

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROTOKSİN ANALİZİ İÇİN İMMÜNASSAY  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Meryem IŞIK**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2021



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROTOKSİN ANALİZİ İÇİN İMMÜNASAY  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Meryem IŞIK**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışmanlar:  
Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK  
Doç. Dr. Naci ÇİNE

TÜBİTAK 1009 Tavşan Serum Projesi 117H001  
16563500-111-103

KOCAELİ

2021

## ÖZET

### Nörotoksin Analizi İçin İmmünassay Geliştirilmesi

Amaç: Anaerobik sporlu bir bakteri olan *Clostridium botulinum* tarafından üretilen Botulinum nörotoksini (BoNT) doğada bilinen en potent toksindir. Moleküler ağırlığı 150 kDa olan toksin, proteinin tersiyer yapısında meydana gelen iki aşamalı modifikasyon ile iki zincirli hale gelir. Bu haliyle sinir hücrelerine endositoz yoluyla giren toksin sinaptozomal ilişkili protein 2 (SNAP-25) ve sinaptobrevin-2 gibi sinaptik proteinleri keserek nöromusküler kavşaktaki nörotransmitter salınımını engeller ve kasların kasılıp paralyze olması ile sonuçlanan botulizm adlı ölümcül hastalığa neden olur. Aynı zamanda Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından A sınıfı biyolojik ajan listesinde bulunan BoNT'un biyoterörizm amaçlı kullanım potansiyelinin de yüksek olması toksinin hızlı tespitinin yapılmasının önemini artırmaktadır.

Toksinin saptanmasında altın standart fare biyoanalizi olarak kabul edilmekle birlikte birçok deney hayvanının kullanılmasına sebep olması, yoğun emek gerektirmesi ve zaman alıcı (4 güne kadar) olması sebebiyle yeterince pratik bulunmamaktadır. En önemlisi, fare biyoanalizi yapılırken botulizm şüphesi ile tedavi altında olan hastaların toksinin çok hızlı etki etmesi sebebiyle kaybedilme olasılıkları yüksektir, dolayısıyla BoNT tespiti için hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip tanı sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Söz konusu tez kapsamında, BoNT A'nın hızlı tespiti için yüksek duyarlılıklı antikorların geliştirilerek ELİSA tabanlı bir sistemde kullanımı amaçlanmıştır.

Yöntem: BoNT A'nın hafif zincirine (LC) ve ağır zincirde bulunan reseptör bağlanma bölgesi (H<sub>C</sub>) ile translokasyon bölgelerine (H<sub>N</sub>) özgü sentetik epitopik bölgeler, IEDB'den B hücresi "Epitop Tahmin Araçları" kullanılarak antijen olarak seçildi ve bir yazılımla (Discovery Studio 4.0) BoNT A yüzeyinde olduğu gösterildi. Seçilen peptitler, fare bağışıklamalarında kullanıldı ve geliştirilen anti-peptit antikorları ile doğal yapılı BoNT A arasındaki ilişki incelendi.

Bulgular: Farelerde üç farklı peptide (P1, P2 ve P3) karşı geliştirilen anti-peptit antikorları ile mililitrede pikogram seviyelerinde doğal yapılı BoNT A'nın saptanması gerçekleştirildi.

Sonuç: Bu çalışma, sentetik peptitlerin, toksinlere karşı yüksek afiniteli antikorları geliştirmek için en az doğal toksin veya toksoidin kendisi kadar etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca botulizmin hızlı teşhisine duyulan ihtiyaç ve halihazırda kullanılan test sistemlerinde çok sayıda deney hayvanının kurban edildiği göz önüne alındığında, bu sonuçlar benzer çalışmalarda hem hayvan sayısını hem de toksin kullanım miktarını

azaltmak için sentetik peptit immünojenlerinin kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu alışma TÜBİTAK tarafından 117H001 no'lu "1009 Tavşan Serumı Projesi" kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antikor Üretimi; Botulinum nörotoksin A; botulizm; sentetik peptitler; toksin tespiti



## ABSTRACT

### Development of Immunoassay for Neurotoxin Analysis

**Objective:** Botulinum neurotoxin (BoNT), produced by *Clostridium botulinum*, an anaerobic spore-forming bacterium, is the most potent toxin known in nature. The toxin, with a molecular weight of 150 kDa, becomes two-chain with a two-step modification that occurs in the tertiary structure of the protein. In this state, the toxin, which enters the nerve cells through endocytosis, cuts synaptic proteins such as synaptosomal-associated protein 2 (SNAP-25) and synaptobrevin-2, inhibits neurotransmitter release at the neuromuscular junction and causes the fatal disease called botulism, which results in muscle contraction and paralysis. At the same time, the high potential for bioterrorism use of BoNT, which is on the Class A biological agent list by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), increases the importance of rapid detection of the toxin.

Although it is accepted as the gold standard, mouse bioanalysis for toxin detection, it is not practical enough because it causes the use of many experimental animals, requires intensive labor and is time consuming (up to 4 days). Most importantly, while performing mouse bioanalysis, patients under treatment for suspected botulism are likely to die due to the rapid action of the toxin, so rapid and high-sensitivity diagnostic systems for BoNT detection need to be developed. Within the scope of the thesis, it is aimed to develop high-sensitivity antibodies for rapid detection of BoNT A and use them in an ELISA-based system.

**Methods:** Synthetic epitopic regions specific to the light chain (LC) of BoNT A and the receptor binding site ( $H_C$ ) and translocation sites ( $H_N$ ) found in the heavy chain were selected as antigens using B cell "Epitope Prediction Tools" from IEDB and analyzed with a software (Discovery Studio 4.0) was shown to be on the BoNT A surface. Selected peptides were used in mouse immunizations and the relationship between the developed anti-peptide antibodies and native BoNT A was examined.

**Results:** With anti-peptide antibodies developed against three different peptides (P1, P2 and P3) in mice, natural BoNT A was detected at picogram levels per milliliter.

**Conclusion:** This study shows that synthetic peptides are at least as effective as the natural toxin or the toxoid itself in promoting high-affinity antibodies against toxins. In addition, given the need for rapid diagnosis of botulism and the large number of experimental animals sacrificed in currently used test systems, these results demonstrate the necessity of using synthetic peptide immunogens to reduce both the number of animals and the amount of toxin use in similar studies.

This study was supported by TUBITAK within the scope of "1009 Rabbit Serum Project" numbered 117H001.

Keywords: Antibody Production; Botulinum neurotoxin A; botulism; synthetic peptides; toxin detection



## TEŞEKKÜR

Bana bu değerli çalışmada bulunma fırsatını sunan, doktora sürecim boyunca desteklerini, teşviklerini ve rehberliklerini esirgemeyen danışman hocalarım Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK'e ve Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezin yapılabilmesi için gerekli imkanları sunan ve bu süreçte adeta ikinci yuvam olan TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ve tezin tamamlanabilmesi için desteğini esirgemeyen enstitü müdürümüz Proje Yürütücüsü Prof. Dr. Şaban TEKİN'e şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma ve hayatım boyunca beni destekleyen, cesaretlendiren ve her koşulda neşe ve huzur kaynağı dostuklarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Aslı Kadifeci, Dr. Ebru Kızılay Altinel, Dr. Emine Kayhan ve Dr. Sema Bozbey'e şükran ve minnetlerimi sunarım.

