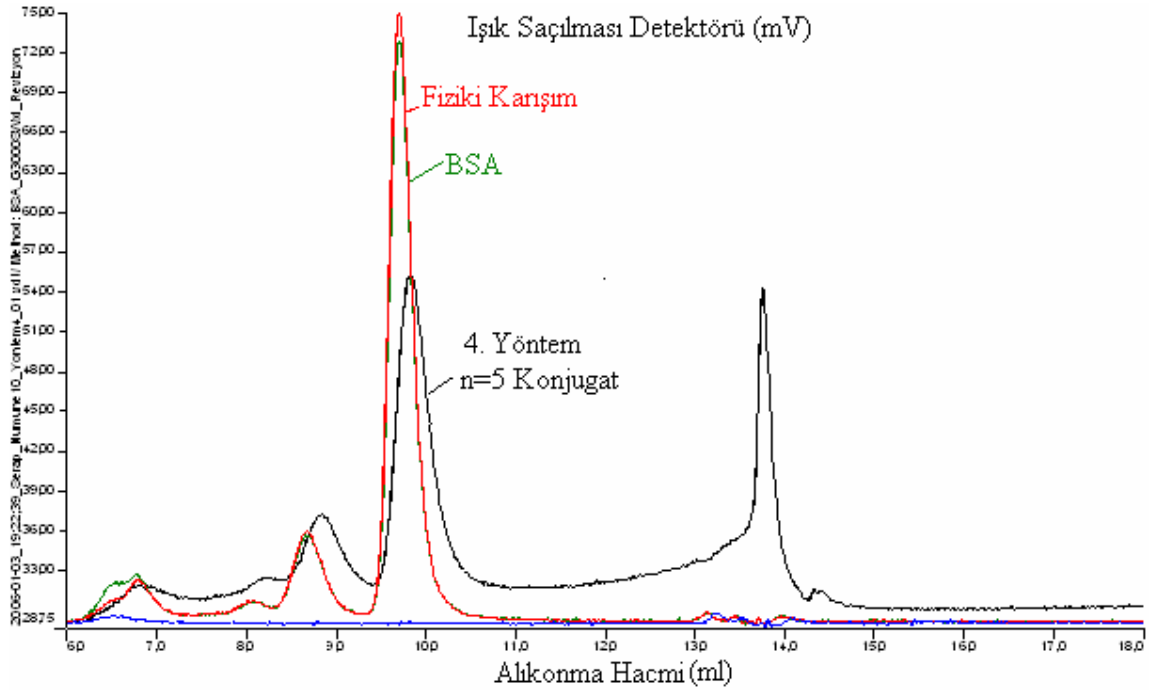
Şekil 8.18 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (♦) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları



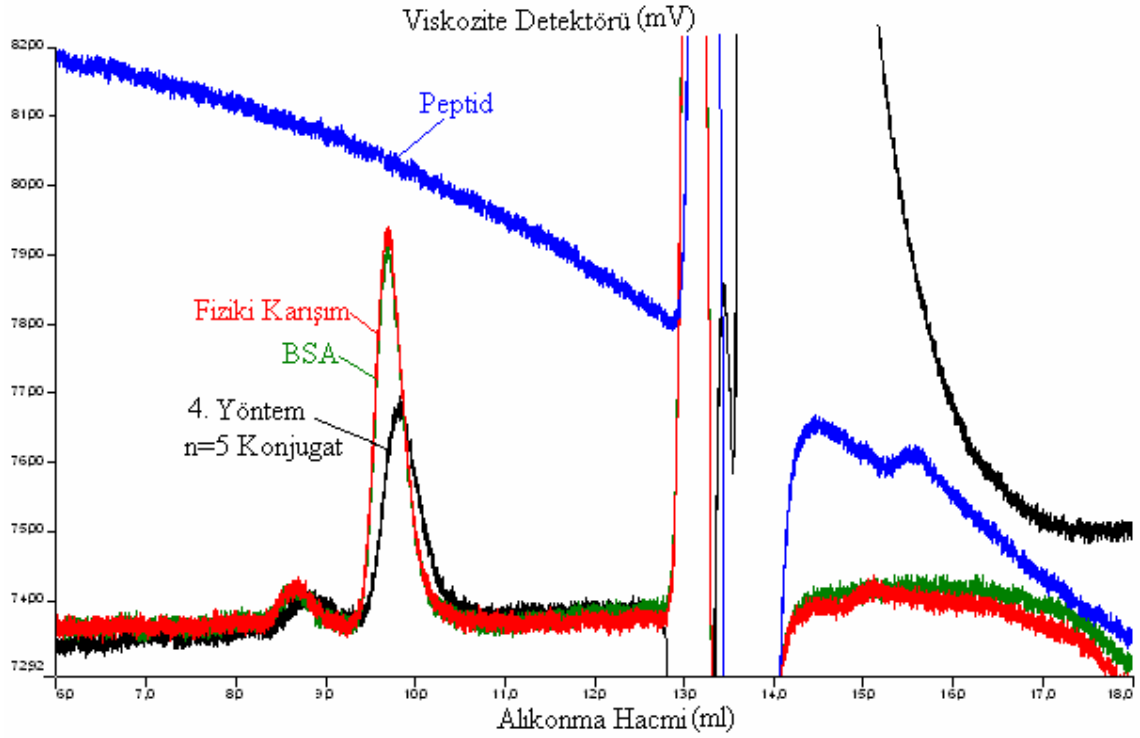
Şekil 8.19 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦♦♦) BSA ve (♦♦♦♦) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.20 pH 7’de hazırlanan (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦♦♦) BSA ve (♦♦♦♦) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



Şekil 8.21 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları

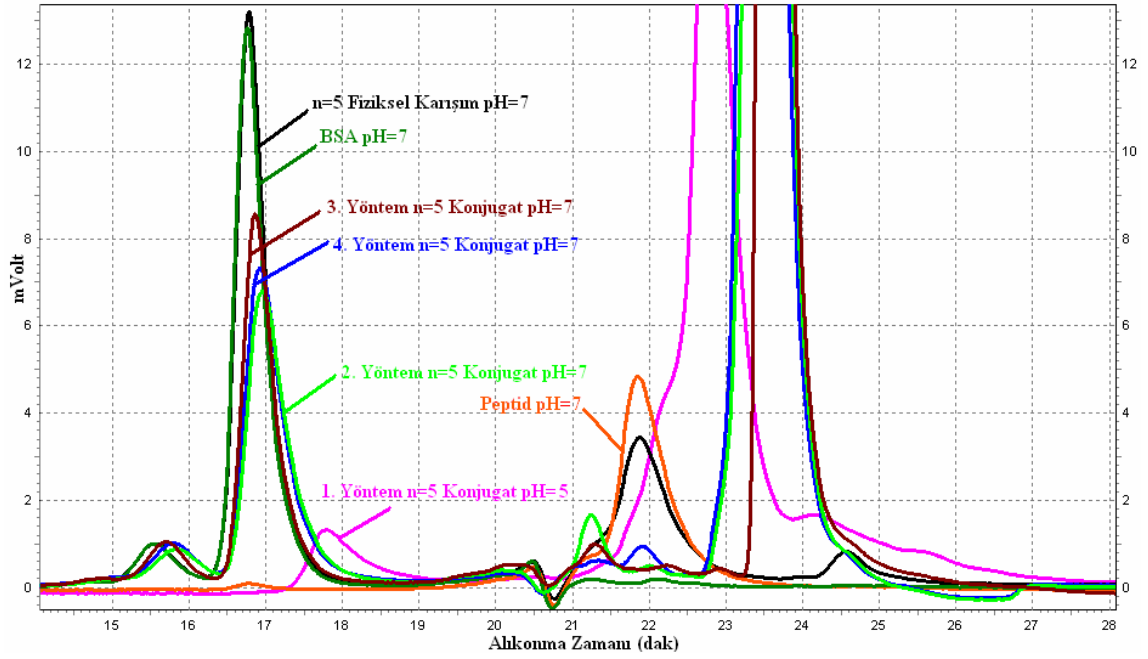


Şekil 8.22 pH 7’de hazırlanmış (♦) Konjugat (2. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

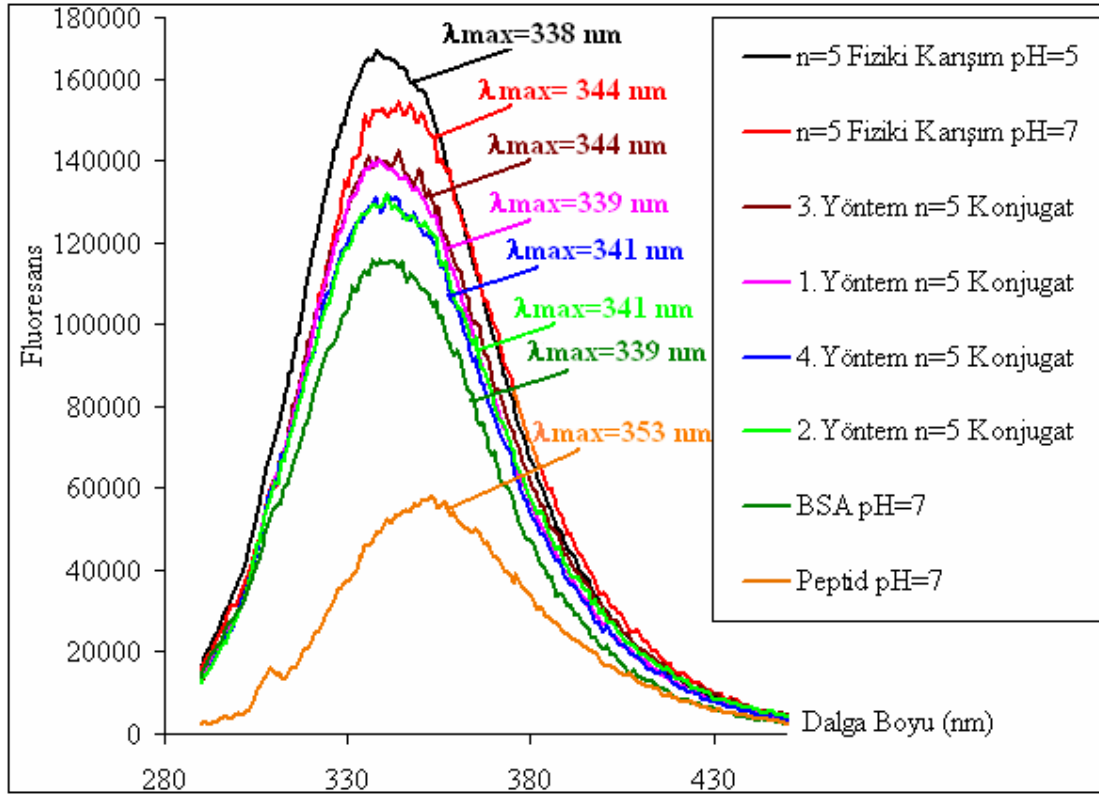
5. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarlarda peptid DMSO'da, BSA ise PBS tamponunda çözünmüş sonrasında damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüştür.

6. Yönteme göre ise $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarlarda peptid DMSO'da, BSA ise PBS tamponunda çözünmüş pH=7,2 olarak ölçülmüştür.

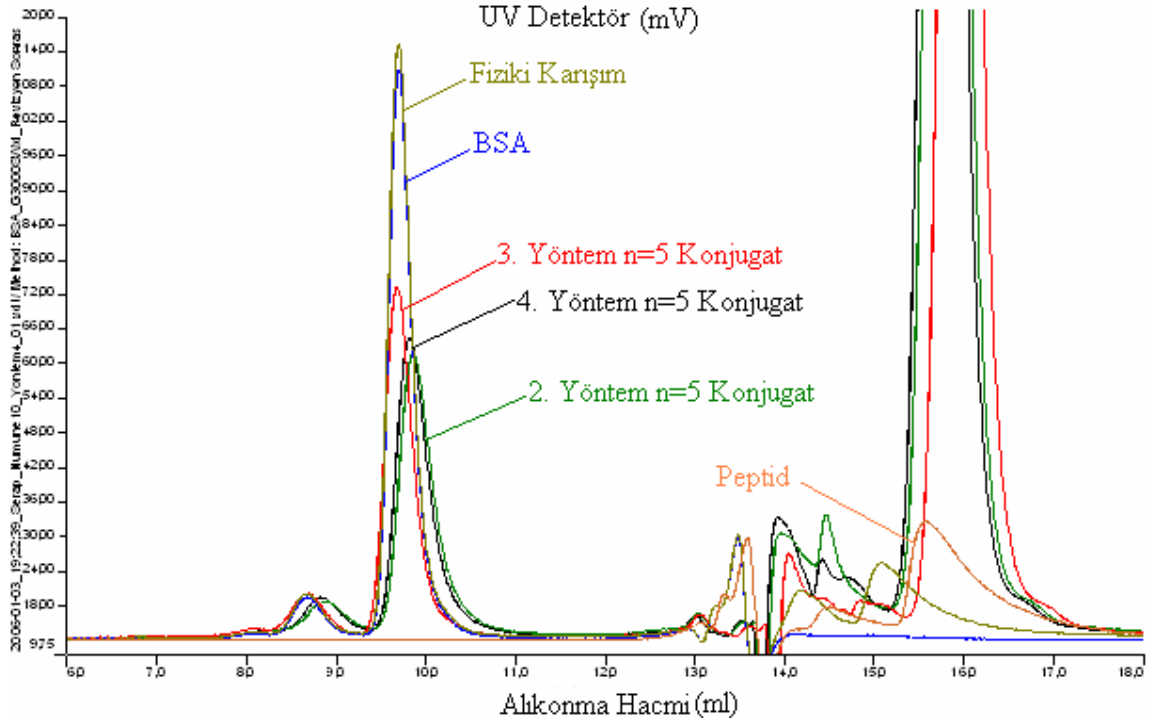
Bu şekilde elde edilen fiziki karışımlar, 1. Yöntem, 2. Yöntem, 3. Yöntem ve 4. Yöntem kullanılarak oluşturulan konjugatlar ile karşılaştırılmıştır. HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 8.23'de, Floresans spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 8.24'de, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.25'de Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.26'da, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.27'de ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması da Şekil 8.28'de verilmiştir.



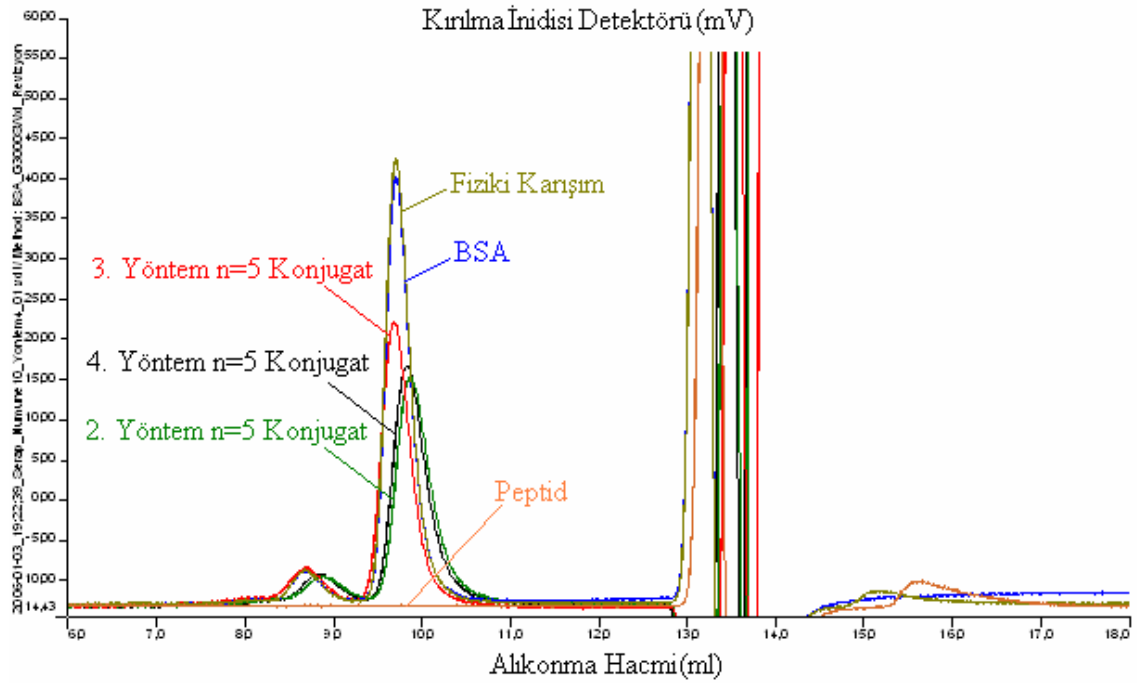
Şekil 8.23 pH 5’de (♦) 1. Yöntem’e göre ve pH 7’de (♦) 2., (♦) 3., (♦) 4. Yöntemlere göre hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