Hiç bir zaman kendisine yetişemeyecek olsam da kendime örnek olarak almaktan geri durmadığım, en dar vakitlerinde bile bana zaman ayıran Prof. Dr. Hatice Karahan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında ve döneminde destekleri ve güvenleri ile gücüme güç katan, cesaret ve inanç kaynağım olan, bu tezi armağan ettiğim, sevgili annem ve babam Şaziye ve Şemsettin Topçu'ya sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Varlığı ile hayatımı anlamlandıran, sevgisi ile beni kuşatıp kapsayan sevinç, huzur ve esenlik kaynağım sevgili eşim Hakkı Işık'a sonsuz sevgi, destek ve sabrından ötürü minnettirim. Tez yazımının sonlarına doğru yürümeye başlayan ve sık sık annesinin çalışma odasının kapısında belirerek kendisiyle oynamamasına isyan eden biricik kızım Ayşe Sevde IŞIK'a (13ay) bize yaşattığı sevinçler ve güzellikler için sonsuz sevgi ve minnetimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK 1009 Tavşan Serum Projesi 117H001 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.



## ORİJİNALLIK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Nörotoksin Analizi İçin İmmünassay Geliştirilmesi” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır.

Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

20/12/2021

Meryem IŞIK

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	VI
TEŞEKKÜR .....	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
ŞEKİLLER .....	xiv
TABLolar .....	xv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Botulinum Nörotoksinleri .....	3
1.1.1. Toksinin Yapısı ve Özellikleri .....	5
1.1.2. Etki Mekanizması .....	6
1.1.3. Hastalık Etkeni Olarak BoNT .....	7
1.1.4. Botulizm Tanısı .....	8
1.2. Botulinum Tespitine Yönelik Test Metotları .....	9
1.2.1. BoNT Tespiti İçin Antikora Dayalı Test Metotları .....	10
1.3. Sentetik Peptitler .....	12
1.3.1. Sentetik Peptitlerin Kullanım Alanları .....	13
1.3.2. İmmunojen Olarak Sentetik Peptitler .....	14
<b>2. AMAÇ .....</b>	<b>19</b>
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>20</b>
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Cihazlar .....	20
3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	20
3.1.2. Hücre Hatları ve Deney Hayvanları .....	22
3.1.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler .....	22
3.1.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar .....	24
3.2. Yöntemler .....	24
3.2.1. Toksin Yapısının İncelenmesi .....	24
3.2.2. Peptit Tasarımı .....	25
3.2.3. Antikor Üretiminde Kullanılan Yöntemler .....	25
3.3. İstatistiksel Analizler .....	29
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
4.1. Diagnostik Amaçlı Anti-BoNT A Antikor Üretimi .....	31
4.1.1. Peptit Antijen Tasarımı .....	31
4.1.2. Peptitlere Spesifik Antikor Üretim Çalışmaları .....	34

4.1.3. BoNT A Hafif Zincire Spesifik Antikor Üretim Çalışmaları .....	37
4.2. Toksin Yapısının İncelenmesi .....	38
4.2.1. BoNT A Standardı İle Yapılan Çalışmalar .....	38
4.2.2. Ticari Antikorların Toksin Standardı ile Etkileşimi.....	39
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
5.1. Sınırlılıklar .....	48
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>50</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>59</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
kDa	: Kilo Dalton
AP	: Alkalen Fosfataz
APS	: Amonyum Per Sülfat
Balb/c	: Bagg's Albino
BCIP/NBT	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium
BSA	: Bovine Serum Albumin (sığır serumu albumini)
Da	: Dalton
dH <sub>2</sub> O	: Damıtılmış su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Modifiye Kartal Besi Yeri)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EIA	: Enzim İmmün Test
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal Sığır Serumu
g	: Gram
GMBE	: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
H <sub>2</sub> O	: Su
HCl	: Hidroklorik asit
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HSGM	: Halk Sağlığı Genel Merkezi
Ig	: İmmüoglobulin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Dipotasyum fosfat
KLH	: Keyhole Limpet Hemocyanin
KOH	: Potasyum Hidroksit
L	: Litre
LFT	: Lateral Flow Test (Yatay Akış Testi)
M	: Molar
mAb	: Monoklonal Antikor
MAM	: Marmara Araştırma Merkezi
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi

ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mw	: Moleküler Ağırlık
NaBH <sub>4</sub>	: Sodyum Bor Hidrür
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO <sub>3</sub>	: Sodyum Bikarbonat
NaO <sub>4</sub>	: Sodyum Peridot
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
OVA	: Ovalbumin
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PEG	: Polietilen Glikol
pg	: Piko Gram
PVDF	: Polivinilidin Florit
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu
TEMED	: Tetrametil Etilen Diamin
Z <sub>n</sub> Cl <sub>2</sub>	: Çinko Klorür
µg	: Mikrogram
µl	: Mikro Litre

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. (a) BoNT-A'nın (PDB 3BTA) (b) BoNT-E (PDB 3FFZ)'nin Yandan ve (c) Uçtan Görünümü.....	5
Şekil 4.1. Botulinum Nörotoksin A'nın iki zincirli yapısı (Turton, Chaddock, ve Acharya, 2002) .....	31
Şekil 4.2. İmmün Epitop Veritabanından “B cell Epitope Prediction Tools” Seçilimi .....	32
Şekil 4.3. Botulinum Nörotoksin A Epitop Seçiminin Üç Boyutlu Modeli (Mavi; L 45-75, Yeşil; HN 470-495, Kırmızı; HC 1230-1242 .....	33
Şekil 4.5. P1-BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi .....	35
Şekil 4.6. P2-BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi .....	35
Şekil 4.7. P3- BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi .....	36
Şekil 4.8. BoNT A Rekombinant Hafif Zincir ile İmmünize Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi.....	38
Şekil 4.9. SDS-PAGE'i takiben Western blotlama yoluyla antikor bağlanması: .....	39
Şekil 4.10. Toksin Standardının Ticari Antikorlar ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi .....	40
Şekil 4.11. P2-BSA İle Bağışıklanan 1 ve 2 No'lu Fare Serumları ile Ticari Anti-BoNT A pAb'ın Toksin Standardı ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi.....	41
Şekil 4.12. P1-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10 <sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır) .....	42
Şekil 4.13. P2-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10 <sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır) .....	43
Şekil 4.14. P3-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10 <sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır) .....	43

## TABLÖLAR

<b>Tablo 3.1.</b> Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	20
<b>Tablo 4.1.</b> Diagnostik Kullanım İçin Peptit Seçimi .....	32
<b>Tablo 4.2.</b> İmmünizasyonlar İçin Seçilen Peptitler .....	33
<b>Tablo 4.3</b> Seçilen Peptitlerin Amino Asit Dizisi.....	34
<b>Tablo 4.4.</b> Peptitlerle Bağışıklanan Farelerle Gerçekleştirilen Füzyonların İncelenmesi ...	37
<b>Tablo 4.5.</b> HSGM'den Temin Edilen Toksin Standartları.....	38
<b>Tablo 4.6.</b> BoNT A Low Std'nin Fare Serumları ve anti-BoNT A pAb ile Yapılan ELISA Analizi .....	40