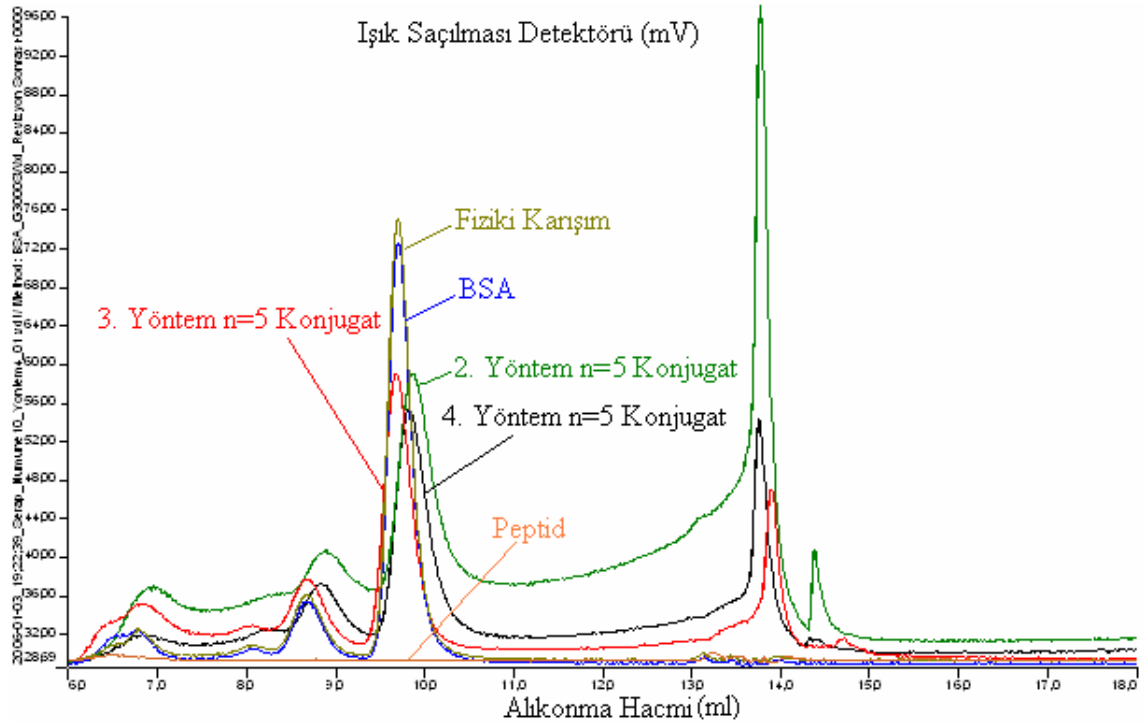
Şekil 8.24 pH 5’de (♦) 1. Yöntem’e ve pH 7’de (♦) 2., (♦) 3., (♦) 4. Yöntemlere göre hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) pH = 5, (♦) pH=7, (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları



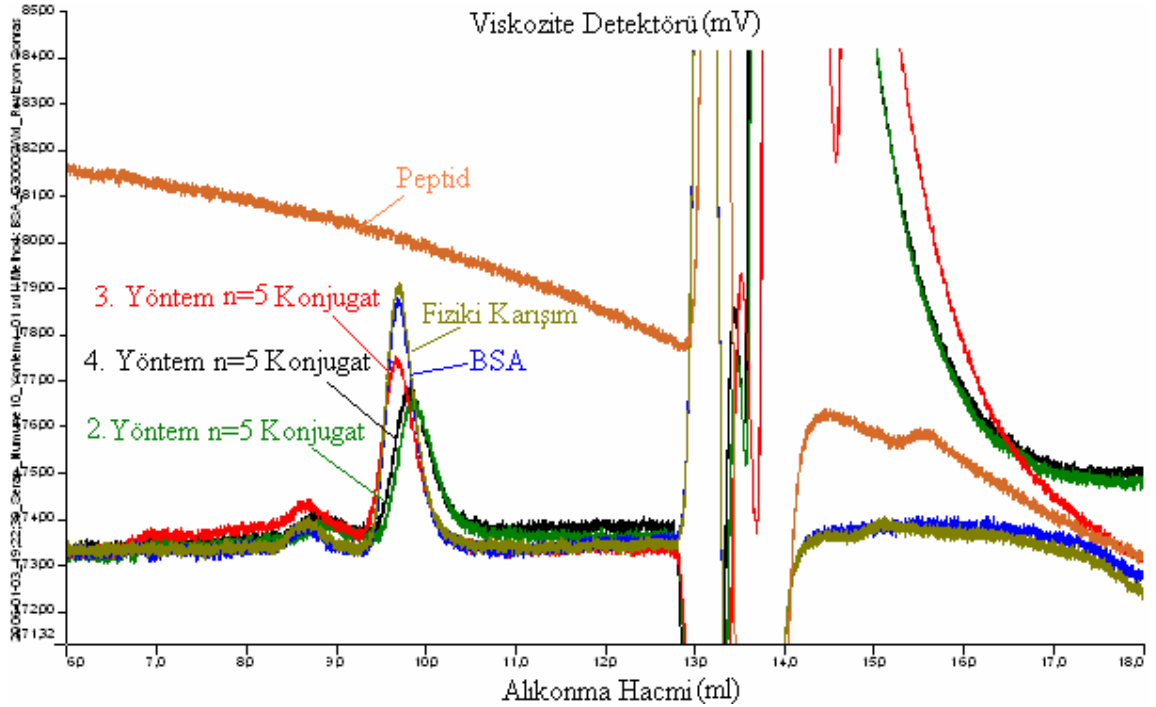
Şekil 8.25 pH 7’de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (♦) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.26 pH 7’de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (♦) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



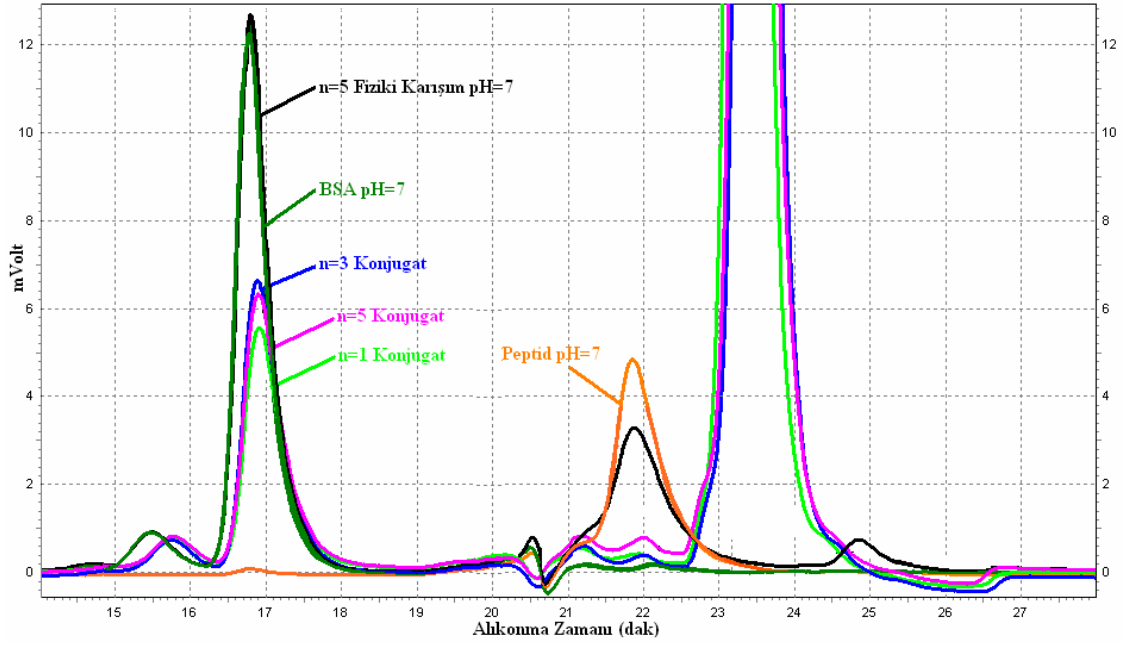
Şekil 8.27 pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Işık Saçılması detektörü kromatogramları



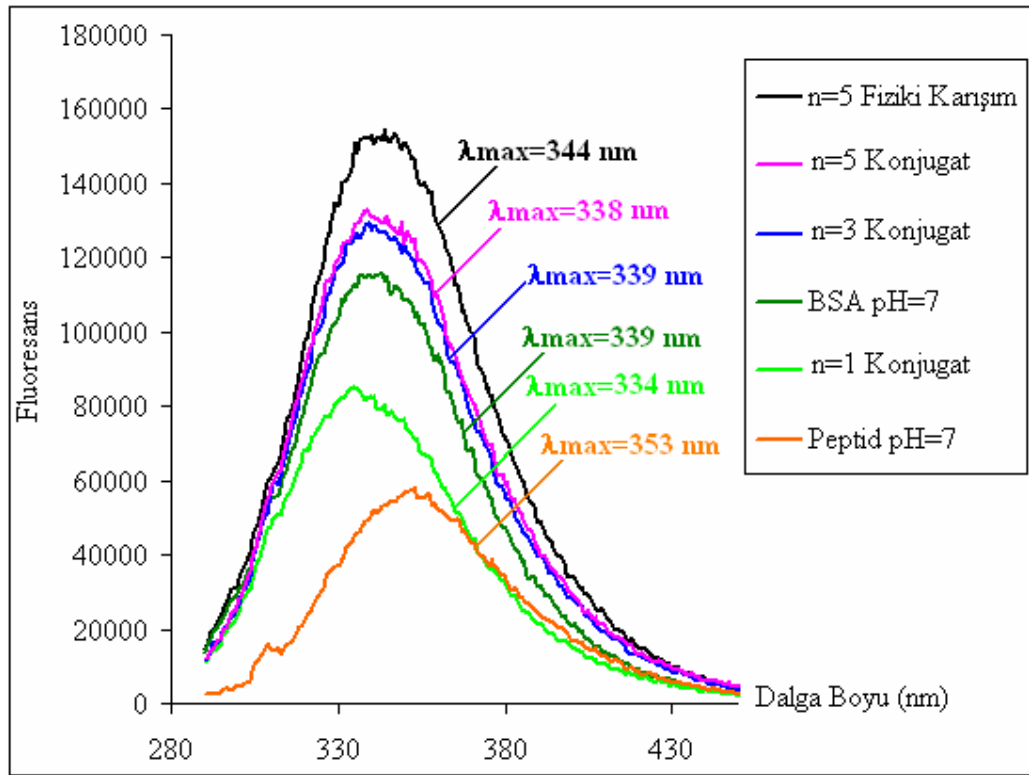
Şekil 8.28 pH 7'de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) (◆) 2., (◆) 3., (◆) 4. Yöntem, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5$ oranları için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatlar karşılaştırmalı olarak HPLC, Floresans ve Viscotek cihazları ile analiz edilmiştir.

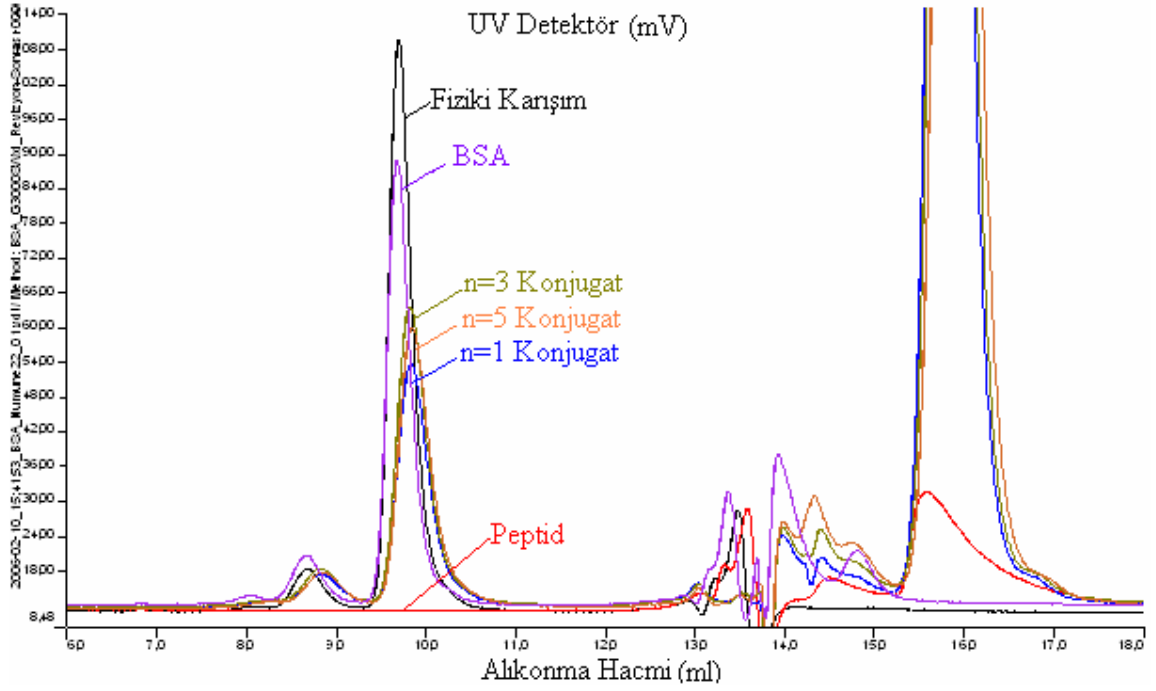
$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5$ konjugatlarının HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 8.29'da, Floresans spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 8.30'da, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.31'de Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.32'de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.33'de ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması da Şekil 8.34'de verilmiştir.



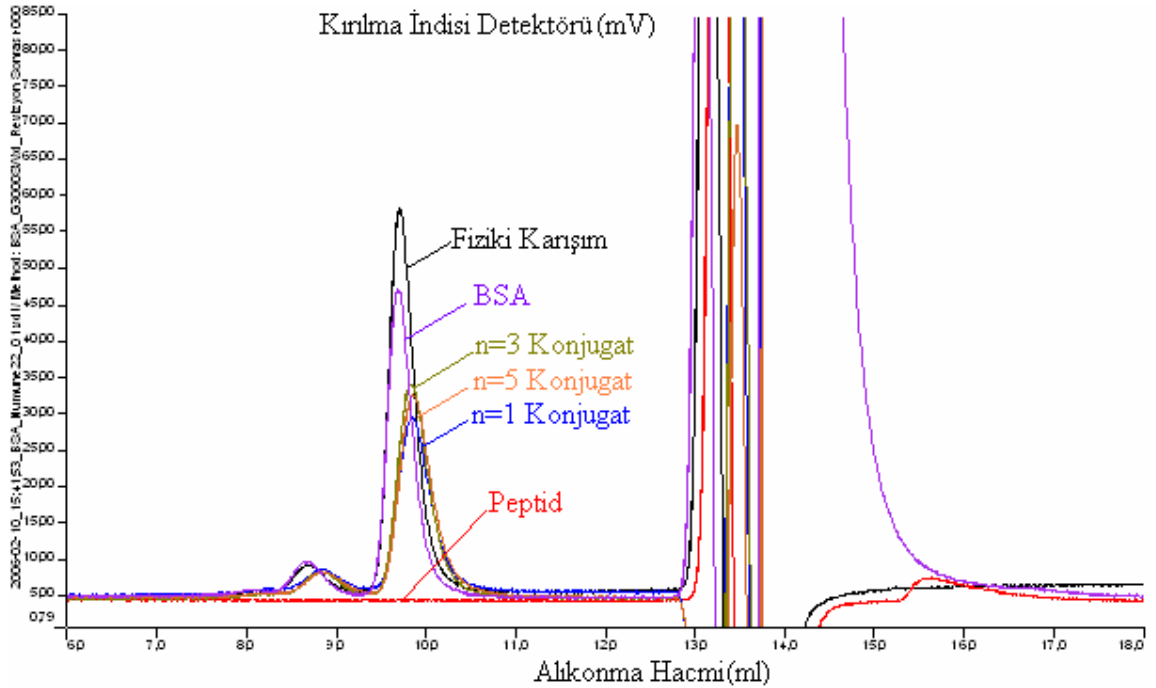
Şekil 8.29 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



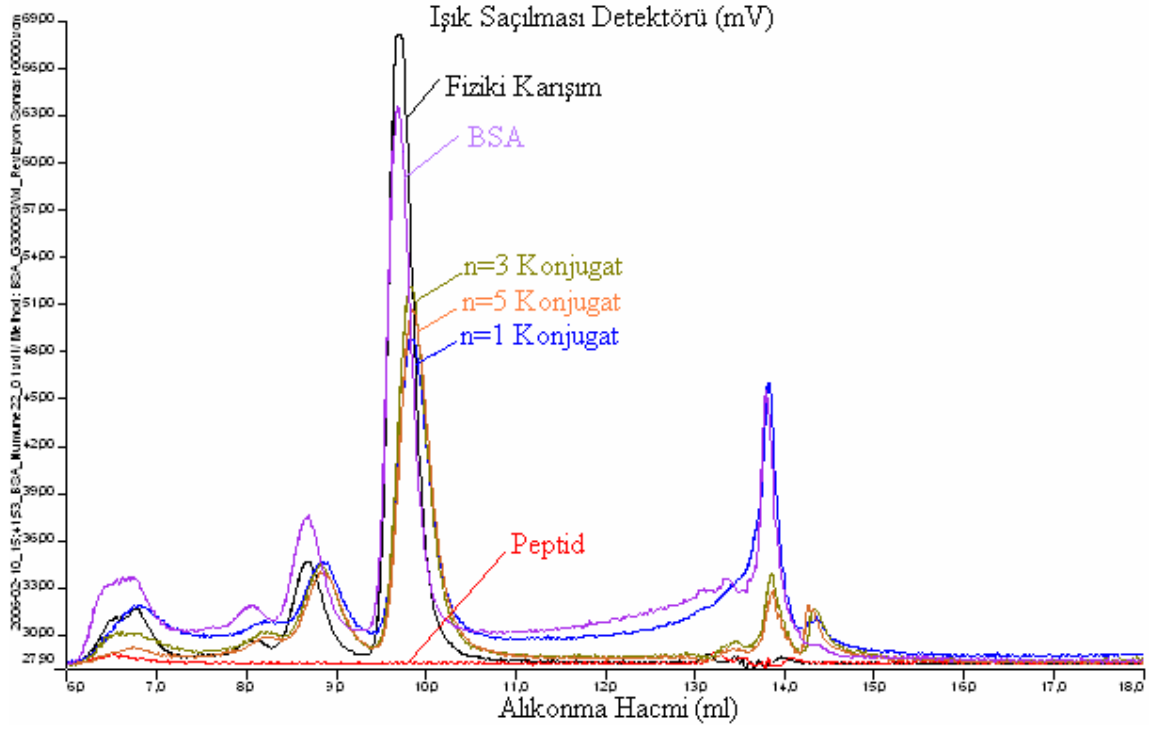
Şekil 8.30 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Floresans spektrumları