## 1. GİRİŞ

Bakteri ve bitkiler tarafından üretilen protein toksinleri bilinen en etkili zehirler arasındadır ve potansiyel biyoterörizm ajanı olarak kabul edilirler (Pal ve ark., 2017). Protein toksinleri genellikle hücre içi hedeflerine ulaşmak için hücre zarında bulunan reseptörlere, glikoproteinlere veya gangliosidlere bağlanarak hücreye nüfuz eder (Lubran, 1988). Ökaryotik hücreler için son derece toksik olan bu proteinler genellikle tam biyolojik aktiviteye ulaşmak için iki veya daha fazla alt üniteye ihtiyaç duyar, bir alt ünite reseptöre bağlanır ve ikincisi enzimatik aktiviteye sahiptir (Sandvig, Torgersen, Engedal, Skotland, ve Iversen, 2010). Örnek olarak *Clostridium botulinum* tarafından üretilen ve en etkili nörotoksinler arasında gösterilen Botulinum nörotoksinleri verilebilir. Nörotoksinler Sinir dokusuna zarar veren toksinler olarak bilinirler. Söz konusu toksinler hem gelişen hem de olgun sinir dokusunun işlevini olumsuz yönde etkileme kabiliyetine sahip biyolojik ya da kimyasal moleküllerdir. Yaygın nörotoksin örnekleri arasında botulinum toksini, tetanoz toksini, kurşun, etanol, glutamat, nitrik oksit, ve tetrodotoksin bulunmaktadır. Nitrik oksit ve glutamat gibi bazı maddeler aslında vücudun düzgün çalışması için gerekli olmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda vücuda alımları nörotoksik etki yaratmaktadır. Nörotoksinler, hücre zarı boyunca iyon konsantrasyonlarının bozulması ya da nöronlar arasında iletişim noktası görevi gören sinapsların işlevlerini yitirmesi gibi sinir hücrelerinin işlevlerini bir kaç farklı şekilde bozabilirler. Nörotoksinlere maruziyet sonucunda hücresel bazda nöron eksitotoksitesi veya apoptozu gerçekleşirken, makroskopik düzeyde de zihinsel engel, kalıcı hafıza bozuklukları, epilepsi ve demans gibi yaygın merkezi sinir sistemi hasarları oluşur (Neurotoxin, 2021).

Protein toksinlerin, nispeten basit teknolojiler ve düşük maliyetle elde edilebilme potansiyeline sahip olması yarattıkları biyoterörizm tehdidini ciddi bir endişe kaynağı yapmaktadır (Jansen, Breeveld, Stijns, ve Gobusch, 2014). Biyolojik saldırıların tahmin edilmesi zordur ve özel önleyici tedbirler gerektirir. Biyoterörizm saldırılarına etkili yanıt verilebilmesi için biyolojik ajanları hızla tespit edebilen, etkili tedavi ve arındırma sağlayan hızlı yöntemler gerekmektedir. Bu ajanlar çok düşük miktarlarda etkili olduklarından, kullanılan tanı yöntemlerinin toksinleri diğer biyolojik ve biyolojik olmayan materyallerden (etkileşim ve bulaş) ayırmak için hem yüksek derecede hassasiyet hem de yüksek derecede seçicilik göstermesi beklenir. Toksinlerin tanıma metodlarının karşılaştığı bir diğer güçlük ise analiz edilecek örneklerin karmaşıklığı ve çeşitliliğidir. Bazı durumlarda, tespit edilmesi gereken ajan su, gıda ve hava gibi bulaş olmuş matrisler tarafından taşınır veya posta sistemi aracılığıyla dağıtılabilir (Duriez, Armengaud, Fenaille, ve Ezan, 2016). Dolayısıyla iyi bir toksin tespit sisteminin olumsuz matris etkilerinden korunmuş, yanlış negatif ve pozitif sonuçlardan uzak, mümkün olan en yüksek seçicilik,



sağlamlık ve özgüllüğe sahip, aynı zamanda en uygun reaktiflere (saflaştırılmış protein standartları uygun antikorlar vb.) sahip olması beklenir (Duracova, Klimentova, Fucikova, ve Dresler, 2018). Ajanların hızlı tespiti hem bireysel hem de kitlesel maruziyet durumlarında hayati öneme sahip olduğundan etkili tanı sistemlerinin geliştirilmesi önemlidir.

Protein toksinlerin tespitinde; PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi nükleik asit bazlı analitik metotlar ya da antikora dayalı ELISA (enzim ilişkili immunosorbent deneyi) ve Western Blot gibi immünolojik teknikler de dahil olmak üzere birçok metot kullanılmaktadır (Dorner ve ark., 2016). Bu yöntemler, hızlı ön tarama için değerlidir ancak analitik sınırlamaları olabilir. PCR tahlilleri hızlı, duyarlı ve özgündür ancak bilinmeyen numunelerin sınıflandırılması için veya toksini üreten canlıdan izole bir şekilde toksinin tespit edileceği durumlarda kullanılamaz (Demirev ve Fenselau, 2008). Antikora dayalı tanı sistemleri ise toksinin protein yapısına benzeşen moleküllerle çapraz reaksiyonlar vererek yanlış pozitif riski oluşturabilme potansiyellerine rağmen yüksek özgüllükleri, basitlik, hız ve maliyet etkinliği gibi doğal avantajlarından dolayı hızlı tanıya olanak sunmaları sebebiyle tercih sebebidirler (Zhu, Dietrich, Didier, Doyscher, ve Märtlbauer, 2014).

Antikorlar, tam bakteri hücrelerinden basit organik moleküllere kadar çok çeşitli hedef analitler için üretilebilir. Antikorların doğal seçiciliği ve duyarlılığı ile birleşen bu çok yönlülük, immünolojik test yöntemlerini çok çeşitli analitik zorlukları çözmek için uygulanabilir hale getirir. Antikor tabanlı yöntemler, çeşitli kimyasal yapılara uygulanmıştır ve hasta başı analizi için sahada kullanıma ya da kontamine bir atık sahasında doğrudan iyileştirme faaliyetlerine uygundur. İmmün analizler; hızlı, duyarlı, seçicidir ve genellikle uygun maliyetlidir. Antikorlar, ilgilenilen hedefin yapısal analoglarına bağlanarak çapraz reaktivite sergileyebilir. Bununla birlikte, moleküler modelleme programları, genellikle çapraz reaktivite sorunlarını azaltmak için etkileşimlerin anlaşılmasına yardımcı olabilir. Antikor mevcudiyeti ve dayanıklılığı da sorun yaratabilir ancak reaktif geliştirme için biyoteknolojideki ilerlemeler yoluyla aşılabılır (Van Emon, 2006).

Antikor tabanlı tanı sistemlerinden yüksek hassasiyet ve özgünlükte sonuçlar alınması büyük ölçüde bu sistemlerde kullanılan antikorların özgüllük ve hassasiyetine bağlıdır. Protein yapıdaki toksinlere antikor geliştirilmesi mümkün ise de kolay değildir. Toksinlere karşı antikor geliştirilmesi için toksinin kültürde üretilmesi ve toksoide çevrilmesi gerekmektedir. Her ne kadar bağışıklama çalışmaları toksoide yapılsa da geliştirilen antikorun toksinin doğal yapılı hali ile etkileşiminin incelenmesi için toksinle laboratuvarında çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu da laboratuvar çalışanları tarafından toksine maruziyet riskinin doğmasına sebep olur ve nitelikli laboratuvar alt yapısının kurulmasını gerektirir. Şimdiye kadar BoNT serotiplerini çoklu ya da tek başına spesifik

olarak tespiti için fare hibridoma teknolojisi ya da maya olgunlaştırma yöntemi kullanılarak çok sayıda yüksek afiniteli monoklonal antikolar (mAb'ler) geliştirilmiştir (Gate, Ozanich, Warner, Bruckner-Lea, ve Marks, 2010). Yine de 1962 yılında gelişen bir laboratuvar kazası sonucu inhalasyon botulizminin tanımlanmış olması (Kılıç, 2006a) laboratuvarda toksinlerle çalışan personel için endişe kaynağı oluşturmaktadır. Öte yandan 1982 yılında Young ve Atassi tarafından ilk kez immünojen olarak kullanılan sentetik peptitler, toksinlerle yapılacak bağışıklama çalışmalarında toksinin yerini almaya iyi birer adaydırlar. Sentetik peptitlerle bağışıklama sonucu geliştirilen antikoların, immünoanaliz deneylerinin en büyük dezavantajı olan çapraz reaktivite sorununu da büyük ölçüde hafiflettiği bildirilmiştir (Banada & Bhunia, 2008)

Söz konusu bilgiler ışığında, tez kapsamında toksinlere yönelik antikor geliştirme çalışmalarında sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılması modellendi. Hedef molekül olarak BoNT A seçilerek, proteinin her üç etki alanına spesifik olarak biyoinformatik araçlarla modellenen sentetik peptitlerle immün sistem indüklenerek tanı sistemlerinde kullanılacak hassasiyette bir immün yanıt oluşturuldu.

### **1.1. Botulinum Nörotoksinleri**

Botulinum nörotoksinleri (BoNT) anaerobik sporlu bir bakteri olan *C. botulinum* tarafından 150 kDa molekül ağırlığında bir protein olarak üretilir ve bilinen en potent toksindir. Clostridium suşları serolojik olarak birbirinden farklı yedi nörotoksin (A, B, C1, D, E, F ve G) üretir ve toksin bakteri tarafından üretildiğinde 300 ile 900 kDa arasında bir dizi makromoleküler kompleks oluşturmak için ek toksik olmayan proteinlerle birleşir (Dolly & Aoki, 2006). Amino asit dizisi seviyesinde birbirlerine %70'lik benzerlik gösteren serotiplerden A, B, E ve F insanlarda ve hayvanlarda ciddi nöroparalitik bozukluğa sebep olan ve hatta ölümcül olan gıda kaynaklı botulizmden sorumlu iken, aerosol formunda kullanıldığında C, D ve G'nin de inhalasyon yolu ile primatlarda hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir (Middlebrook & Franz, 1997). *C. baratii* ve *C. butyricum* suşları da botulinum toksini üretebilmektedir (Brin, 1997; Patocka ve Splino, 2002; Sidell, 1997). BoNT'lerinin büyük bir kısmını üreten *C. Botulinum* suşları ise DNA homolojilerine ve fenotopik özelliklerine göre dört gruba ayrılmaktadır. İlk grup kültürde proteolitik özellik gösterir ve A, B veya F toksinlerini üretir. İkinci grup proteolitik değildir ve B, E veya F toksinlerinin üretiminden sorumludur. Üçüncü grup C veya D toksinlerini üretirken, son olarak tip G toksinini üreten suş dördüncü grupta yer almaktadır (Kılıç, 2006b).

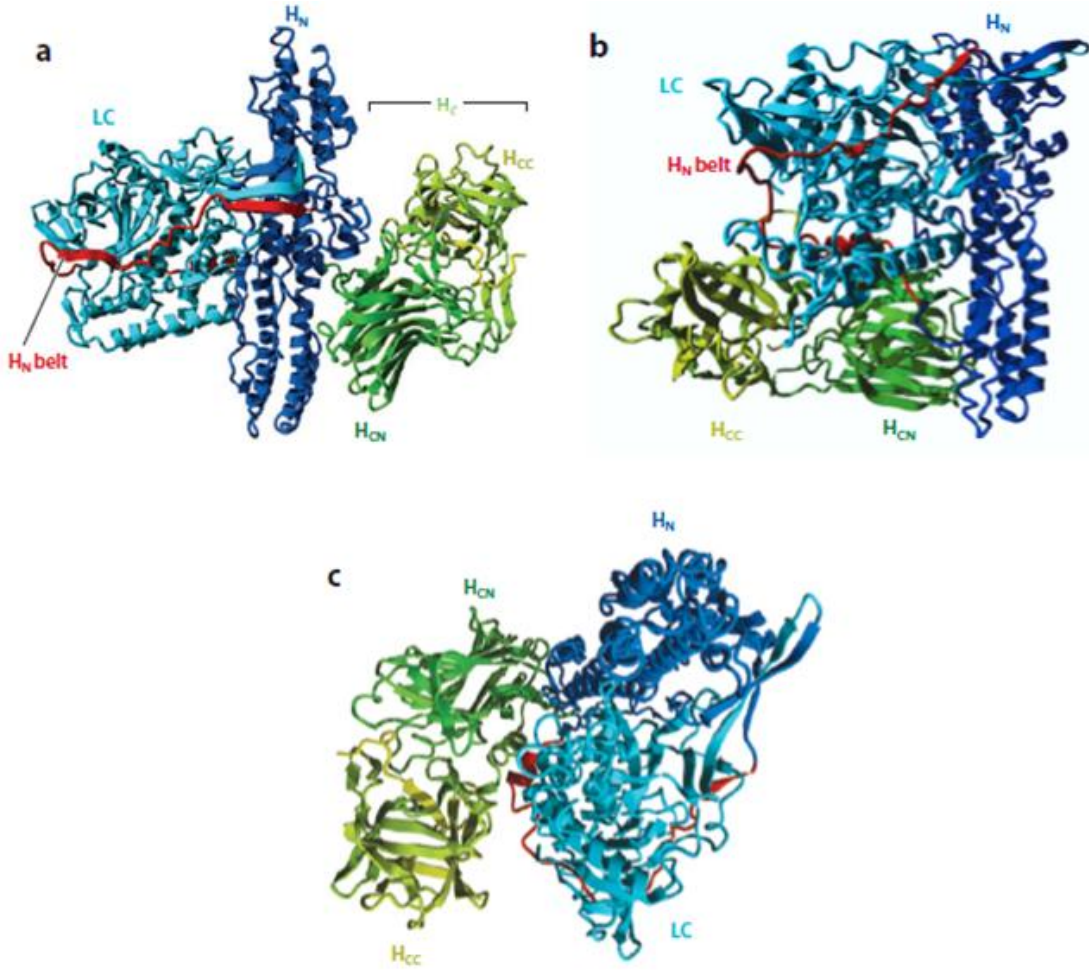
Ortalama ölümcül dozu (LD<sub>50</sub>) yaklaşık 1 ng/kg vücut ağırlığı olarak bulunan ve insanlar tarafından en tesirli toksin olarak bilinen (Schantz & Johnson, 1992) BoNT'leri

yüksek toksisitesi ve kolay üretimi nedeniyle potansiyel bir biyolojik silah ve biyoterörizm tehdit ajanı olarak görülmüş (Arnon ve ark., 2001) ve ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) (<http://emergency.cdc.gov/bioterrorism>) tarafından en yüksek riskli (kategori A) tehdit ajanlarına dahil edilmiştir. Ağırlık etkinlik açısından ele alındığında bilinen en potent toksin olan ve bu bağlamda biyolojik silah olarak yüksek potansiyeli bulunan BoNT'lerin aynı zamanda tıpta terapötik, klinik ve kozmetik amaçlı kullanımları da yaygındır (Dressler, 2008; Hakami, Ruthel, Stahl, ve Bavari, 2010; Kostrzewa ve Segura-Aguilar, 2007; Pickett ve Perrow, 2011). BoNT'lerinin şimdiye kadar; migren tedavisinde, terleme bozukluklarında, lokalize kas spazm ve ağrılarında, fokal distoni ve düz kasların hiperaktivitesi gibi hastalık durumlarına kullanımı bildirilmiştir (Kedlaya; Patocka ve Splino, 2002).