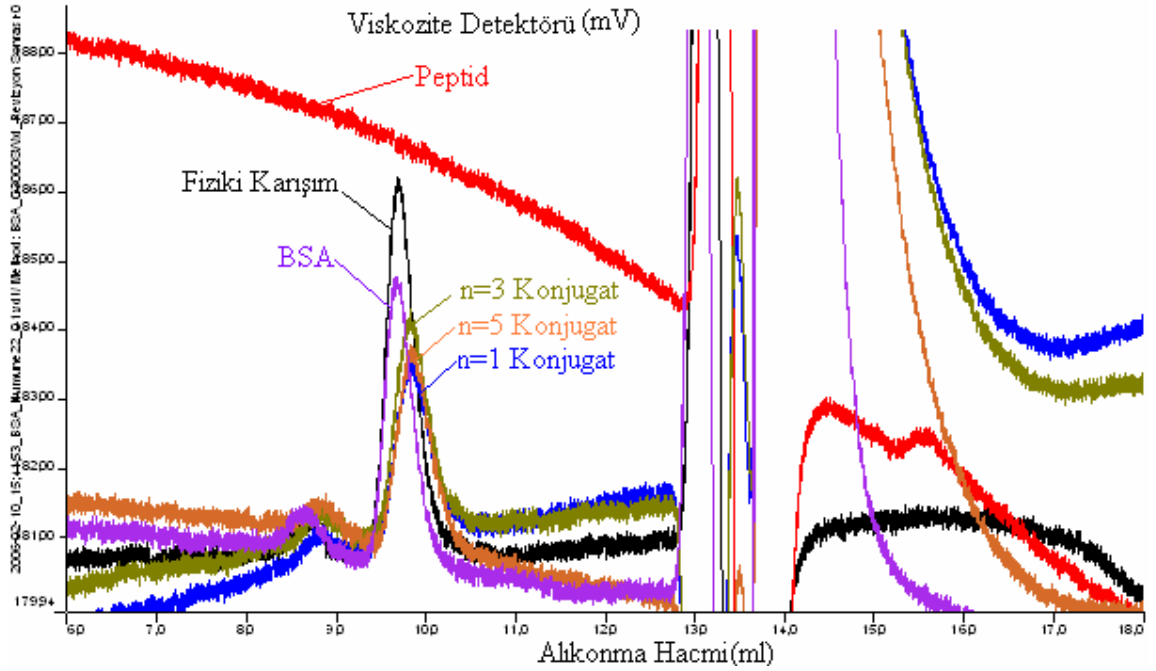
Şekil 8.31 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.32 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (◆) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



Şekil 8.33 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Işık saçılması detektörü kromatogramları

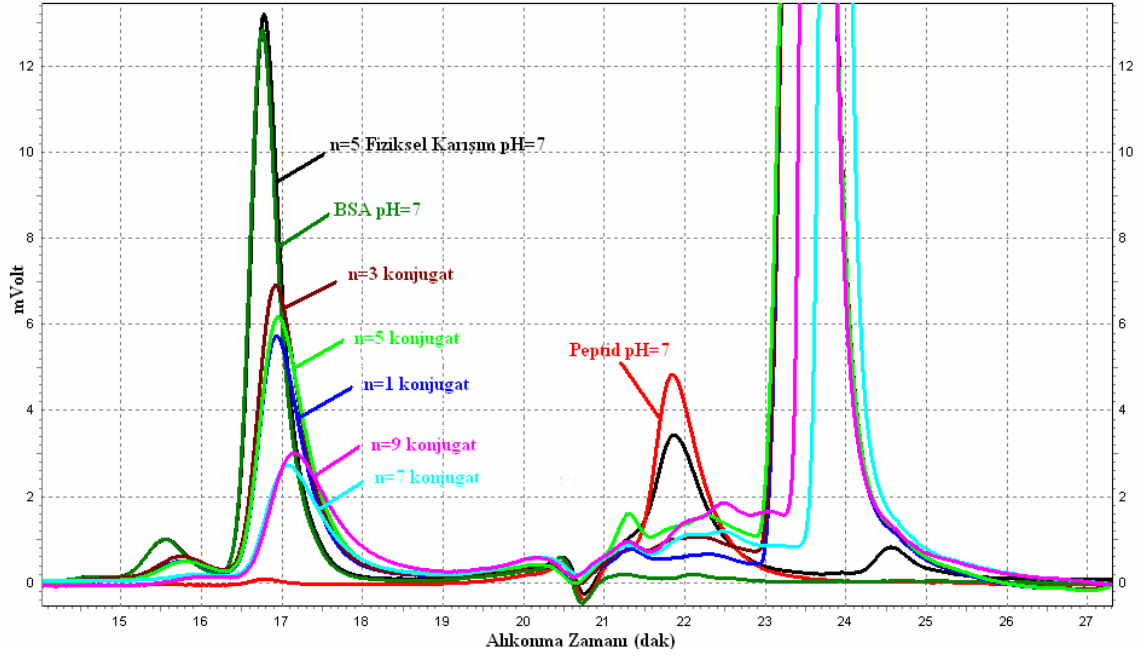


Şekil 8.34 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA ve (♦) Peptid’e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

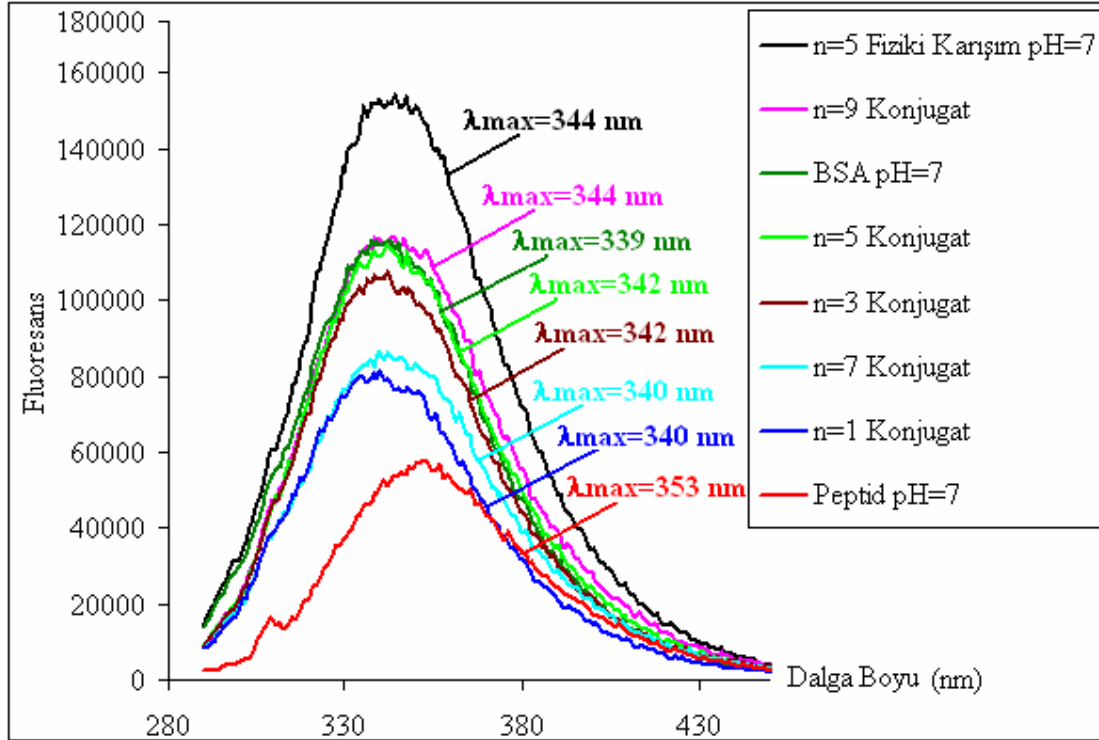
8.3 135-161 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin HPLC-Viscotek ve Floresans Sonuçları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5, 7, 9$ oranları için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatlar karşılaştırmalı olarak HPLC, Floresans ve Viscotek cihazları ile analiz edilmiştir.

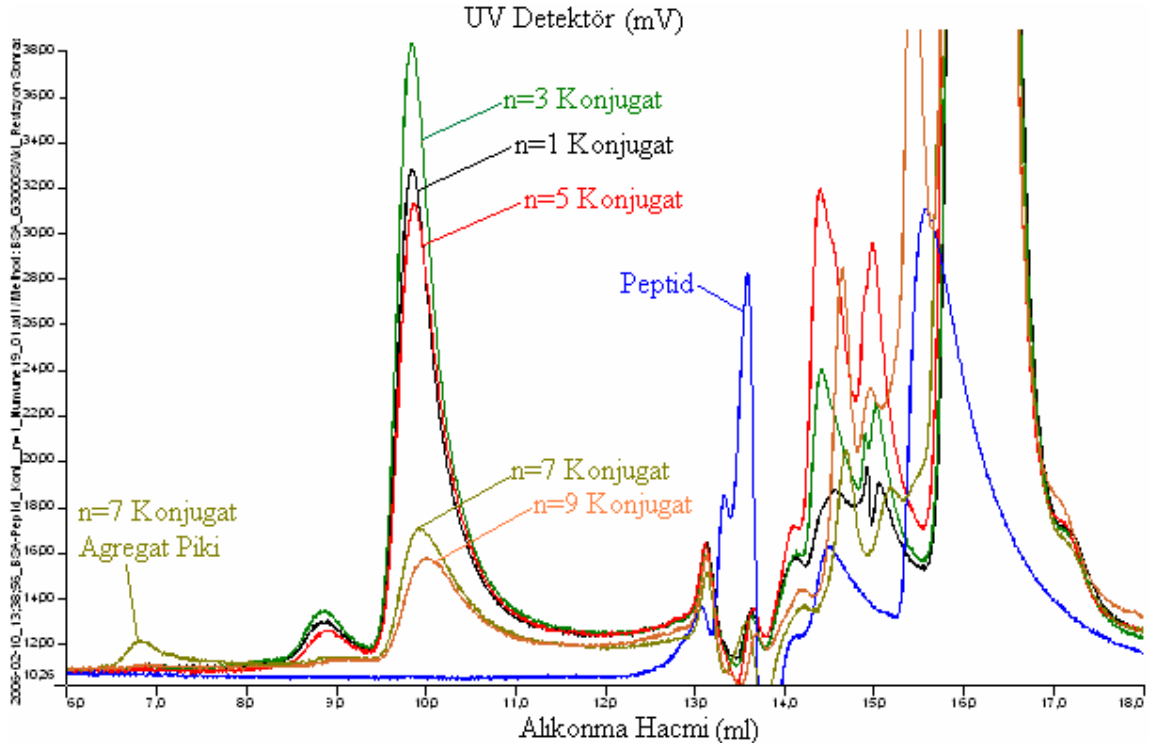
$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5, 7, 9$ konjugatlarının HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 8.35'de, Floresans spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 8.36'da, Viscotek cihazı ile UV detektörde alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.37'de Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.38'de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması Şekil 8.39'da ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramların karşılaştırılması da Şekil 8.40'da verilmiştir.



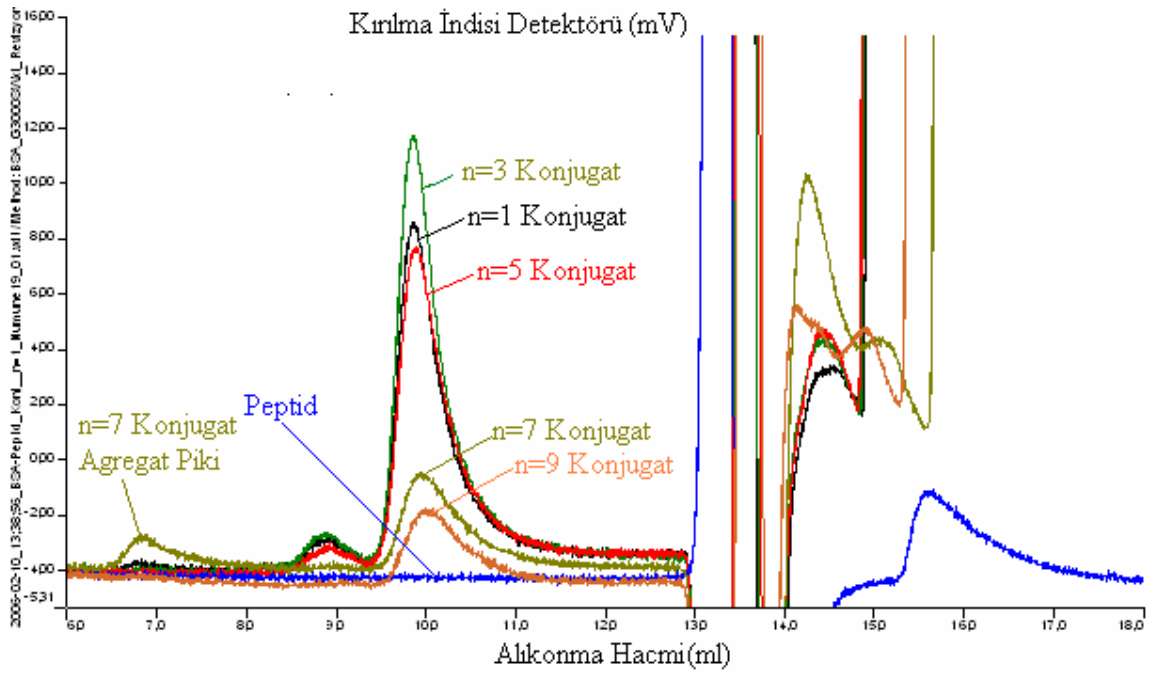
Şekil 8.35 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$, ($\blacklozenge$) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), ($\blacklozenge$) BSA ve ($\blacklozenge$) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



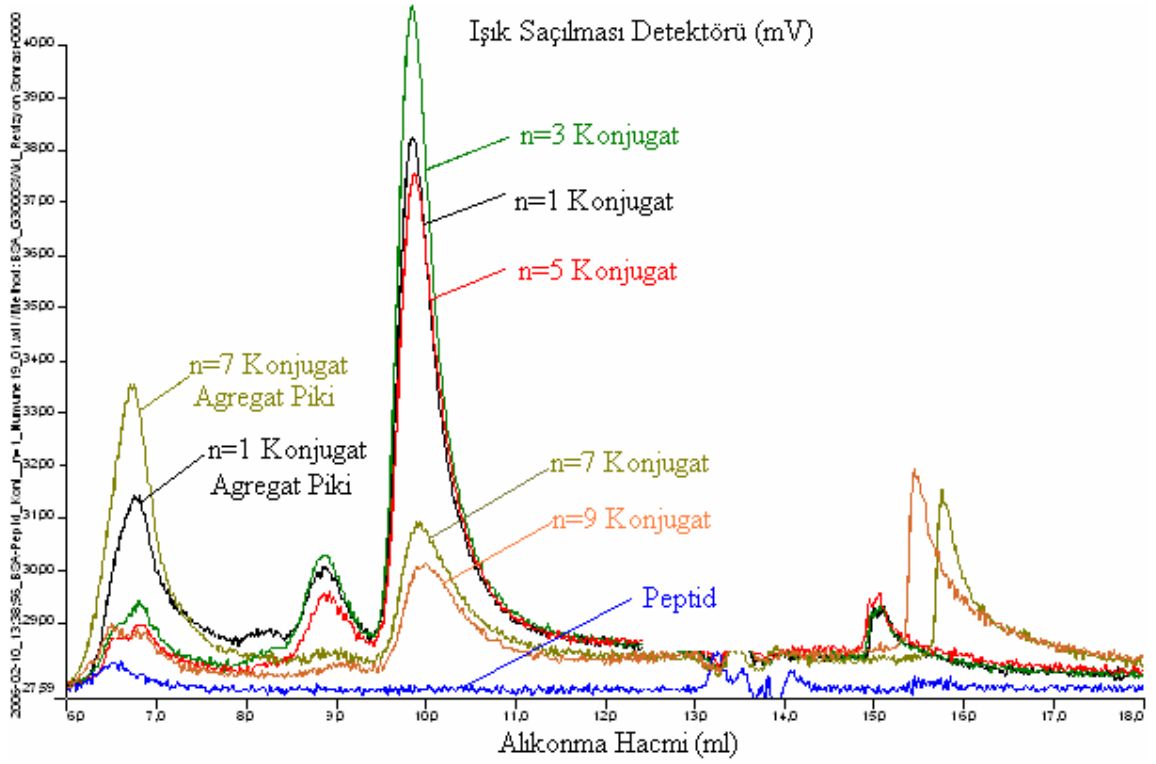
Şekil 8.36 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$, ($\blacklozenge$) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), ($\blacklozenge$) BSA ve ($\blacklozenge$) Peptid’e ait Floresans spektrumları