Literatürde bildirilen en ölümcül toksin olan BoNT'un toksisitesi fare üniti olarak belirlenir ve bu farelerde peritonal yolla alınan toksinin LD<sub>50</sub>'si olan 20 U/ng'a tekabül eder (Brin, 1997). İnsanlardaki ölümcül dozu bilinmemekle beraber, primatlarda yapılan çalışmalara göre enjeksiyon yolu ile 0,09-0,15 µg, inhalasyon yolu ile 0,70-0,90 µg ve oral yoldan ise 70 µg olarak hesaplanmıştır (Arnon ve ark., 2001). BoNT, inhalasyon yoluyla alındığında diğer nörotoksik olduğu bilinen toksinlere karşı daha güçlü görünse de (organofosfat VX'ten 15.000, sarin gazından 100.000 kat daha etkili), çevresel faktörlerden çok fazla etkilenmesi sebebiyle kararsız bir yapı sergiler. Toksin, güneş ışığına maruz kaldığında 1-3 saat içinde inaktif olurken, havada 12 saat içerisinde nörotoksik özelliğini yitirir (Arnon ve ark., 2001; Brin, 1997). Tatlı suda 3 ile 6 günde bozulan BoNT, içme suyu sisteminde bulunan klorlanmış suda ise ortalama 20 dakika içinde %80 civarında etkisini yitirir (Arnon ve ark., 2001; Sidell, 1997; Detrick, 2004). Bunun yanısıra toksinin protein yapısının 80°C'de yaklaşık 30 dakikada ve 100°C'de ise bir kaç dakika içinde bozulması sebebiyle oral yolla uygulanması da çok etkili değildir (Bigalke ve Rummel, 2005; Patocka ve Splino, 2002). BoNT aerosol formda kullanımı ise kristalize edildikten sonra mümkün olabilmektedir. Uygun şekilde kristalize edilen BoNT'un ortama salınması durumunda solunum yoluyla çok fazla sayıda insanın zehirlenmesine sebep olacağı düşünülse de toksinin kimyasal sentezinin ve aerosol forma getirilmesi zordur (Arnon ve ark., 2001; Bigalke ve Rummel, 2005; Brin, 1997; Patocka ve Splino, 2002). Daha önceden Irak ve eski Sovyetler Birliği tarafından silah olarak kullanılmak üzere BoNT'un üretildiği (Bozheyeva, 1999; Council, 1995) ve Japon kültürü Aum Shinrikyo'nun ise biyoterörizm için BoNT kullanmaya çalıştığı bildirilmiştir (Arnon ve ark., 2001).

### 1.1.1. Toksinin Yapısı ve Özellikleri

BoNT'leri, *C. botulinum* tarafından 150 kDa olarak tek bir polipeptit zinciri halinde sentezlendiklerinde nörotoksik etkileri azdır. 150 kDa olarak üretilen inaktif öncül protein proteolitik bölünmeye maruz kalır ve tek bir disülfür köprüsü ile bağlanmış 100 kDa'luk ağır zincir (HC) ile 50 kDa'luk hafif zincir (LC) bulunduran aktif bir holotoksini oluşturur. "A zinciri" olarak adlandırılan ve  $Zn^{+2}$  iyonu içeren hafif zincir adeta bir modüler nanomakine haline gelip endopeptitaz aktivitesi gösterirken, "B zinciri" olarak adlandırılan ağır zincir endositoz yoluyla toksinin nöronlara girişini kolaylaştırır (Montal, 2010).



**Şekil 1.1.** (a) BoNT-A'nın (PDB 3BTA) (b) BoNT-E (PDB 3FFZ)'nin Yandan ve (c) Uçtan Görünümü: Mavi renk hafif zincir (LC; 1-439 aa arası), koyu mavi  $H_N$  (449-870 aa arası) ve yeşilden sarıya olan şeritler  $H_C$  olarak temsil edilir.  $H_C$ 'nin iki alt alanı  $H_{CN}$  yeşil ve  $H_{CC}$  açık yeşil (871-1296 kalıntıları) olarak ve  $H_N$  kuşağı ise kırmızıyla gösterilmiştir (Montal, 2010).

Olgun toksinin iki zincir ihtiva etmesinin yanısıra yapısal olarak incelendiğinde üç ana modülden oluştuğu görülür; N terminalinde metalloproteaz aktivite gösteren ~50-kDa'luk LC, N terminalinde ~50-kDa'luk translokasyon ünitesi olan  $H_N$  ve C terminalinde

~50-kDa'lık reseptör bağlanma ünitesi olan  $H_C$  (Kumaran ve ark., 2009; Lacy ve Stevens, 1999; Lacy, Tepp, Cohen, DasGupta, ve Stevens, 1998; Swaminathan ve Eswaremoorthy, 2000) (Şekil 1.1).  $H_C$  bölümü de kendi içerisinde  $\beta$ -tabaka katlanmalarından oluşan  $H_{CN}$  ve karboksi alt ünitesini oluşturan  $H_{CC}$  olmak üzere iki bölüme ayrılır. Her ne kadar BoNT-A ve BoNT-B'nin işlevsel olarak korunmuş modüllerinin yapısı BoNT-E ile benzer olsa da proteinin küresel katlanmasında söz konusu modüllerin yerleşimleri BoNT-E'de A ve B'den farklıdır (Şekil 1.1 b, c) (Fischer ve ark., 2008; Kumaran ve ark., 2009). BoNT-E'de LC,  $H_C$  ve  $H_N$  birbirlerine BoNT-A ve B'de olduklarından daha yakın görünmekle beraber BoNT-E'nin bu benzersiz katlanma yapısının işlevsel önemine dair henüz bir bilgi bulunmamaktadır (Montal, 2010).

### 1.1.2. Etki Mekanizması

BoNT oral yoldan alınır ya da bağırsakta kolonize olan *C. Botulinum* tarafından üretilir. Sindirim sisteminde transitöz geçiren BoNT, duodenum ve jejunumda emilir ve kana karışır (Maksymowych ve Simpson, 2004). Kan dolaşımına katılan BoNT'un hedefi motornöron uçlarıdır (Wellhöner, 1989). Ağır zinciri aracılığıyla sinir uçlarındaki spesifik reseptörlere bağlanan toksin hücre zarında endositoz ya da translokasyona uğrayarak sinir hücrelerine girer ve burada sinaptik veziküllerin ekzositozunda görevli SNARE (soluble NSF attachment protein receptor; çözünür NSF bağlanma proteini) kompleksinin işleyişini bozarak nörotransmitter salınımını engeller ve nöromüsküler bloke edici etkiye neden olur. Farklı BoNT serotipleri SNARE kompleksinin farklı elemanlarını hedef alır; BoNT-A ve BoNT-E SNAP-25'i keserken; BoNT-C1 sintaksini; BoNT-B, BoNT-D, BoNT-F ve BoNT-G de sinaptobrevini hedef alır (Dolly, 2003). Ayrıca farklı BoNT serotipleri, SNARE kompleks oluşumunu nasıl bozduklarına bağlı olarak toksik özelliklerinde de farklılıklar gösterir. Örneğin BoNT-A SNAP-25'i C terminalinden 9 aa keserek bloke eder ve nöromüsküler kavşakta uzun etkili bir asetilkolin salınım blokajına sebep olur. Bu da BoNT-A'yı diğer serotiplere göre klinik kullanıma daha uygun hale getirmektedir (Dolly & Aoki, 2006).