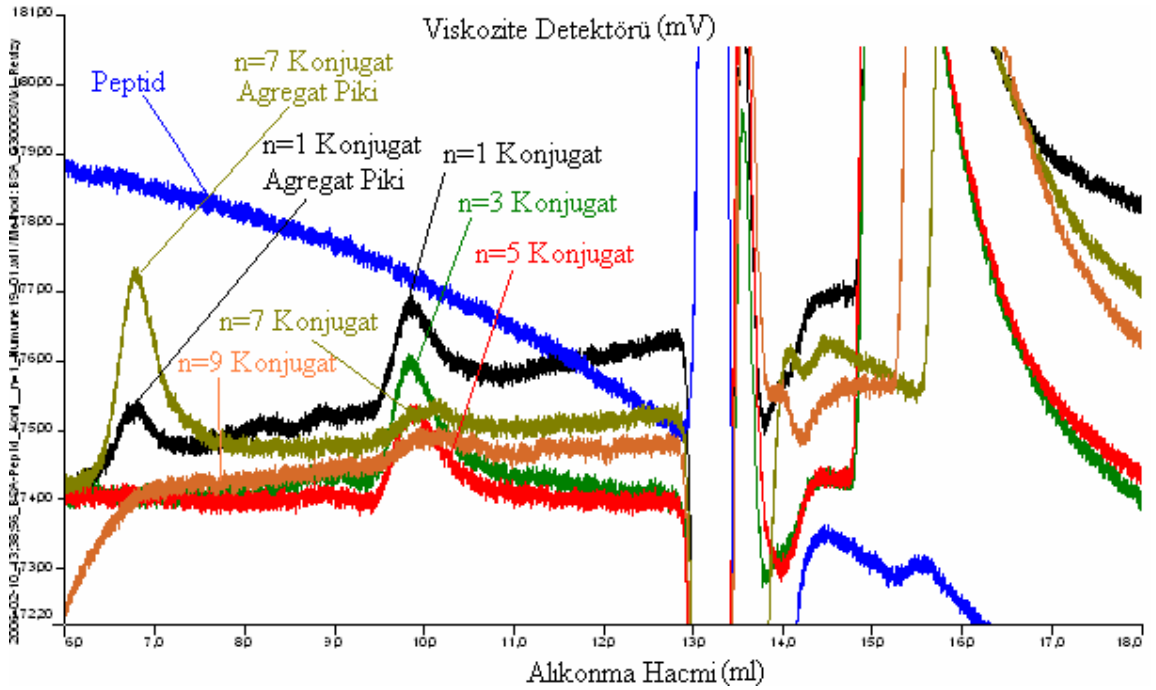
Şekil 8.37 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve ($\blacklozenge$) Peptid’e ait Viscotek UV detektörü kromatogramları



Şekil 8.38 pH 7’de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve ($\blacklozenge$) Peptid’e ait Viscotek Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



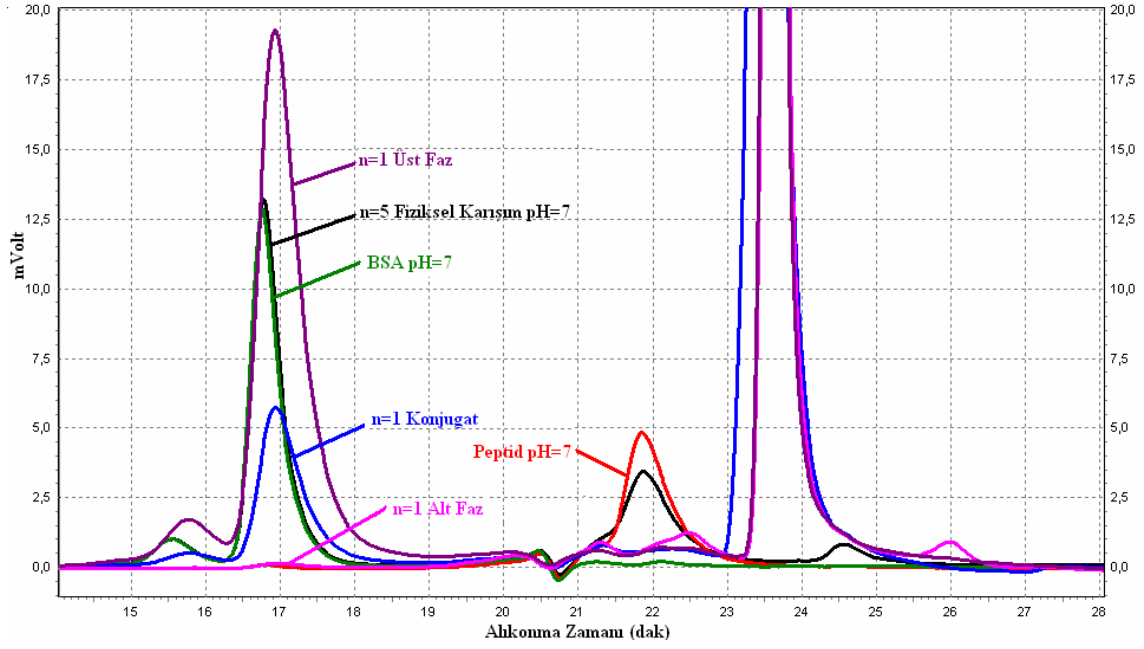
Şekil 8.39 pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve ($\blacklozenge$) Peptid'e ait Viscotek Işık saçılması detektörü kromatogramları



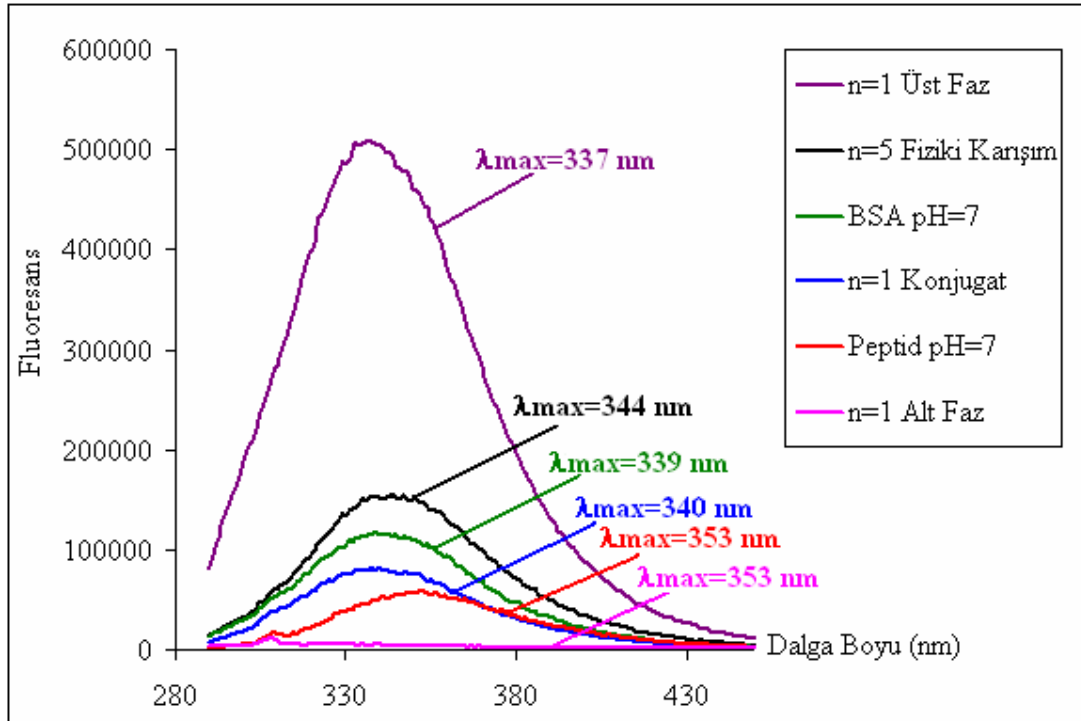
Şekil 8.40 pH 7'de hazırlanmış Konjugat (4. Yöntem), ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, ($\blacklozenge$) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ ve ($\blacklozenge$) Peptid'e ait Viscotek Viskozite detektörü kromatogramları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$ oranı için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatın 10.000 MW ayırma gücüne sahip membranlı tüpte santrifüj edilmesi sonucu elde edilen üst faz, alt faz ve konjugat karşılaştırmalı olarak HPLC ve Floresans cihazları ile analiz edilmiştir.

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$ konjugatının, bu konjugata ait alt fazın ve yine bu konjugata ait üst fazın karşılaştırmalı olarak HPLC kromatogramları Şekil 8.41'de ve Floresans spektrumları Şekil 8.42'de verilmiştir.



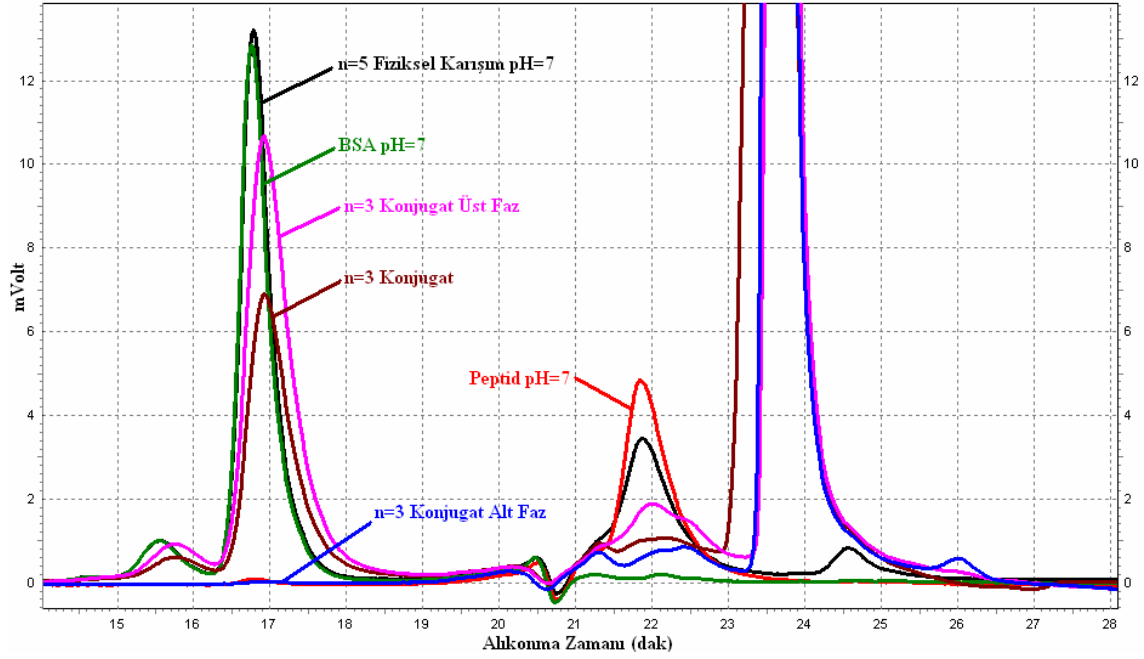
Şekil 8.41 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz HPLC kromatogramları



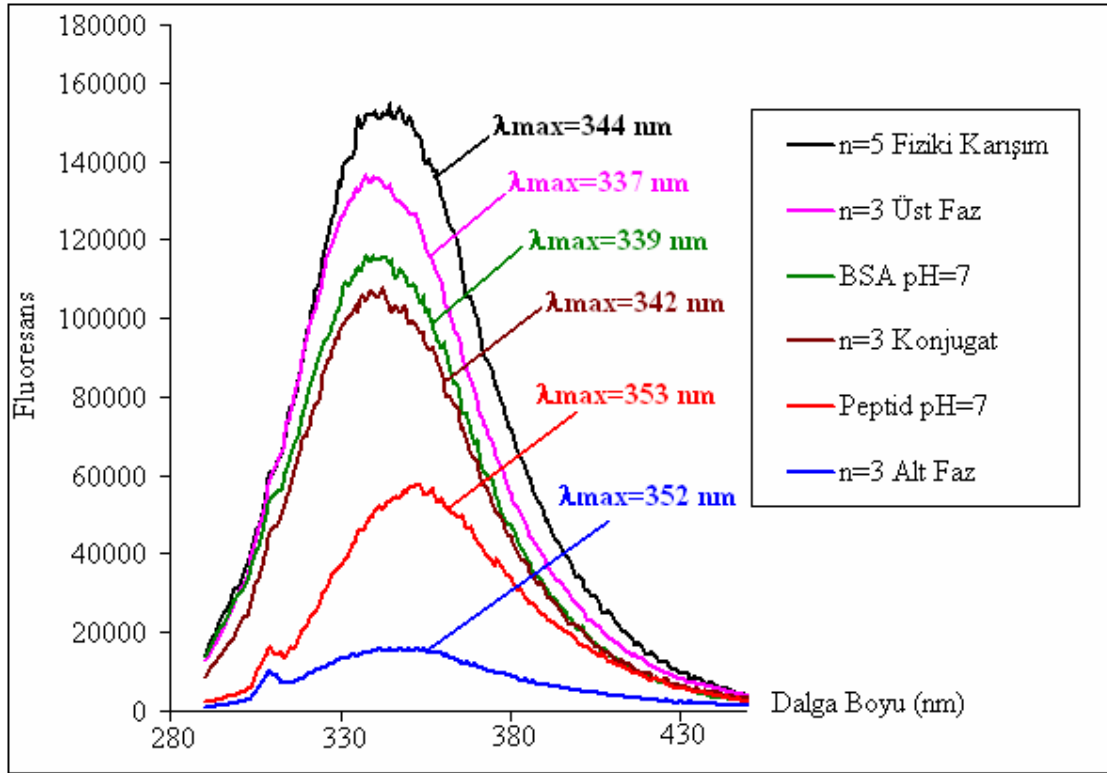
Şekil 8.42 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz Fluoresans spektrumları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranı için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatın 10.000 MW ayırma gücüne sahip membranlı tüpte santrifüj edilmesi sonucu elde edilen üst faz, alt faz ve konjugat karşılaştırmalı olarak HPLC ve Floresans cihazları ile analiz edilmiştir.

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$ konjugatının, bu konjugata ait alt fazın ve yine bu konjugata ait üst fazın karşılaştırmalı olarak HPLC kromatogramları Şekil 8.43'te ve Floresans spektrumları Şekil 8.44'te verilmiştir.



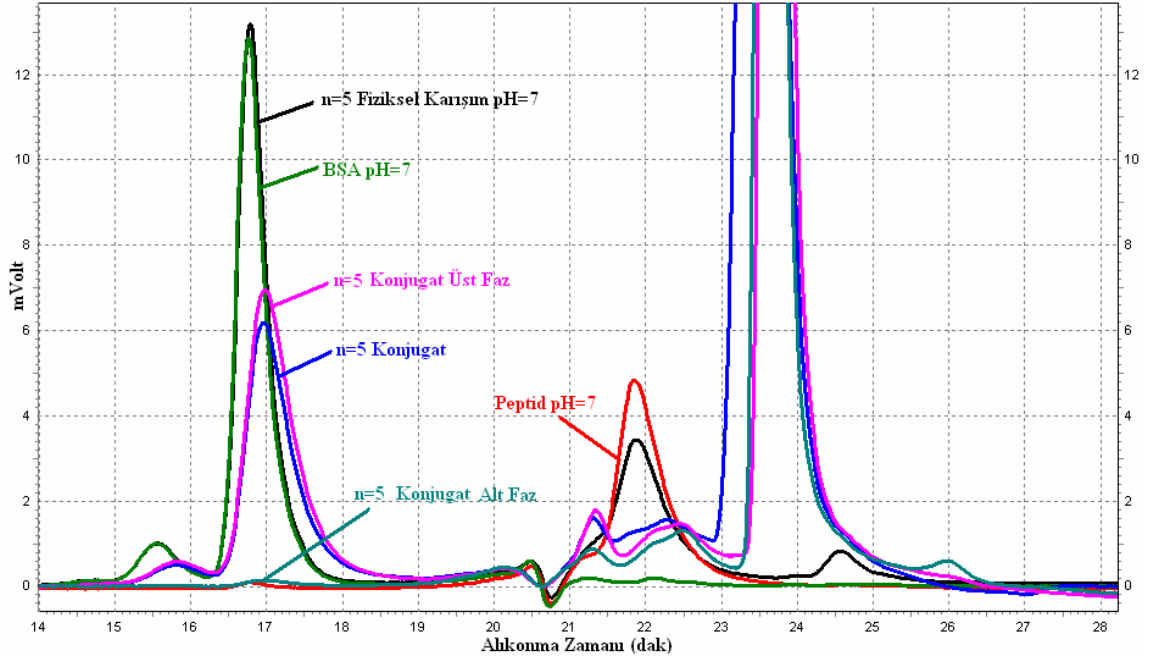
Şekil 8.43 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz HPLC kromatogramları



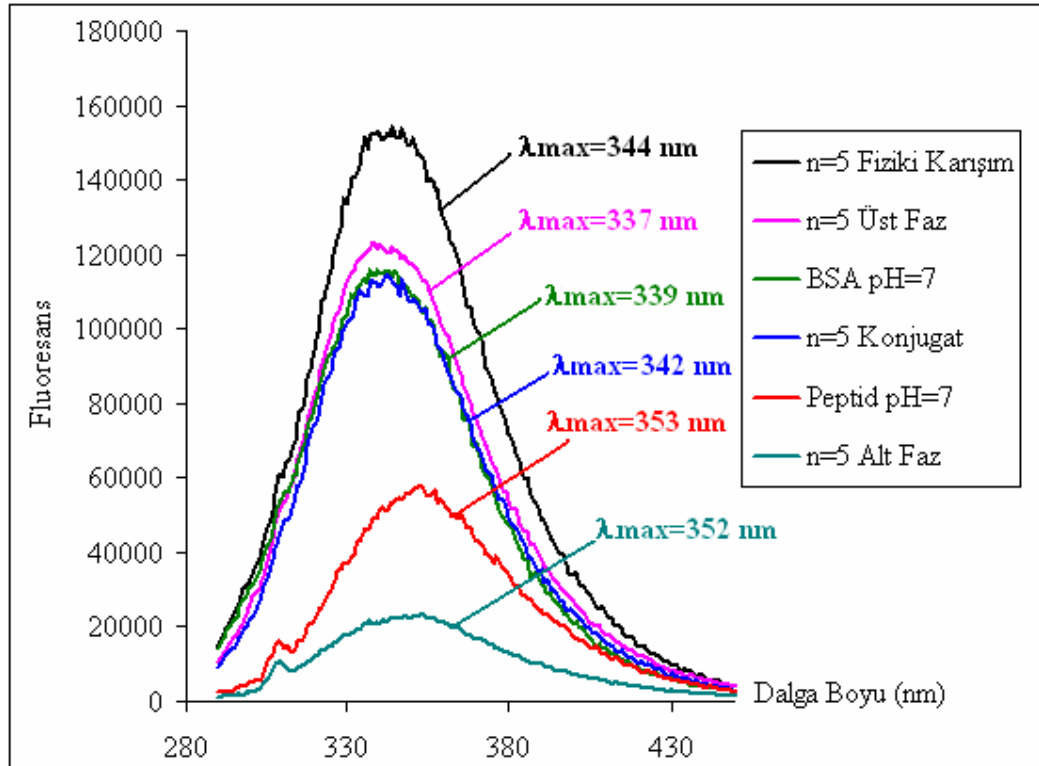
Şekil 8.44 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz Fluoresans spektrumları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatın 10.000 MW ayırma gücüne sahip membranlı tüpte santrifüj edilmesi sonucu elde edilen üst faz, alt faz ve konjugat karşılaştırmalı olarak HPLC ve Floresans cihazları ile analiz edilmiştir.