BoNT ağır zinciri vasıtasıyla terminal sinir uçlarında bulunan spesifik reseptörlere bağlanır. BoNT serotiplerinden A, C, E ve F vezikül proteini SV2'yi tanıırken; serotiplerden B ve G ise sinaptotagmin I ve II'ye; C ve D ise sırasıyla gangliosidlere (GD1b, GT1b) ve fosfatidiletanolamine bağlanırlar (Tsukamoto ve ark., 2008). BoNT serotipleri tarafından tanınan reseptörler nörosesifik değildir ve bağırsakta bulunan epitel hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından eksprese edilirler (Couesnon, Pereira, ve Popoff, 2008). BoNT'lerin presinaptik membranlara yönelik yüksek afinitesinin reseptörün gangliosid ve protein kısımları ile çoklu ve sinerjistik etkileşimden

kaynaklandığı düşünölmektedir. BoNT düşük konsantrasyonlarda öncelikli olarak sinir hücrelerini hedef alırken, toksin yüksek konsantrasyona maruziyet durumunda sinir hücreleri dışında kalan hücreleri de hedefleyebilir (Popoff ve Poulain, 2010).

### **1.1.3. Hastalık Etkeni Olarak BoNT**

Botulinum toksinin oral yolla alınması ya da Clostridium suşlarının bağırsakta kolonize olması durumunda botulizm adı verilen nöroparalitik hastalığa sebep olur. Botulizm, toksine maruz kalınması durumunda ölümcül olmakla birlikte sağ kalım durumlarında da yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalınmasını ve mekanik ventilasyonu gerekli kılar. Botulizm; kontamine gıda ve su kaynaklarının yutulmasından sonra besin zehirlenmesi olarak, bebeklerde bakterinin intestinal kolonizasyonu sonucu infant botulizmi olarak, anaerobik yara enfeksiyonlarında yara botulizmi olarak ve aerosol formuna getirilmiş toksine maruz kalındığında inhalasyon botulizmi olarak ortaya çıkmaktadır (Marks, 2004). BoNT serotiplerinden sadece A, B, E ve F'nin insanlarda botulizme sebep olduğu bilinirken, serotip C'nin neden olduğu bir bebek botulizmi vakası bildirilmiş (Demarchi, Mourgues, Orio, ve Prevot, 1958) ve aerosol haline getirilmiş serotip C, D ve G'nin primatlarda inhalasyon yoluyla botulizm ürettiği gösterilmiştir (Middlebrook & Franz, 1997).

Toksin maruziyetine müteakip hastalığın ilerlemesi ve derecesi maruz kalınan toksinin miktarına ve alınış yoluna bağlıdır (Arnon ve ark., 2001; Sidell, 1997). Hastalık belirtileri toksin oral yoldan alındığında 18-36 saat arasında inhalasyon yolu ile maruz kalındığında ise 12-36 saat içerisinde ortaya çıkar. Ayrıca maruz kalınan toksin miktarının azlığı nispetinde belirtilerin ortaya çıkmasının bir kaç güne yayılabileceği de bildirilmiştir (Arnon ve ark., 2001; Middlebrook, 1997; Patocka ve Splino, 2002; Sidell, 1997).

Besin zehirlenmesi sonucu oluşan botulizm, klinik olarak en çok görölen botulizm türüdür. Toksinle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesine müteakip hastada 18 saat içerisinde halsizlik, baş dönmesi ile başlayan belirtiler erken dönemde görme bozukluğu, dil ve ağız kaslarında zayıflama ile ortaya çıkıp simetrik olarak yukarıdan aşağıya doğru ilerleyen ciddi boyuttaki kas paralizine kadar gider (Bigalke ve Rummel, 2005; Brin, 1997; Franz ve ark., 2001; White, 2002) Toksinin tüm kasları etkilemesi ve paralizine sebep olması sebebiyle bir süre sonra diyafram ve yardımcı solunum kasları zayıflayan hastada solunum yetmezliği gelişir ve mekanik ventilasyon gerekebilir (Arnon ve ark., 2001; Patocka ve Splino, 2002; Sidell, 1997). Botulizmde ortaya çıkan belirtilerin geriye dönüşü mümkündür ancak bu süre ayları bulabilir. Öte yandan alınan toksinin miktarına bağlı olarak iskelet kaslarının ciddi paralizi sonucunda solunum yetmezliği sebebiyle hasta 10

gün içerisinde kaybedilebilir (Franz ve ark., 2001; Shapiro, Hatheway, ve Swerdlow, 1998; Whitby, Street, Ruff, ve Fenner, 2002).

İlk olarak 1962’de bir laboratuvar kazası sonucu tanımlanan inhalasyon botulizminde ise temastan 3 gün sonra belirtilerin ortaya çıktığı 4. günden sonra da gıda zehirlenmesi kaynaklı botulizm ile aynı şekilde seyrettiği bildirilmiştir (Franz ve ark., 2001).

#### **1.1.4. Botulizm Tanısı**

Botulizm tanısında; laboratuvar testlerinin çok yardımcı olmaması, laboratuvar bulgularının özgül olmaması, açığa çıkan erken belirtilerin diğer pralitik hastalıklarla benzeşmesi ve altın standart kabul edilen fare biyoanalizinde bir hayli uzun sürmesi (4 güne kadar) sebebiyle klinik inceleme ve hasta öyküsü çok önem taşımaktadır (Whitby ve ark., 2002; White, 2002). Her ne kadar uzun sürse de fare biyoanalizi BoNT tespitinde altın standart olarak kabul edilir. Bu analiz şüpheli gıda ya da hasta serumunun farelere verilip takip edilmesini, eş zamanlı olarak farelerin antitoksine verdikleri yanıtın gözlenmesini kapsamaktadır (Sidell, 1997; Whitby ve ark., 2002).

Biyolojik saldırı durumunda BoNT tanısı için çeşitli örnekleme ve test yöntemleri bulunmaktadır. İnhalasyon sonucu maruziyetin tespiti için insanlardan alınan nazal örnekler ELISA ile kontrol edilirken (Franz ve ark., 2001), çevreden alınan numunelerde ELISA ile toksinin tespiti, PCR ile ise bakteriyel DNA’nın tespiti yapılabilir. Hem ELISA hem de PCR laboratuvar alt yapısı ve nitelikli personel gerektirmektedir. Bu test yöntemlerinin yanı sıra yatay akış testleri ile de çok kısa sürede (5-15 dk) toksinin tespiti yapılabilir (Arnon ve ark., 2001; Brin, 1997; Detrick, 2004; Patocka ve Splino, 2002; Sidell, 1997).

Hastaya anamnez ve klinik belirtiler sonucu botulizm tanısı konulmasına müteakip tedavi için antitoksin kullanılır ve mekanik ventilasyon dahil destekleyici bakım uygulanır (Detrick, 2004; Sidell, 1997) Antitoksinin yalnızca kan dolaşımında bulunan serbest toksinleri etkilemesi ve sinir hücrelerinin reseptörlerine bağlanana fayda etmemesi sebebiyle uygulama için BoNT tanısının doğrulanması beklenmez. Antitoksin uygulamasının maruziyet sonrası ne kadar erken yapılırsa o kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Arnon ve ark., 2001; Bigalke ve Rummel, 2005; White, 2002). Antitoksin tedavisine ek olarak, maruziyet sonrası erken yapılan ventilasyon desteği de botulizm vakalarında mortalite oranının %60’tan %5’in altına düşmesini sağlamıştır. BoNT, bilinen en potent toksindir ve enfektif dozu çok düşüktür. Maruziyet durumunda çok hızlı ilerler ve bu durum hastalarda antikor yanıtının oluşumunu engeller. Bu sebeple botulizm geçiren bir kişi hastalığa karşı antikor yanıtı oluşturamaz, tekrar maruziyet durumunda hastalığa

tekrar yakalanırlar (Bigalke ve Rummel, 2005; Brin, 1997; Schmitt, Meysick, ve O'Brien, 1999).