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ konjugatının, bu konjugata ait alt fazın ve yine bu konjugata ait üst fazın karşılaştırmalı olarak HPLC kromatogramları Şekil 8.45'te ve Floresans spektrumları Şekil 8.46'da verilmiştir.



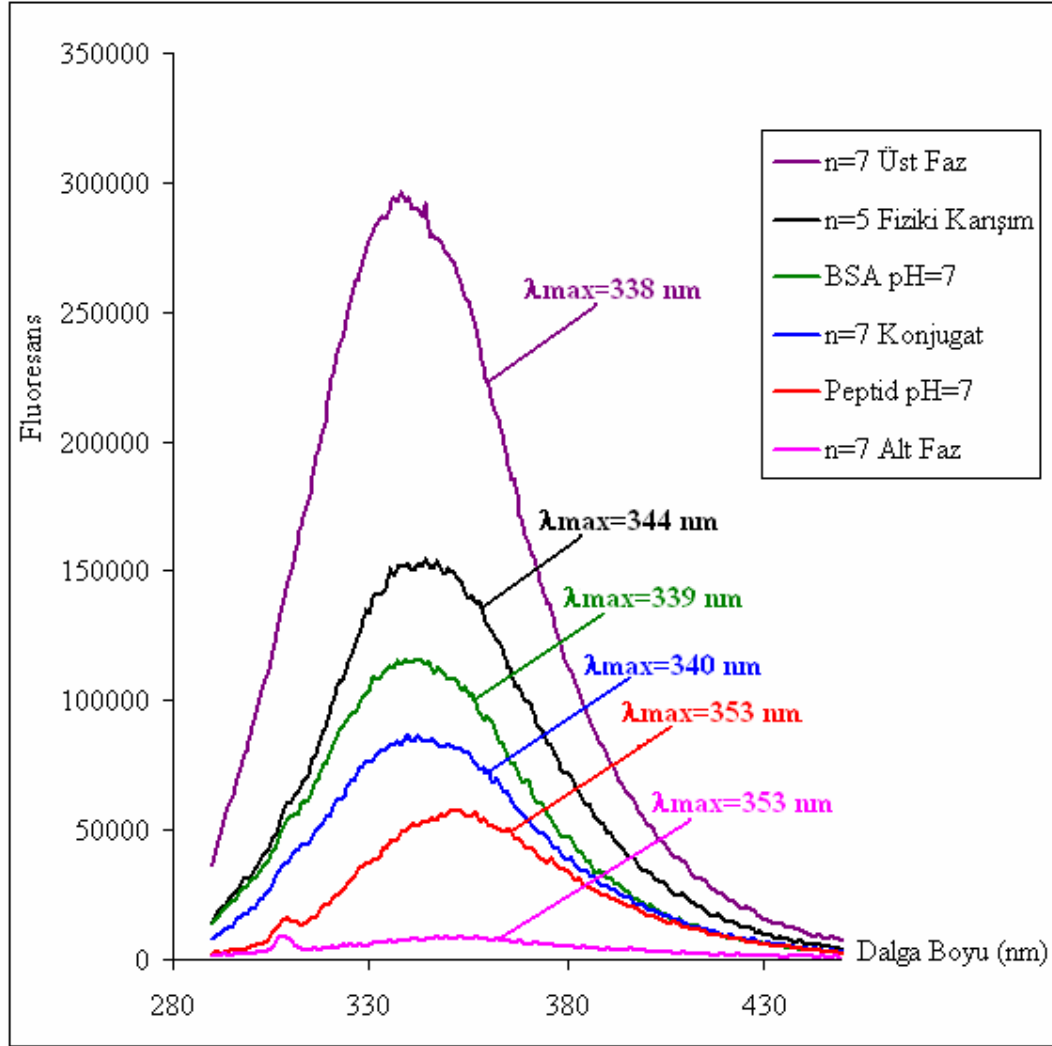
Şekil 8.45 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz HPLC kromatogramları



Şekil 8.46 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz Fluoresans spektrumları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$ oranı için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatın 10.000 MW ayırma gücüne sahip membranlı tüpte santrifüj edilmesi sonucu elde edilen üst faz, alt faz ve konjugat karşılaştırmalı olarak Floresans Spektrofotometre’de ile analiz edilmiştir.

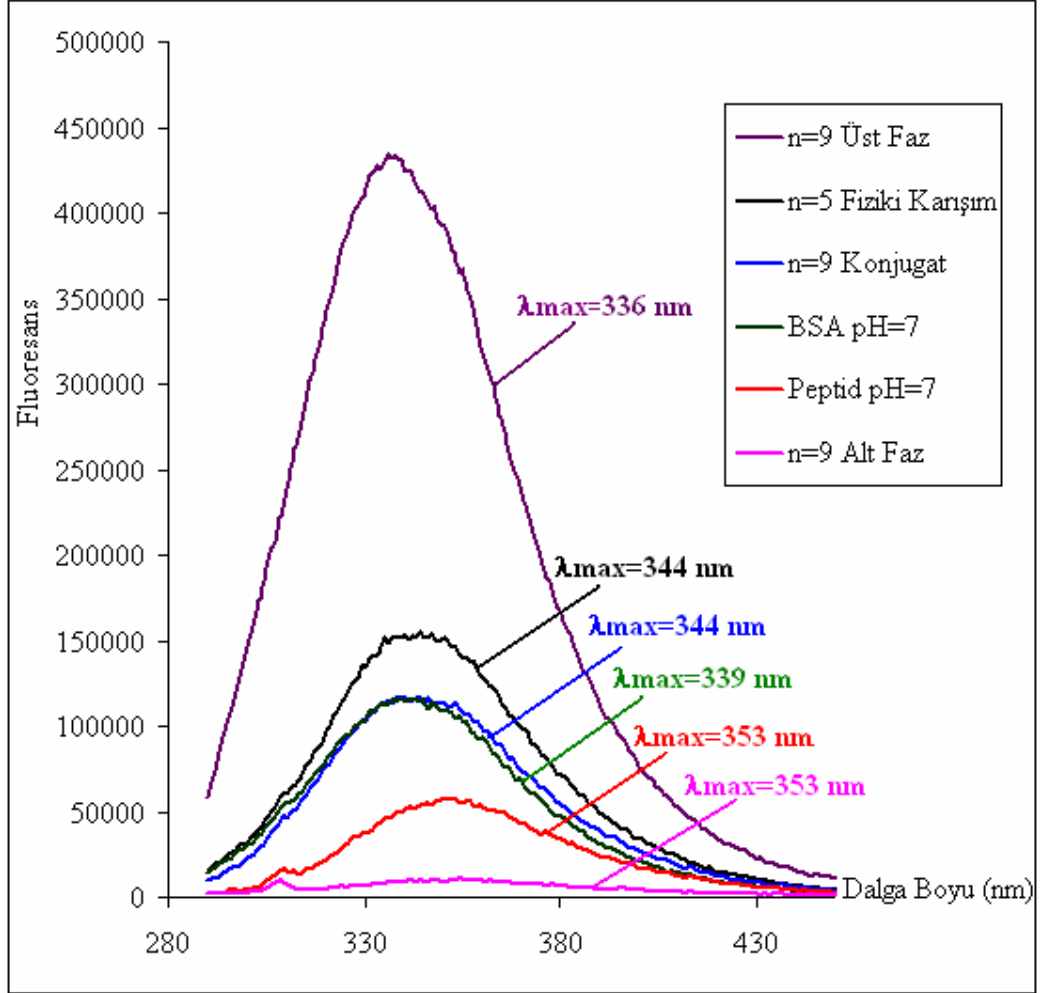
$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$ konjugatının, bu konjugata ait alt fazın ve yine bu konjugata ait üst fazın karşılaştırmalı olarak Floresans spektrumları Şekil 8.47’de verilmiştir.



Şekil 8.47 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz Floresans spektrumları

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ oranı için 4. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatın 10.000 MW ayırma gücüne sahip membranlı tüpte santrifüj edilmesi sonucu elde edilen üst faz, alt faz ve konjugat karşılaştırmalı olarak Floresans Spektrofotometre’de ile analiz edilmiştir.

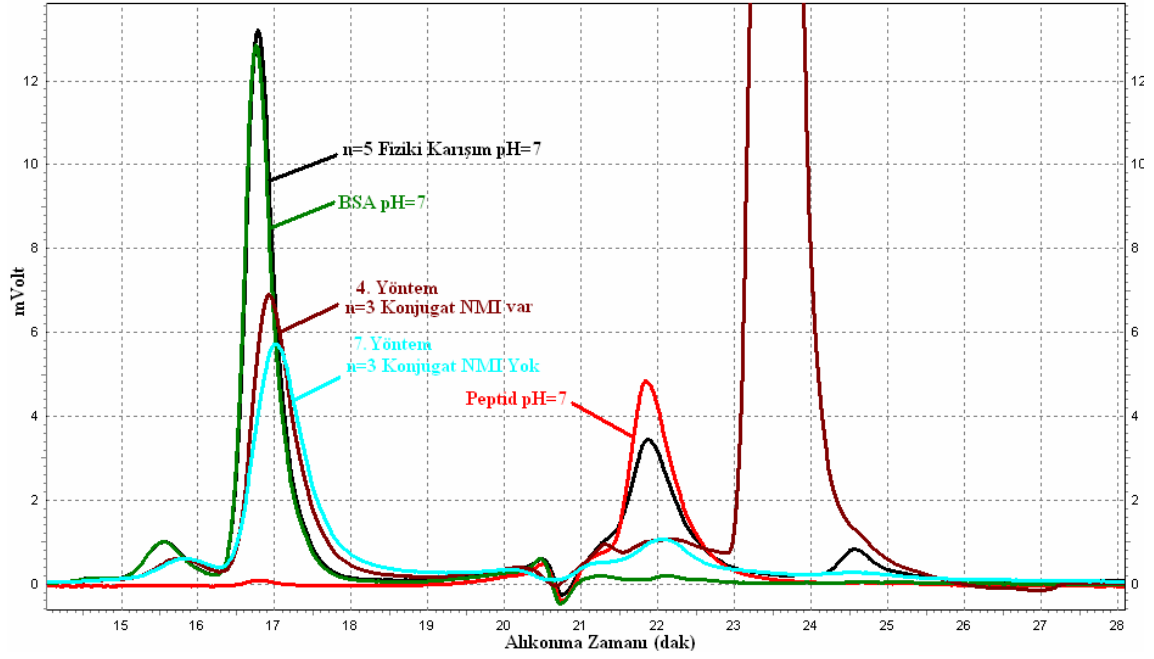
$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ konjugatının, bu konjugata ait alt fazın ve yine bu konjugata ait üst fazın karşılaştırmalı olarak Floresans spektrumları Şekil 8.48’de verilmiştir.



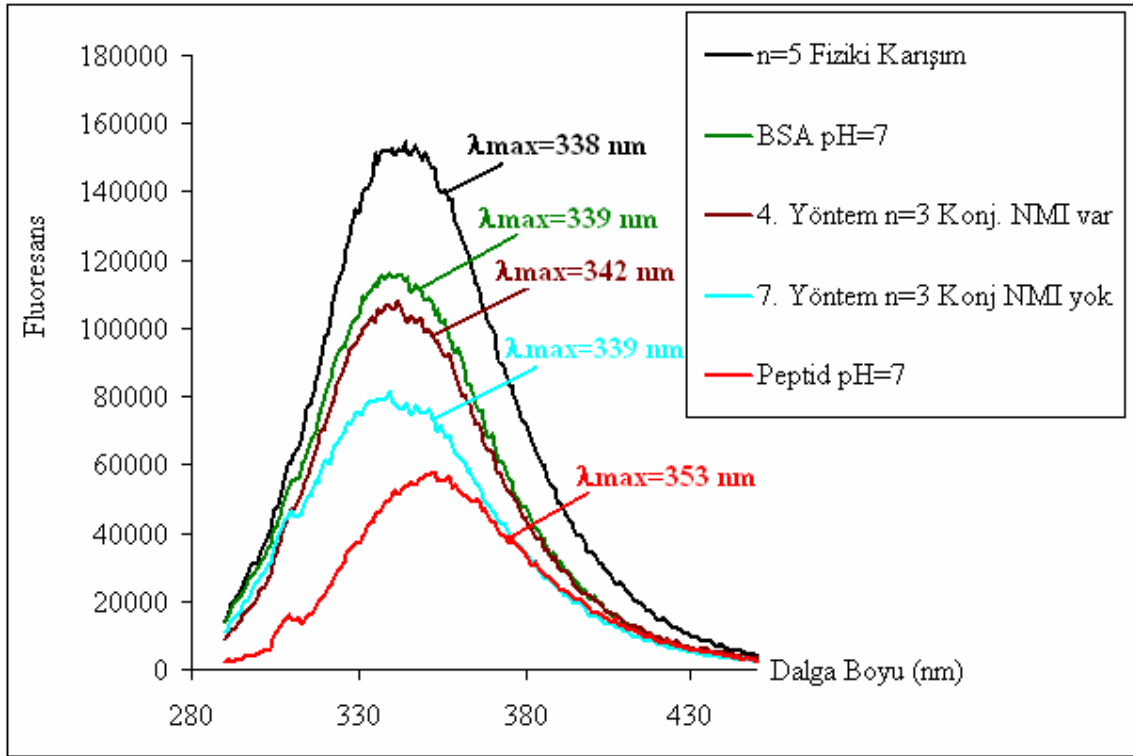
Şekil 8.48 pH 7’de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid, (♦) Konjugat (4. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$) ve 10.000 MW özellikteki membranlı tüpte santrifüj edilen konjugata ait (♦) Alt faz ve (♦) Üst faz Floresans spektrumları

7. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranı için gereken miktarlarda peptid ve BSA, PBS tamponunda çözünmüştür (Toplam hacim 12 mL olacak şekilde ve 7. Yönteme göre NMI reaksiyon koşullarında kullanılmamıştır). Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 2 saat aktivasyonu yapılmış ve aktivasyondan sonra karışımın pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 4 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra elde edilen konjugatlar HPLC ve Floresans cihazları ile analiz edilmiştir.

Sentezlenen konjugatlara ait HPLC kromatogramı 4. Yöntem ile elde edilen konjugatla karşılaştırmalı olarak Şekil 8.49'da, Floresans spektrumu ise Şekil 8.50'de verilmiştir.