BoNT'un insanlarda öldürücü dozlarının; intravenöz veya intramüsküler olarak 1-2 ng/kg, ağızdan 1 µg/kg ve inhalasyon yoluyla 10-12 ng/kg olduğu tahmin edilmektedir (Arnon ve ark., 2001). Yoğun kas paralizine sebep olan toksin bu yönüyle hem terapötik ilaç olarak kendine yer bulmuş hem de biyolojik savaş silahı olarak kullanılmıştır (Arnon ve ark., 2001; Sharma ve Whiting, 2005). Özellikle ikinci ihtimal düşünüldüğünde söz konusu toksinlerin yol açtığı zehirlenmenin önlenmesi ve tedavisi için ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Henüz botulizmin önlenmesi ve tedavisi için farmasotik bir ilaç mevcut olmasa da Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından geliştirilmiş bir pentavalent toksoid aşı (Sakamoto, Lockey, ve Krzanowski, 1987) ve geliştirilme aşamasında olan rekombinant bir aşı olduğu bildirilmiştir (Rheinstein ve Klontz, 1993). Toksin maruziyeti ve botulizmin görülmesinin nadir olması sebebiyle söz konusu aşılar için toplu sivil ya da askeri aşılama yapılması olasılığı düşük olmakla beraber hastalığın hızlı ilerlemesi maruziyet sonrası aşılama faydasız kılmaktadır. Aşının yanısıra geliştirilen toksin nötralize antikor ise temas öncesi ve sonrası nöroparalizin önlenmesi ya da hafifletilmesi için kullanılabilir (Schmitt ve ark., 1999). Nötralizan antikor olarak atlarda geliştirilmiş ya da botulizme maruz kalan insanların kanından elde edilmiş antikorlar bulunmakla birlikte yetişkin (Bigalke ve Rummel, 2005) ve bebeklerde (Sidell, 1997) botulizmi tedavi etmek için kullanılmaktadır. Öte yandan hastalığın tedavisi için, bulaşıcı hastalık riski olmayan ve plazmaferez için insan donörlerine ihtiyaç duymayan sınırsız bir antitoksin kaynağı sağlayabilen rekombinant mAb geliştirilmesi için araştırmalar yapılmaktadır. Bu tür Mab'ların geliştirilmesi Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü ([http://www2.niaid.nih.gov/Biodefense/Research/high\\_priority.htm](http://www2.niaid.nih.gov/Biodefense/Research/high_priority.htm)) tarafından yüksek öncelikli araştırma hedefi olarak belirlenmiştir (Citterio, Manzano, Mifreni, & Comi, 1992).

## **1.2. Botulinum Tespitine Yönelik Test Metotları**

Botulizmin teşhisi genellikle, klinik belirtiler ve tanı yoluyla yapılır ve ardından gıdalardaki, çevresel veya klinik örneklerdeki klostridiyal sporların veya toksinin laboratuvar tanımlamasıyla doğrulanır (Lindström ve Korkeala, 2006; Solomon, 2001). Botulizmden kurtulma hızı, antitoksin veya tıbbi müdahalelerin zamanında uygulanmasıyla artar (Arnon ve ark., 2001). Bu nedenle, hassas ve hızlı toksin tespiti ve teşhis yöntemleri, iyileşme süresinin iyileştirilmesi için kritik öneme sahiptir ve aynı zamanda salgınların epidemiyolojik çalışmasını kolaylaştırır (Cheng, Land, ve Stanker, 2012).



BoNT tespitinde fare biyoanalizi, altın standart olarak kabul edilir ancak tamamlanması 4 güne kadar sürer ve çok sayıda deney hayvanı ile nitelikli laboratuvar alt yapısının (Bsl-3) kullanılmasını gerektirir. Bununla birlikte intoksifikasyona sebep olan toksinin serotipinin belirlenmesi için de nörtalizasyon deneyinin yapılmasını zorunlu kılar. Fare biyoanalizinin hassasiyeti yüksek olmakla birlikte olası bir BoNT kontaminasyonunda etkinlik hızı yüksek olan toksine karşı acil tıbbi müdahale gerektirdiğinden söz konusu analiz tedavinin gecikmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple BoNT kontaminasyonunu mümkün olan en hızlı şekilde tespit edebilmek amacıyla sahada kullanılmak üzere hızlı, hassas ve seçici BoNT teşhis testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Chao, Wang, Tang, ve Liu, 2004; Shone ve ark., 1985; Wictome ve ark., 1999).

BoNT tespiti için geliştirilen tanı sisteminin hassasiyet, özgünlük, etkinlik duyarlılığı, kullanım kolaylığı ve maliyet hususlarında elverişli olması beklenmektedir. Son yıllarda toksinin hızlı tespiti amacıyla nukleik asit bazlı (PCR, DNA mikroarray), antikor bazlı (ELİSA, yatay akış testleri vb), hücre bazlı ve etkinlik bazlı olmak üzere bir çok tanı sistemi geliştirilmiştir (Cheng ve ark., 2012).

### **1.2.1. BoNT Tespiti İçin Antikora Dayalı Test Metotları**

İmmünoanalizler, heterojen kimyasal yapıdaki molekülleri spesifik olarak bağlama yeteneklerinden dolayı tespit elemanları olarak immünoglobulinler (Ig) olarak da adlandırılan antikorların (Ab) kullanımına dayanan analitik tekniklerdir. Bu yönleri sebebiyle antikora dayalı test metotları olarak da anılırlar. Pek çok hedef için, yalnızca özgüllükleri, duyarlılıkları ve çok yönlülükleri nedeniyle değil, aynı zamanda proteinler gibi karmaşık molekülleri karmaşık karışımlardan tespit edebildikleri için tercih edilen algılama sistemleridir. Bunun yanı sıra antikora dayalı test metotları, proteinlerin tespiti için kullanılan kütle spektrometrisi gibi tekniklere nazaran daha uygun maliyetli olmaları sebebiyle de tercih sebebidirler. İmmünoanalizler; kantitatif veya kalitatif tarama veya yarı kantitatif teknikler olarak kullanılırlar. Bu çok yönlülük hedef moleküllerin basit, hızlı, kullanıcı dostu bir şekilde veya daha karmaşık otomatikleştirilmiş yüksek verimli sistemlerde analiz edilmesine olanak tanır (Diaz-Amigo, 2009). Bunun yanı sıra, son 20 yılda füzyon antikor konjugatlarının üretilmesi, iyileştirilmiş reaktiflerin ve saptama ekipmanının geliştirilmesi gibi yenilikler immünolojik test sistemlerinin hassasiyet ve özgüllüğünde artışa yol açmıştır. Bu sürekli iyileştirmelerin bir sonucu olarak, antikora dayalı testler günümüzde laboratuvar tıbbında en yaygın kullanılan analitik tekniktir ve giderek daha çeşitli cihazlarla analiz edilen geniş bir analit repertuarını kapsar (Peruski ve Peruski, 2003).