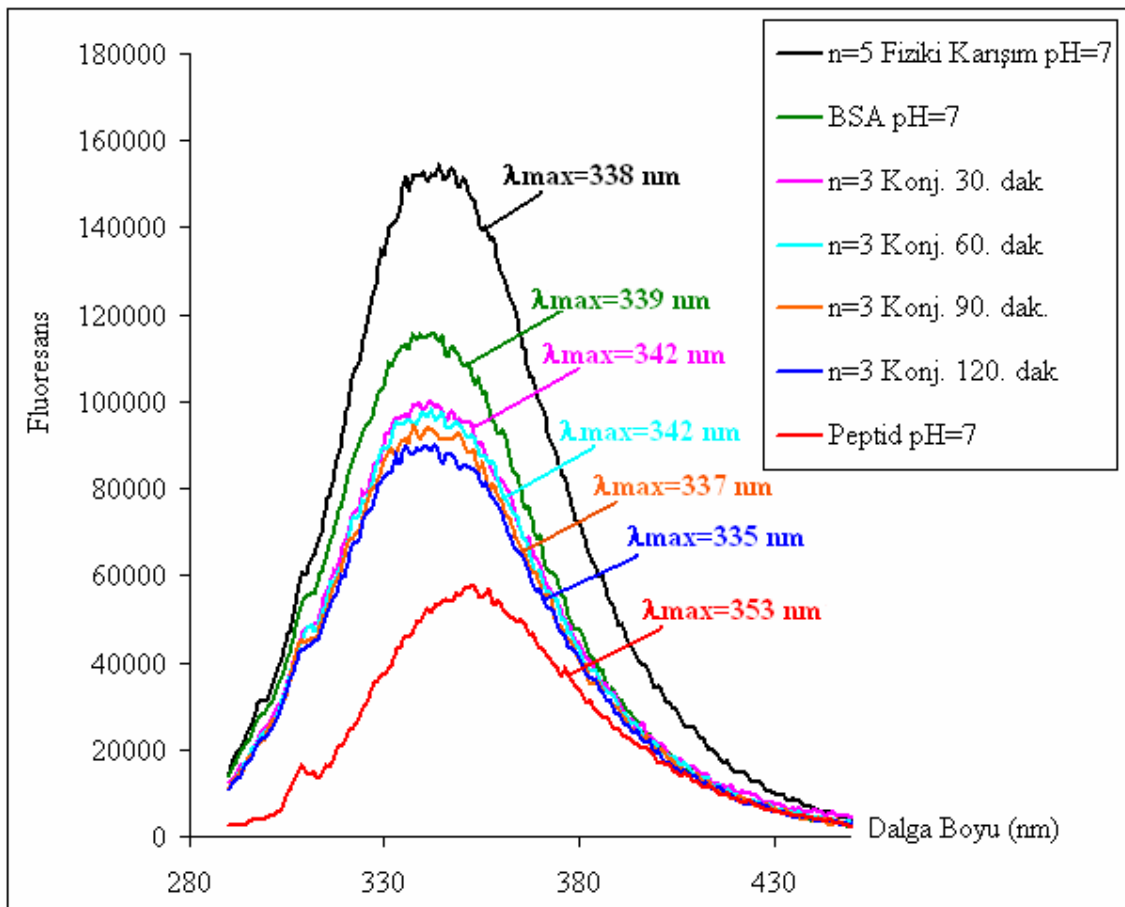


Şekil 8.49 pH 7’de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) (◆) 4. Yöntem (NMI var), (◆) 7. Yöntem (NMI Yok), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait HPLC kromatogramları



Şekil 8.50 pH 7’de hazırlanmış Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) (◆) 4. Yöntem (NMI var), (◆) 7. Yöntem (NMI Yok), (◆) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (◆) BSA ve (◆) Peptid’e ait Fluoresans spektrumları

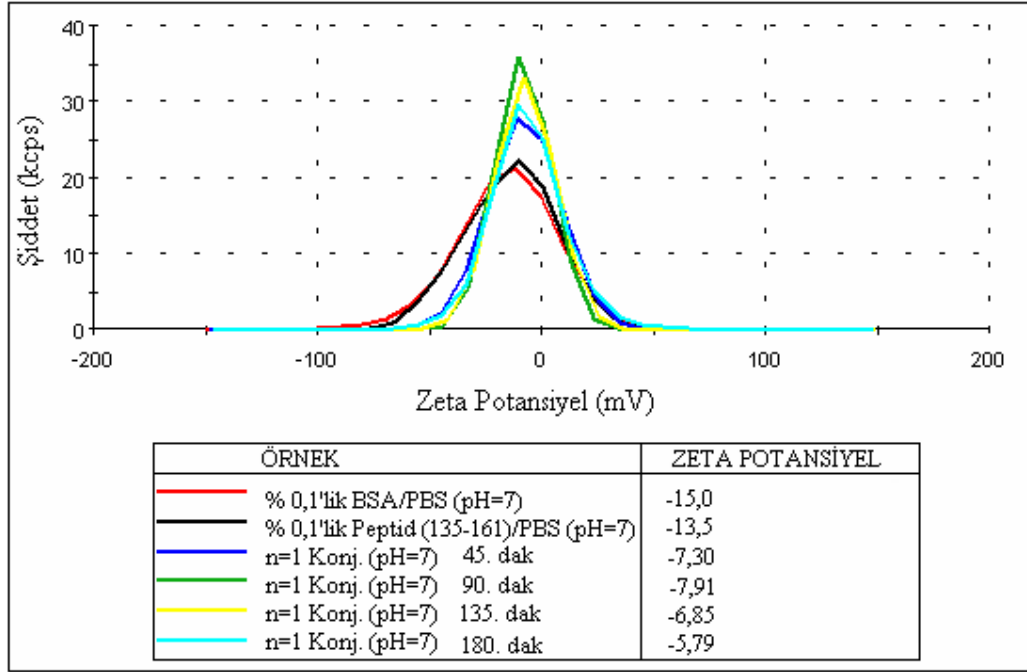
7. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranı için gereken miktarlarda peptid ve BSA, PBS tamponunda çözünmüştür (Toplam hacim 12 mL olacak şekilde ve 7. Yönteme göre NMI reaksiyon koşullarında kullanılmamıştır). Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 2 saat aktivasyonu yapılmış ve aktivasyondan sonra karışımın pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 1 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra yarım saat aralıklar ile konjugat Floresans cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen Floresans spektrumu Şekil 8.51'de verilmiştir.



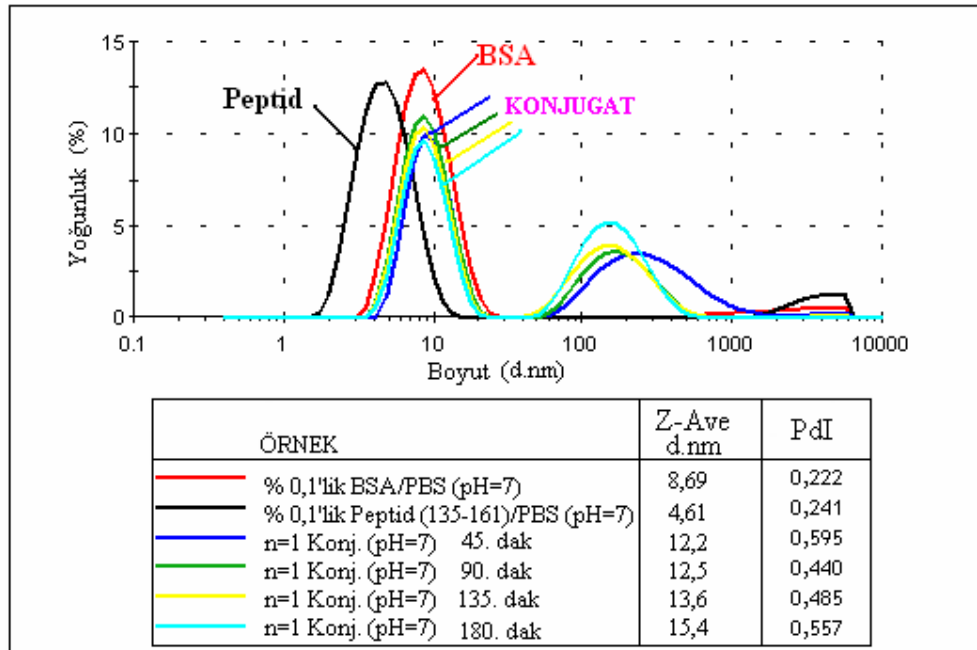
Şekil 8.51 pH 7'de hazırlanmış (♦) Fiziki Karışım ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$), (♦) BSA, (♦) Peptid ve 30 dak. aralıklar ile [(♦) 30. dak., (♦) 60. dak., (♦) 90. dak., (♦) 120. dak.] Konjugat ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) için yapılan ölçümlere ait Floresans spektrumları

8.4 135-161 Dizilimli Peptid ile Yapılan Deneylerin Zetasizer Sonuçları

7. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$ oranı için gereken miktarlarda peptid ve BSA, PBS tamponunda çözünmüştür (Toplam hacim 12 mL olacak şekilde ve 7. Yönteme göre NMI reaksiyon koşullarında kullanılmamıştır). Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 2 saat aktivasyonu yapılmış ve aktivasyondan sonra karışımın pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 1 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra 45 dakika aralıklar ile konjugat Zeta sizer cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen Zeta Potansiyel sonuçları Şekil 8.52'de, boyut sonuçları ise Şekil 8.53'te verilmiştir.

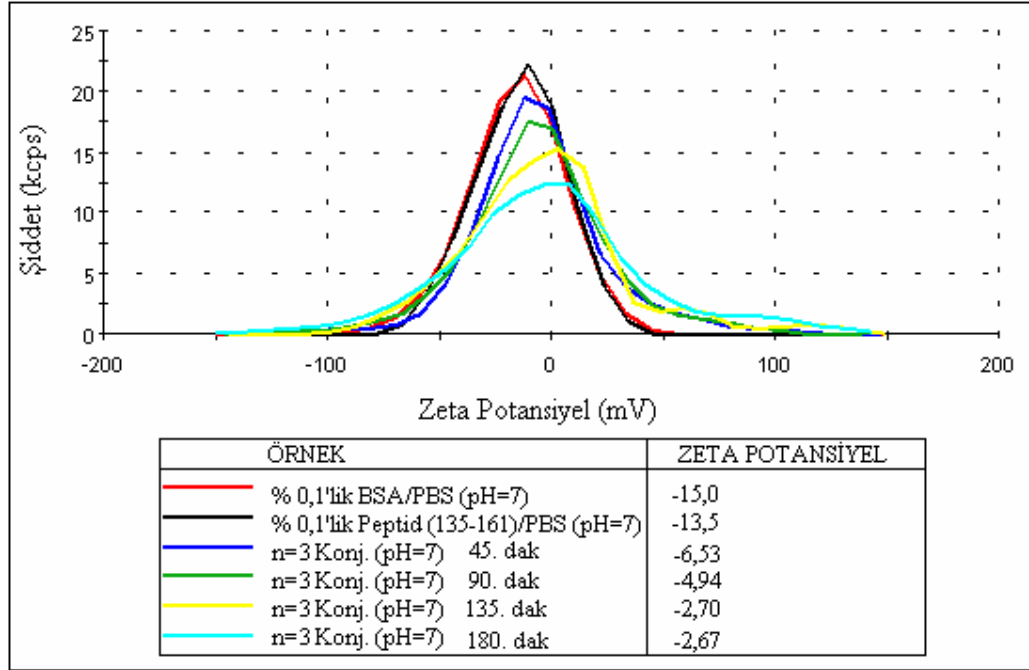


Şekil 8.52 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri

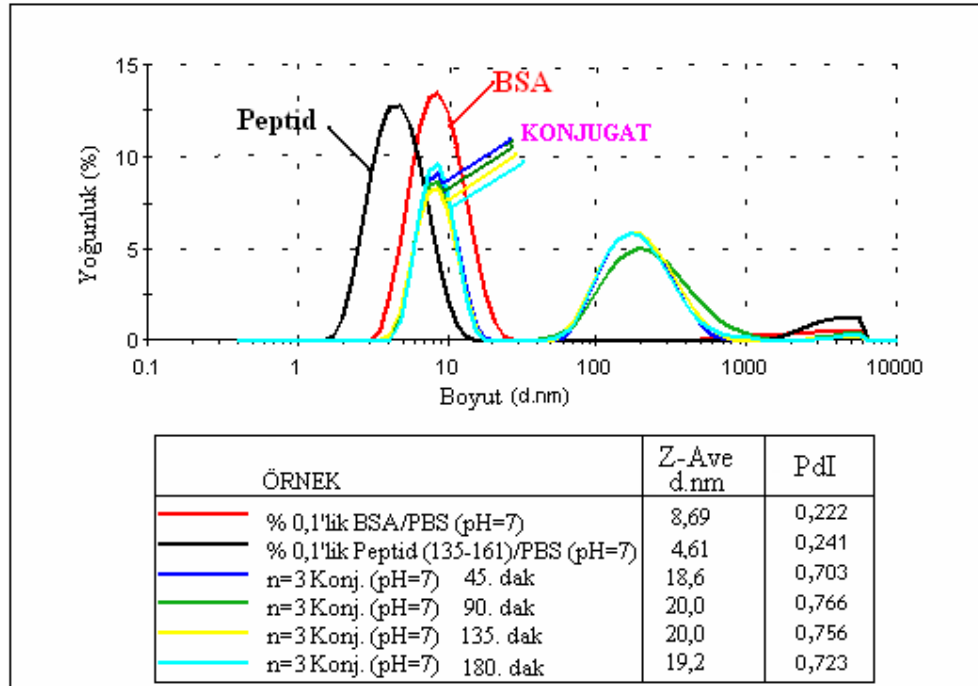


Şekil 8.53 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri

7. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$ oranı için gereken miktarlarda peptid ve BSA, PBS tamponunda çözünmüştür (Toplam hacim 12 mL olacak şekilde ve 7. Yönteme göre NMI reaksiyon koşullarında kullanılmamıştır). Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 2 saat aktivasyonu yapılmış ve aktivasyondan sonra karışımın pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 1 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra 45 dakikalık aralıklar ile konjugat Zeta sizer cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen Zeta Potansiyel sonuçları Şekil 8.54'te, boyut sonuçları ise Şekil 8.55'te verilmiştir.

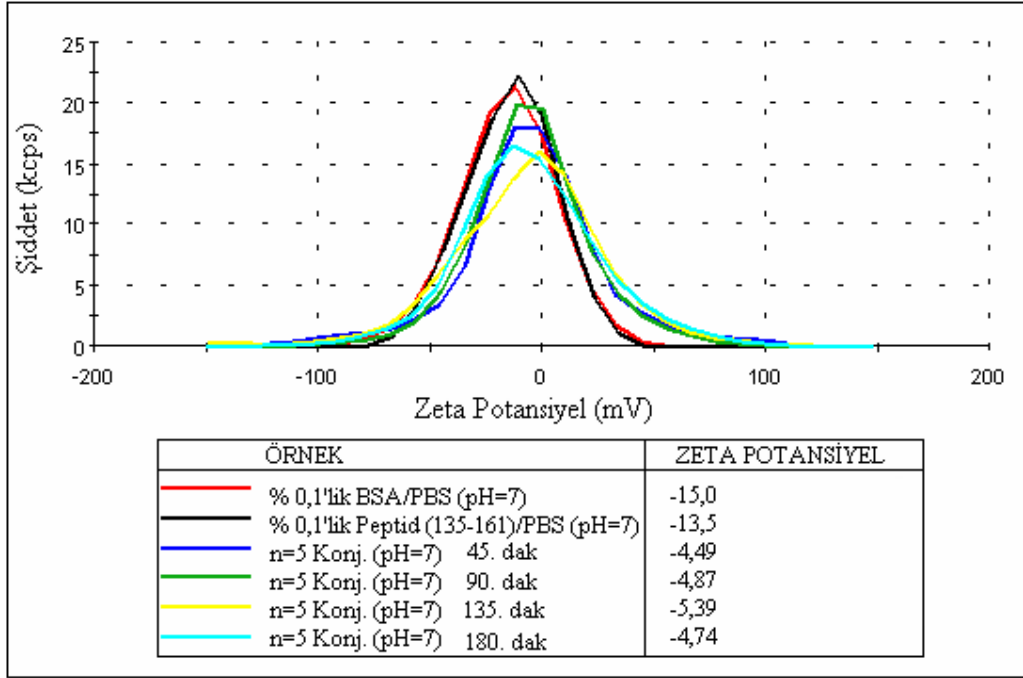


Şekil 8.54 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri

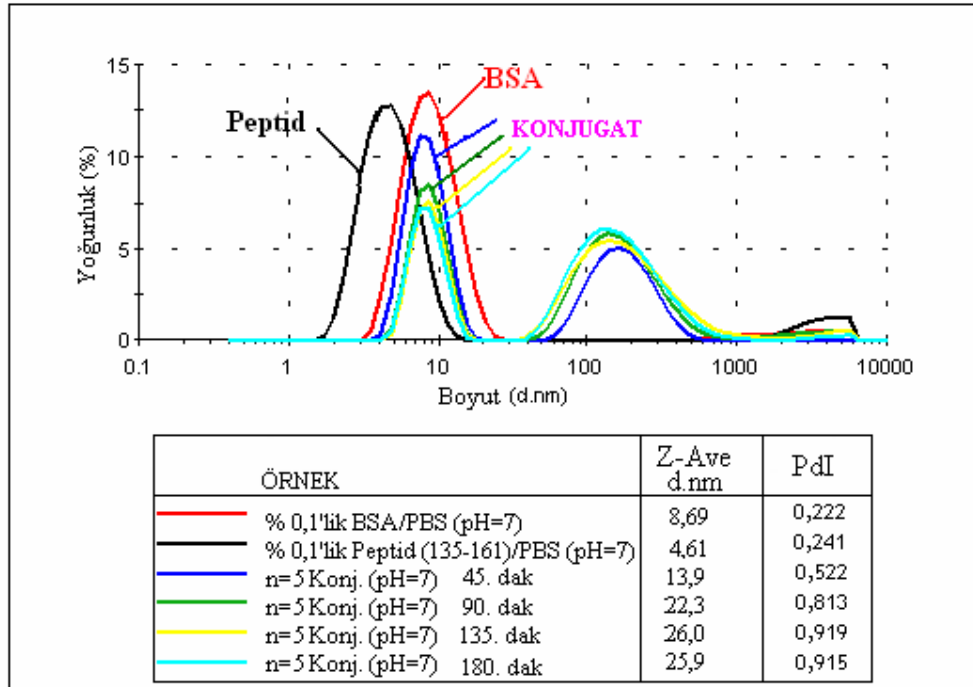


Şekil 8.55 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri

7. Yönteme göre $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranı için gereken miktarlarda peptid ve BSA, PBS tamponunda çözünmüştür (Toplam hacim 12 mL olacak şekilde ve 7. Yönteme göre NMI reaksiyon koşullarında kullanılmamıştır). Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 2 saat aktivasyonu yapılmış ve aktivasyondan sonra karışımın pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. pH=7'de karışımın konjugasyon için 1 saat soğuk odada karıştırılmasından sonra 45 dakikalık aralıklar ile konjugat Zeta sizer cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen Zeta Potansiyel sonuçları Şekil 8.56'da, boyut sonuçları ise Şekil 8.57'de verilmiştir.

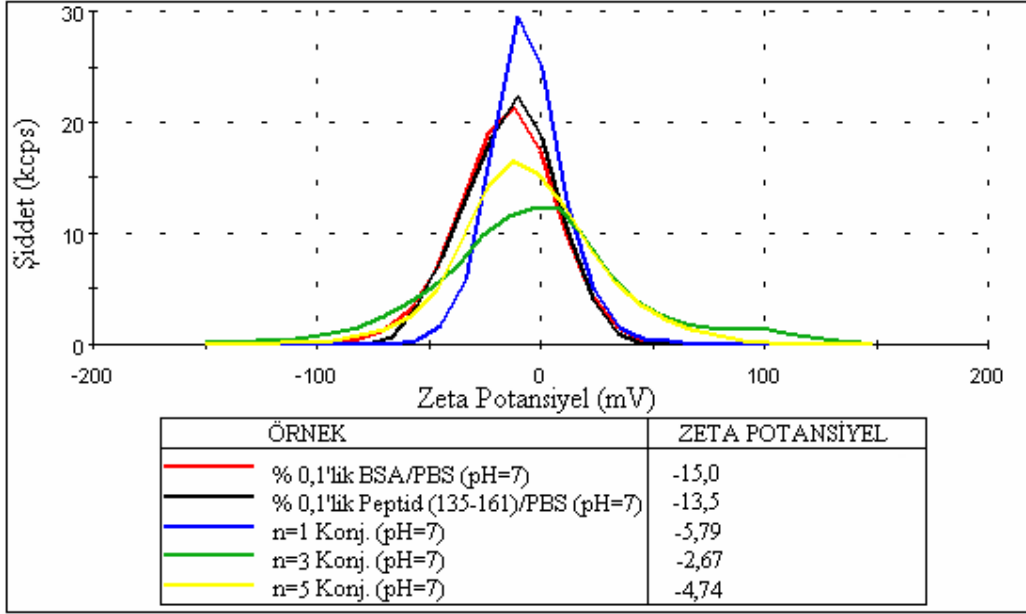


Şekil 8.56 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri

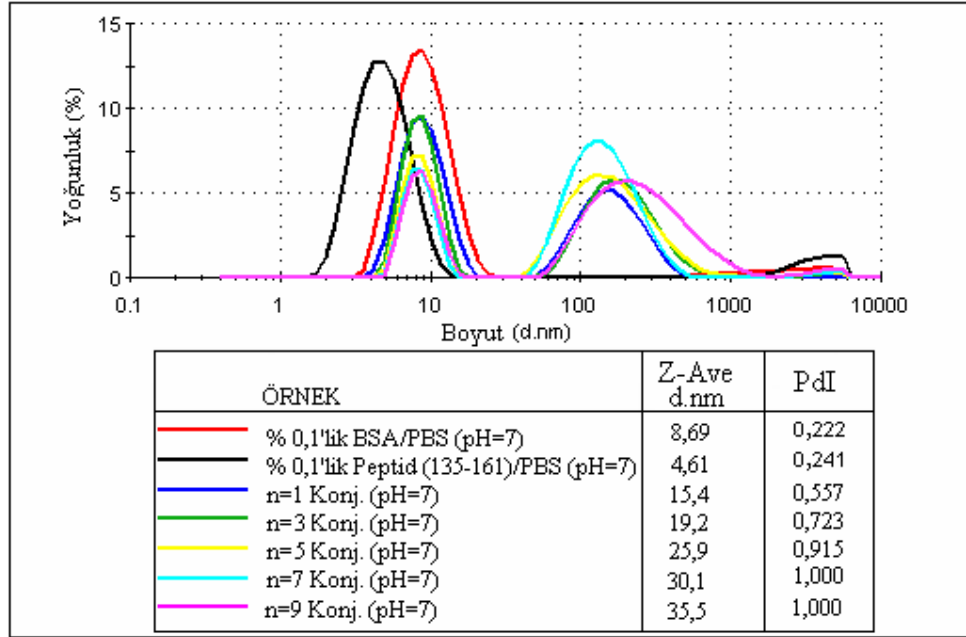


Şekil 8.57 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve 45 dak. aralıklar ile [(♦) 45. dak., (♦) 90. dak., (♦) 135. dak., (♦) 180 dak.] Konjugat (7. Yöntem $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$) için yapılan ölçümlere ait boyut değerleri

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5, 7, 9$ oranları için 7. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatlar karşılaştırmalı olarak Zeta sizer cihazında analiz edilmiştir. Konjugatlara ait Zeta Potansiyel sonuçları Şekil 8.58’de, boyut sonuçları ise Şekil 8.59’da verilmiştir.

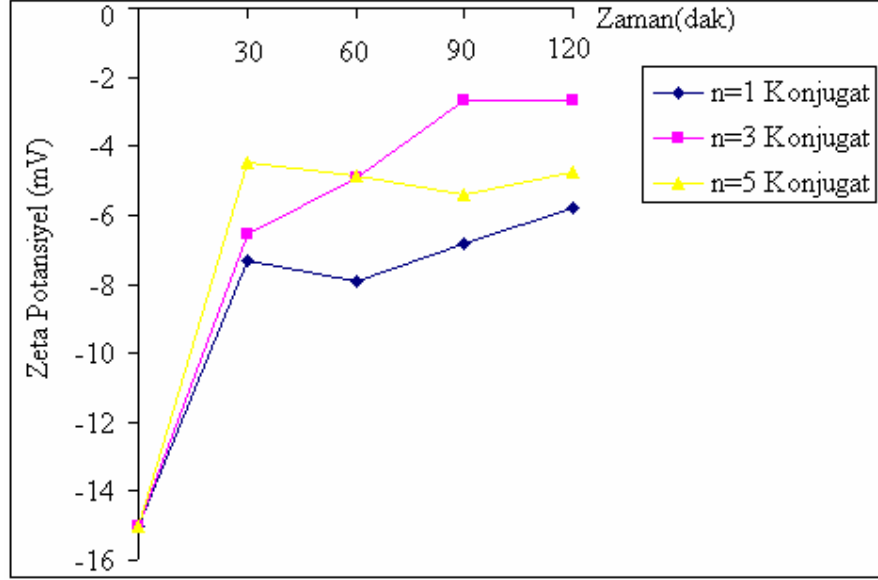


Şekil 8.58 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve Konjugat (7. Yöntem) (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$ için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri

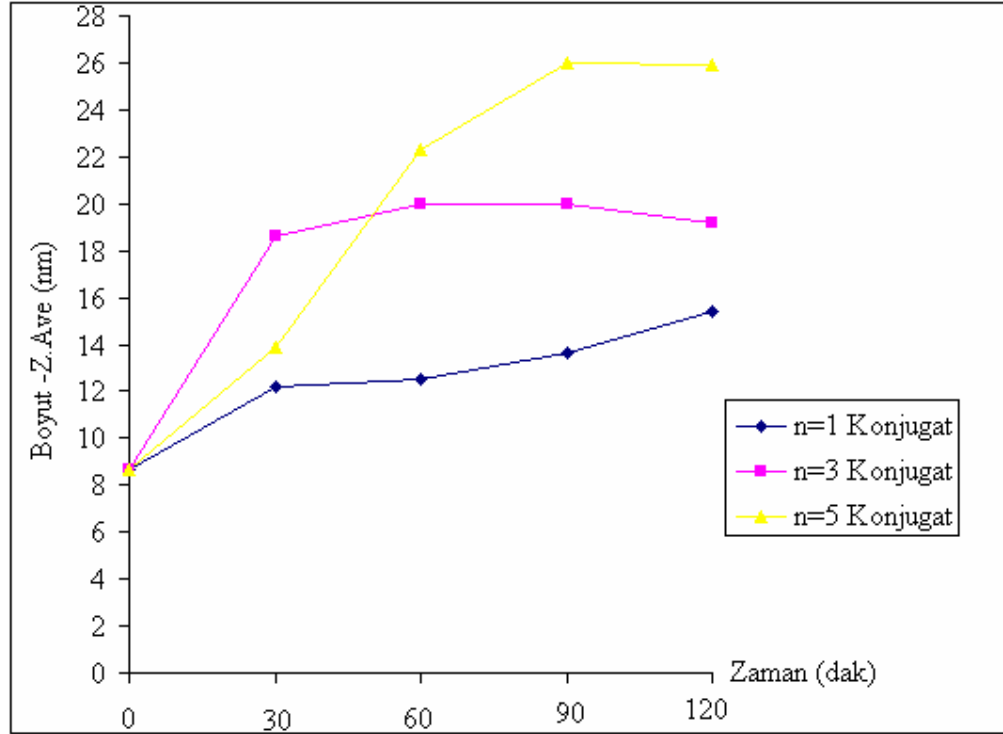


Şekil 8.59 pH 7’de hazırlanmış (♦) BSA, (♦) Peptid ve Konjugat (7. Yöntem) (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=7$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=9$ için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerleri

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5$ oranları için 7. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatların Zeta sizer cihazında elde edilen Zeta potansiyel değerleri Şekil 8.60'ta, boyut değerleri ise Şekil 8.61'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

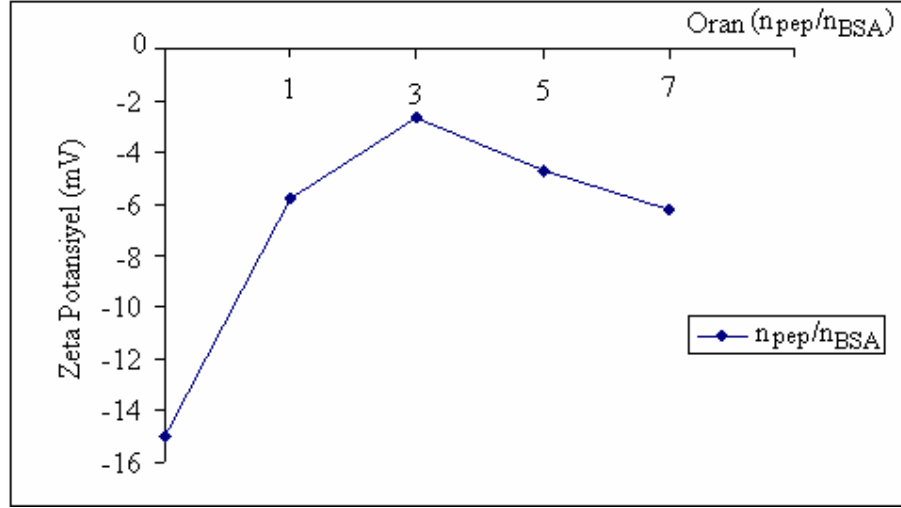


Şekil 8.60 pH 7'de hazırlanmış Konjugatlar (7. Yöntem) [(♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$] için yapılan ölçümlere ait Zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması (n=0 Tek başına BSA)

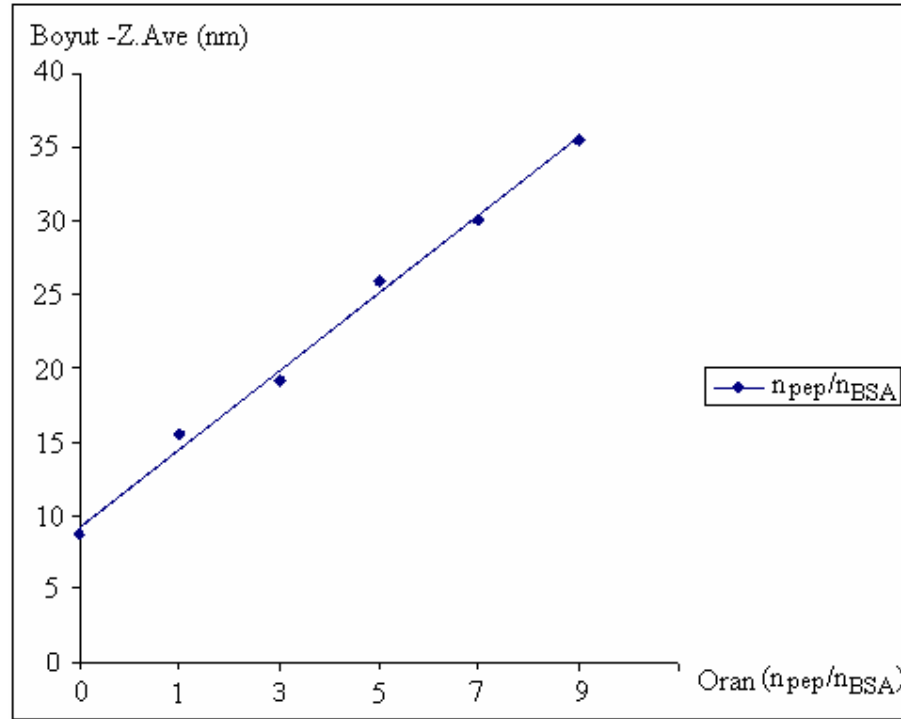


Şekil 8.61 pH 7'de hazırlanmış Konjugatlar (7. Yöntem) [(♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=3$, (♦) $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=5$] için yapılan ölçümlere ait boyut değerlerinin karşılaştırılması (n=0 Tek başına BSA)

$n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1, 3, 5, 7, 9$ oranları için 7. Yöntem kullanılarak hazırlanan konjugatların Zeta sizer cihazında elde edilen Zeta potansiyel değerlerinin orana bağlı karşılaştırılması Şekil 8.62’de, boyut değerlerinin orana bağlı karşılaştırılması ise Şekil 8.63’te verilmiştir.



Şekil 8.62 pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugatlar ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1,3,5,7,9$) için yapılan Zeta potansiyel ölçümlerinin orana bağlı olarak karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA)



Şekil 8.63 pH 7’de hazırlanmış (◆) Konjugatlar ($n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}=1,3,5,7,9$) için yapılan boyut ölçümlerinin orana bağlı olarak karşılaştırılması ($n=0$ Tek başına BSA)

9. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmamızda 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid kullanılarak protein ya da peptid moleküllerinin sahip olduğu karboksil (-COOH) gruplarının aktivasyonu ve oluşan aktif O-açılısoüre ara ürününün sonrasında protein ve peptidlerin yapısında bulunan amino (-NH₂) grupları ile bağlanması sonucu Peptid-Protein kovalent konjugatları sentezlenmiş ve sentezlenen konjugatlar HPLC, Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zeta sizer cihazlarında incelenmiştir.

Çeşitli yöntemlerle ve farklı oranlarda hazırlanan bu konjugatların HPLC ve VISCOTEK cihazları ile analiz edilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar birbirleri ile örtüşmekte ve konjugasyon sonrasında serbest peptid ve serbest BSA pikinde azalma gözlenmektedir. Serbest peptid ve BSA piklerinde görülen azalma reaksiyon ortamına konulan Peptid ve BSA'nın konjugasyon sonucu azaldığını göstermekte bunun yanı sıra konjugasyonla birlikte 280 nm'de max. emisyon yapan Trp'ın, peptid ve BSA moleküllerinin bağlanması ve birbirlerini çevrelemesi sonucu daha içerde kalarak sudan uzaklaşması ve bundan dolayı UV şiddetinin azalması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca konjugasyon oluşumu ile gözlemlenen bulanıklık, konjugasyonun bir kısmının da agregatlaşma ile devam ettiğini göstermektedir ve bu agregatların uzaklaştırılması için yapılan santrifüjden sonra konjugata ait pikin şiddetinde de azalma olacağı düşünülmektedir. Sentezlenen konjugatların HPLC ve Viscotek cihazları ile elde edilen kromatogramları bu düşüncemizi doğrulamış ve konjugata ait pikin serbest BSA'ya göre azaldığı sonuçlarımızda gösterilmiştir.

Konjugatların Floresans ölçümlerini karşılaştırmak için ilk olarak serbest peptid, serbest BSA ve Fiziki Karışımların floresans ölçümleri yapılmış ve bu ölçümlerde; serbest peptidin 353 nm'de, serbest BSA'nın 339 nm'de, fiziki karışımın da 344 nm'de $\lambda_{\max}$ 'a sahip olduğu saptanmıştır. Konjugasyondan sonra ise konjugatların $\lambda_{\max}$ değerlerinin fiziki karışıma göre daha küçük dalga boyuna kaydığı (blue shift) gözlenmiş ve bu değerler 170-188 dizilimli peptid için Çizelge 9.1'de verilmiştir.

Çizelge 9.1 n=1, 3 ve 5 oranları için konjugatların $\lambda_{\max}$ değerleri

Oran	Konjugat	Toplam kayma (nm)
n=1	$\lambda_{\max}=334\text{ nm}$	($\Sigma=10\text{ nm}$ kayma)
n=3	$\lambda_{\max}=339\text{ nm}$	($\Sigma=5\text{ nm}$ kayma)
n=5	$\lambda_{\max}=338\text{ nm}$	($\Sigma=6\text{ nm}$ kayma)

135-161 peptid dizilimi için de yine serbest peptidin 353 nm’de fiziki karışımın ise 344 nm’de $\lambda_{\max}$ değerine sahip olduğu yapılan ölçümler ile saptanmıştır.

135-161 dizilimli peptidin BSA ile 4. Yöntem kullanılarak bağlanması sonucu oluşan konjugatlara ait $\lambda_{\max}$ değerleri ve tüm konjugatların membranlı tüpte santrifüj edilmelerinden (serbest peptidin ortamdan uzaklaştırılmasından) sonra elde edilen alt ve üst faza ait $\lambda_{\max}$ değerleri Çizelge 9.2’de özetlendiği gibi ölçülmüştür.

Çizelge 9.2 n=1, 3, 5, 7 ve 9 oranları için konjugatların ve bu konjugatların santrifüj edilmesinden sonra oluşan alt ve üst fazların $\lambda_{\max}$ değerleri

Oran	Konjugat	Üst Faz	Alt Faz	Toplam kayma (nm)
n=1	$\lambda_{\max}=340$ nm	$\lambda_{\max}=337$ nm	$\lambda_{\max}=353$ nm	($\Sigma=7$ nm kayma)
n=3	$\lambda_{\max}=342$ nm	$\lambda_{\max}=337$ nm	$\lambda_{\max}=352$ nm	($\Sigma=7$ nm kayma)
n=5	$\lambda_{\max}=342$ nm	$\lambda_{\max}=337$ nm	$\lambda_{\max}=352$ nm	($\Sigma=7$ nm kayma)
n=7	$\lambda_{\max}=340$ nm	$\lambda_{\max}=338$ nm	$\lambda_{\max}=353$ nm	($\Sigma=6$ nm kayma)
n=9	$\lambda_{\max}=344$ nm	$\lambda_{\max}=336$ nm	$\lambda_{\max}=353$ nm	($\Sigma=8$ nm kayma)

Tablodan da görüldüğü gibi ortamda reaksiyona girmemiş serbest peptidin bulunmasından dolayı konjugata ait $\lambda_{\max}$ değeri fiziki karışıma daha yakın çıkmaktadır. Ancak membranlı tüp kullanılarak santrifüj yapıp tüm serbest peptidin alt faza geçmesi ile konjugat saflaştırıldıktan sonra üst faza ait $\lambda_{\max}$ değeri 2 ile 8 nm arasında kaymakta ve toplam “Blue shift” artmaktadır.

Farklı konjugatlara ait $\lambda_{\max}$ dalga boyundaki 6-8 nm arasında gözlenen kayma konjugasyon sonucu BSA moleküllerinin yapısındaki ve peptidin N- ucundaki Trp’ın sudan uzaklaştığını ve hidfobik ortama çekildiğini yani BSA molekülleri ile peptid moleküllerinin bağlanması sonucu triptofanil uçlarının daha içerde kaldığını göstermektedir.

Bu değerlerden de görüldüğü gibi tüm konjugatlar n=5 için Fiziki Karışıma ait $\lambda_{\max}$ değerleri ile karşılaştırılmıştır oysa n=7 ve n=9 için reaksiyon ortamına n=5 oranına kıyasla daha fazla peptid eklendiği, bunun da $\lambda_{\max}$ değerinde BSA’ya göre “red shift”e (peptid molekülünün 353 nm’de $\lambda_{\max}$ ’a sahip olmasından dolayı daha, n=7 ve n=9 Fiziki karışımlarının $\lambda_{\max}$

değerlerinde daha büyük dalga boyuna kaymaya) neden olacağı bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak n=1, 3, 5, 7 ve 9 oranları için konjugatların serbest peptidlerden ayrıldıktan sonraki $\lambda_{\max}$ değerleri göz önüne alınarak en fazla bağlanma ve bunun sonucunda Tiriptofanil uçlarının sudan en fazla uzaklaşma gösterdiği oran n=9'dur ve bundan sonra azalarak sırası ile n=7, n=5, n=3 ve n=1 olarak devam ettiği Fluoresans sonuçlarından görülmektedir.

Konjugatların Zetasizer cihazı ile yapılan zeta potansiyel ölçümlerinde ise tek başına BSA'nın pH=7'de karboksil gruplarının negatif yüklü olmasından dolayı -15,0 mV zeta potansiyele sahip olduğu ölçülmüştür. Ancak konjugasyondan sonra zeta potansiyel değerleri Çizelge 9.3'de verildiği gibi ölçülmüştür.

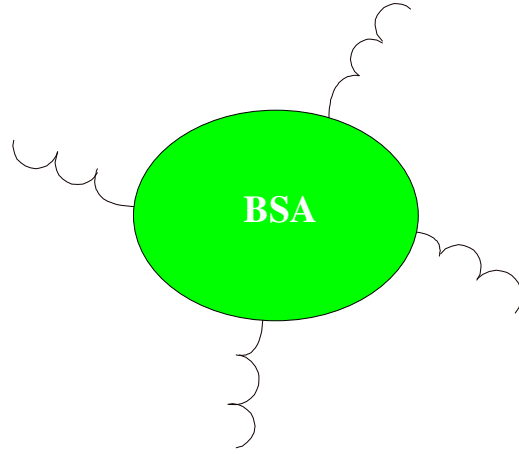
Çizelge 9.3 n=1, 3, 5, 7 ve 9 oranları için konjugatların Zeta potansiyel ve boyut değerleri

Oran	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
n=1	8,69	-5,79
n=3	19,2	-2,67
n=5	25,9	-4,74
n=7	30,1	-6,24
n=9	35,5	—

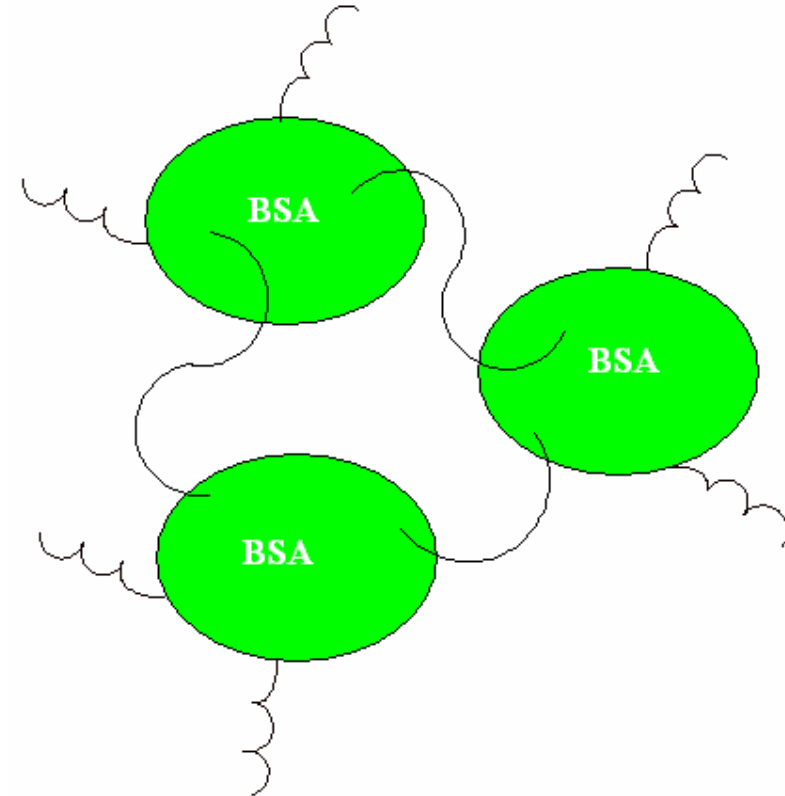
Buradaki Zeta potansiyel değerlerinin -15.0 mV'dan -2 mV ile -6 mV arasına kayması, BSA ve peptid moleküllerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının konjugasyon sonucu amino grupları ile bağlanması ve amid bağı oluşturması, bunun neticesinde de negatif yüklerinin kaybolması ile açıklanmaktadır. Amid bağı oluşumu ile karboksil grupları nötürleştirilmiş böylece konjugatların net negatif yükleri BSA'ya göre azalmış ve buna bağlı olarak zetapotansiyel değerleri sıfıra daha yakın ölçülmüştür.

Konjugatların Zeta sizer cihazı ile yapılan boyut analizlerinde ise serbest peptidin boyutunun 4,61 nm BSA'nın ise boyutunun 8,69 nm olduğu ölçülmüştür. Konjugasyondan sonra konjugatların boyut ölçümlerinde ise orana bağlı olarak lineer bir artış gözlenmiştir. Bu da konjugat oluşumunda birkaç molekülün birbirlerine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında biz $n_{\text{pep}}/n_{\text{BSA}}$ oranının düşük ve yüksek değerlerinde, konjugat oluşumu açısından iki farklı model yaklaşımında bulunduk (Şekil 9.1 ve Şekil 9.2).



Şekil 9.1 BSA ve peptid moleküllerinin düşük oranlardaki konjugasyonu sonucu oluşan konjugat için düşünülen 1. model



Şekil 9.2 BSA ve peptid moleküllerinin yüksek oranlardaki konjugasyonu sonucu oluşan konjugat için düşünülen 2. model

10. KAYNAKLAR

- Allison, A.G., Gregoriadis, G., (1974), "Liposomes as immunological adjuvants", *Nature*, 15;252(5480):252.
- Alving, C.R., (1977), "in The antigens", New York: Academic Press, Vol. 4, p. 1.
- Aslam, M., Dent, A., (1998), "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences" Macmillan Reference LTD, London.
- Bahçeci, Z. (2002), "Moleküler Biyoloji" Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir.
- 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.
- 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.
- Bragg, P.D., Hou, C., (1975), "Subunit composition, function and spatial arrangement in the Ca^{2+} , and Mg^{2+} , activated adenosine triphosphatases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 311-321
- Brooks, B.R., Klammerth, O.L., (1968), "Interaction of DNA with bifunctional aldehydes", *Eur. J. Biochem.* 5,178.
- Carter, D.C., Ho, J.X., (1994), "Structure of Serum Albumin", *Adv. Protein Chem.*, 45:153-203.
- Carraway, K.L., Koshland, D.E., Jr. (1968), "Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents", *Biochim. Biophys. Acta.* 26;160(2):272-4.
- Carraway, K.L., Triplett, R.B., (1970), "Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups", *Biochim. Biophys. Acta.* 31;200(3):564-6.
- Cater, C.W., (1963), "The evaluation of aldehydes and other difunctional compounds as cross-linking agents for collagen, *J. Soc. Leather Trade Chem.* 47, 259.
- 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.
- Chow, M., Yabrov, R., Bittle, J., Hogle, J., Baltimore, D., (1985), "Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies", *Proc. Natl. Acad. Sci. Microbiology*, 82:910-914.
- 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 B₁", *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1125-1128.
- Çimen, N.S., (2006), "Proteinlerin Poliakrilik Asid ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri", Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü
- 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, 2383-2392.
- Fein, M.L., Flachione, E.M., (1957), "Tunning studies with aldehydes", *J.Am. Leather Chem. Assoc.* 52, 17.
- 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 By
- 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.
- Gregoriadis, G. Leathwood, P.D., Ryman, B.E., (1971), "Enzyme entrapment in liposomes", *FEBS Lett.*, 14(2):95-99.
- Gürhan, Deliloglu S.I., Akdeste, M.M., Akdetse, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N., Celik, N., (2002), "Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine", In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix41, pp.349-357, FAO,UN2002.
- 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.
- Hartman, F.C., and Wold, F., (1966), *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3890-3891
- Heath. T.D., Edwards, D.C., and Ryman, B.E., (1976), "The adjuvant properties of liposomes", *Biochem. Soc. Trans.*, 4(1):129-33.
- Hermanson, G.T., "Bioconjugate Techniques" (1996), Academic Pres, California.
- Hoffman, A.S., (2000), "Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations", *Clinical Chemistry*. 46:9 1478-1486
- Hopwood, D., (1969), "Comparison of the cross-linking abilities of glutaraldehyde, formaldehyde, and α -hydroxyadipaldehyde with bovine serum albumin and casein", *Histochemie* 17,151
- Ji, T.H., (1979), "The aplication of chemical cross-linking for studies of cell membrane and the identification of surface reporters", *Biochim. Biophys. Acta* 559,39.
- Kiehm, D., Ji, T.H., (1977), "Photochemical cross-linking of cell membranes", *J. Biom. Chem.* 252, 8524-8531
- 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.

Kosarev, E.L., Muranov, K.O., (2003), "Chromatography + RECOVERY = superresolution chromatography", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 502:764-767.

Laserman, L.D., Barbet, J., Kourilsky, F., (1980), "Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A", *Nature*. 11:288(5791):602-604.

Latif, N., Bachhawat, K.B., (1984), "Liposomes in immunology", *J. Biosci.*, 6:491-502.

Lifshitz, R., Gitler, C., and 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.

Lomant, A.J., Fairbanks, G., (1976), "Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable cross-linking reagent[³⁵S] dithiobis(succinimidylpropionate)". *J. Mol. Biol.*, 104, 243-261

Mohammed, R., Perrie, Y., (2005), "Liposome Solutions For Poorly Soluble Drugs", *Drug Delivery Report Autumn/Winter*

Mustafaev, M.I., (1996), "Biyopolimerler", TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Matbaası, Gebze, KOCAELİ

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

Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., (2002), "Novel polypeptide-comprising biopolymer system", *Tecnology and Health Care*, 10:217-226.

Mustafaev, M.I. (2004), "Functionally Biopolymer Systems", *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 4, 1.

Peters, T., Jr. (1985). "Serum Albumin", *Adv. Protein Chem.*37; 161-245.

Plate N.A., Vasiliev A.E., "Physiological active polymers", Moscow: Khimia, 1986.

Qiu, W., Zhang, L., Okobiah, O., Yang, Y., Wang, L., Zhong, D., Zewail, A.H., (2006), "Ultrafast Solvation Dynamics of Human Serum Albumin: Correlations with Conformational Transitions and Site-Selected Recognition", *American Chemical Society, J. Phys. Chem. B*.

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.

Richard, F.M., Knowles, J.R., (1968), "Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagents", *J. Mol. Biol.* 37-231

Sanchez, Y., Ionescu-Matiu, I., Dreesman, G.R., Kramp, W., Six, H.R., Hollinger, F.B., Melnick, J.L., (1980), "Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund complete adjuvant alum, and liposomes", *Infect. Immun.* 30(3):728-33.

Scranton A. B, Rangarajan B, Klier J. (1995), "Biomedical applications of polyelectrolytes", In: Peppas NA, Langer RS, editors. *Biopolymers II*. Berlin:Springer, , p:3-54.

- Seligsberger L., Sadlier, C., (1957), "New developments in tanning with aldehyde", J. Am. Leather Chem. Assoc. 52,2
- Shek, P.N., Heath, T.D., (1983), "Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. III. Immunogenicity of bovine serum albumin covalently coupled to vesicle surface", Immunology, 50(1):101-107.
- 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
- Staros, J.V., (1982), "N-Hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane impermeant, protein cross-linkers", Biochemistry 21,3950-3955.
- Torchilin, V.P., Goldmacher, V.S., Smirnov, V.N., (1978), "Comparative studies on covalent and noncovalent immobilization of protein molecules on the surface of liposomes", Biochem. Biophys. Res. Commun. 14;85(3):983-90.
- 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.
- van Rooijen, N., van Nieuwmegen, 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
- Wilbur, D.S., (1992), "Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling", Bioconjugate Chem. 3, 433-470
- 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
- Yamada, H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K., Motomura, M., (1981), "Selective modification of aspartic acid-101 in lysozyme by carbodiimide reaction", Biochemistry 20, 4836-4842.

Zetasizer Nano Series User Manual

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.usetute.com.au/proteins.html>
- [2] <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/protein2.htm#aacd7c>
- [3] <http://www.usetute.com.au/images/lysozyme.gif>
- [4] http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/476/488316/Instructor_Resources/Chapter_19FG19_07.JPG
- [5] <http://www-biol.paisley.ac.uk/courses/stfunmac/glossary/collagen.html>
- [6] <http://www.stark.kent.edu/~cearley/PChem/protein/protein.htm>
- [7] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/NoncovalentBonds.gif>
- [8] <http://www.indstate.edu/thcme/mwking/protein-structure.html>
- [9] <http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/images/vdw.gif>
- [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.nestgrp.com/protocols/trng/lec30img/>
- [15] <http://www.sartorius.com/index.php?id=2768>
- [16] http://matchmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise_15.htm
- [17] http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060_equipment/020_chromatography/020_sec/index.html
- [18] http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec_chromatography.jpg

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	15.05.1981	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1995-1998	Eyüp Refhan Tümer Lisesi
1. Lisans	1998-2003	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
2. Lisans	2000 -	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	2003-2006	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurumlar

2004 -	Y.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Araştırma Görevlisi
--------	--