Antikora dayalı sistemlerin avantajları neticesinde kontamine gıda, çevresel ve biyolojik numunelerde BoNT tespiti için şimdiye kadar birçok test metodu geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak; Stanker ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve sırasıyla tamponda ve süt matrisinde 5 pg/ml ve 25 pg/ml'e kadar düşük BoNT/A tespit edebilen sandviç ELİSA testi (Stanker, Merrill, Scotcher, ve Cheng, 2008), Brunt ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve gıda matrislerinde BoNT serotipleri A, B, E ve F'nin hızlı bir şekilde saptanmasını sağlayan afinite immünokromatografi kolon (AICC) testleri (Brunt, Webb, ve Peck, 2010) ve Sharma ve arkadaşları tarafından etkinlikleri kıyaslanarak 10 ng/ml BoNT serotip A ve B'yi, 20 ng/ml de BoNT E'yi tespit ettiklerini buldukları ticari yatay akış testleri (Sharma ve Whiting, 2005) gelmektedir. Bu sistemlerde yakalanan hassasiyet büyük ölçüde geliştirilen antikorların hassasiyetine bağlıdır. Bağışıklık sistemi tarafından yabancı maddelere cevap olarak üretilen antikorlar, immünolojik testlerin en önemli bileşenidir. Prensip olarak, çoğu moleküle karşı antikorlar üretilebilir. Antikor üretilmesi için immün sistemin bir immünojen (yabancı bir molekül) tarafından indüklenmesi gerekmektedir (Diaz-Amigo, 2010). Bu sebeple etkili bir antikora dayalı test sisteminin geliştirilmesi dolaylı olarak immünojenlerin doğru seçilmesi ile ilişkilidir.

Bir maddenin immünojenik olması gereken üç özellik vardır: yabancılık, yüksek moleküler ağırlık ve kimyasal karmaşıklık. Aşılardan hayvanın maddeyi "kendisi" olarak tanımaması ve görmezden gelmemesi için yabancılık gereklidir. Genel olarak, bir organizmadan elde edilen bileşikler, aynı birey için immünojenik değildir ve aynı veya ilgili türlerin diğerlerine karşı zayıf bir şekilde immünojeniktir. İmmünojenisite için ikinci şart, yüksek moleküler ağırlıktır. Penisilin, progesteron ve aspirin gibi küçük bileşikler (MW 1000'den az) ve ayrıca orta büyüklükteki birçok molekül (1000 ila 6000 MW) immünojenik değildir. 6000'den büyük moleküler ağırlığa sahip çoğu bileşik immünojeniktir. Bundan daha küçük bileşikler, genellikle B-lenfosit yüzeyinde IgM tarafından bağlanabilir, ancak bunlar, IgM moleküllerinin çapraz bağlanmasını kolaylaştıracak kadar büyük değildir. Bu çapraz bağlanmaya genel olarak "kapak" adı verilir ve antijenin reseptör aracılı endositozu için sinyaldir. Son olarak, bir bileşiğin immünojenik olması için bir dereceye kadar kimyasal karmaşıklık gereklidir. Örneğin, amino asitlerin ve basit polisakaritlerin yüksek moleküler ağırlıklı homopolimerleri bile nadiren iyi immünojenler yapar çünkü bunlar, bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için gerekli kimyasal karmaşıklıktan yoksundur (Jones, 1992).

Dört ana makromolekül sınıfının immünojenikliği hakkında bazı genellemeler yapmak mümkündür: karbonhidratlar, lipitler, nükleik asitler ve proteinler. Karbonhidratlar, ancak nispeten karmaşık bir polisakarit yapısına sahiplerse veya glikoproteinler gibi daha karmaşık moleküllerin bir parçasını oluşturduklarında immünojeniktir. Lipitler genellikle immünojenik değildir, ancak bir taşıyıcı proteine konjugasyon yoluyla bu şekilde yapılabilir. Benzer şekilde, nükleik asitler zayıf

immünojenlerdir, ancak bir taşıyıcı proteine bağlandıklarında immünojenik hale gelebilir. Yapısal karmaşıklıkları ve boyutları nedeniyle, proteinler genellikle güçlü immünojenlerdir. Çoğu doğal immünojenin protein, karbonhidrat veya ikisinin bir kombinasyonundan oluşan makromoleküller olduğu düşünüldüğünde, proteinlerin bu kadar geniş ölçüde immünojenik olduğu anlaşılabilir. Peptitler, antijenik olmak için gerekli karmaşıklığa sahip olabilir, ancak küçük boyutları genellikle onları immünojen olarak etkisiz hale getirir. Peptitler, bir immün tepkisi ve antikor üretimini indüklemelerini sağlamak için çoğunlukla taşıyıcı proteinlere bağlanır (Jones, 1992).

### 1.3. Sentetik Peptitler

Proteinlerden küçük boyutları sebebiyle ayrılan peptitler (<40 aa); biyotıp, ilaç geliştirme, ilaç iletimi, kozmetik, gıda endüstrisi gibi bir çok alanda kullanılırlar. 7000'den fazla doğal olarak oluşan peptit keşfedilmiş olmasına rağmen, verimsiz ve pahalı üretim süreçleri peptit bazlı terapötiklerin geliştirilmesini engellemiştir. Son yirmi yılda peptit araştırması, çeşitli teknolojik gelişmeler nedeniyle önemli bir büyüme gerçekleştirmiştir. Peptitlerin, proteolitik dengesizlik gibi kısıtlarına rağmen peptit tasarımı ve sentezindeki son gelişmeler (proteinojenik olmayan modifikasyonların dahil edilmesi dahil) peptit terapötikleri alanını yeniden canlandırmıştır. Halihazırda piyasada bulunan, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan 60'tan fazla peptit ilacı, şu anda klinik deneylerde olan yaklaşık 140 peptit ilacı ve klinik öncesi geliştirmede peptit bazlı farmasötikler, ilaç endüstrisi için yüksek ekonomik potansiyele sahip büyüyen bir terapötik ajan sınıfı haline gelmektedir (Fosgerau ve Hoffmann, 2015).

Sentetik peptitlerin tarihi 1901'de Emil Fischer (Nobel Kimya Ödülü 1902) ve meslektaşlarının ilk dipeptit olan glisilglisinini sentezlemesiyle başladı. Peptit kimyasının babası olarak kabul edilen Emil Fischer, literatüre "peptit bağı" ve "peptit" terimlerinin girmesini sağladı. Sonrasında 1932'de Leonidas Zervas tarafından karbobenzoksi koruma grubunu geliştirirken, 1953'te Vincent du Vigneaud endojen siklik nonapeptit hormon olan oksitosinin çözeltisindeki sentezi bildirdi ve söz konusu sentez 1955'te Nobel Ödülü'ne layık görüldü. On yıl sonra, 1963'te Bruce Merrifield, katı fazlı peptit sentezini (SPPS) tanıttı ve geliştirdiği "bir katı üzerinde kimyasal sentez metodolojisi" 1984 yılında Nobel Kimya Ödülü ile taçlandırıldı. SPPS metodolojisi, peptit ve protein kimyası (Mitchell, 2008) alanında yeni ufuklar açan gerçek bir devrimdi. Korunan amino asitlerin çözünmez bir katı destek üzerine bağlanmasına dayanan bu basit yöntem, prosedürü basitleştirerek peptit sentezini büyük ölçekli üretime olanak sağlayan otomatik işlemlerle uyumlu hale getirdi (Sachdeva, 2017). Büyük ölçek peptit üretiminde çok maliyetli olan SPPS, sonraki yıllarda maliyet etkin hibrit yöntemlere evrildi (SPS ve SPPS). Halen küçük ila orta

boyutlu peptitler çoğunlukla katı fazda hazırlanırken, büyük peptitler veya küçük proteinler hibrit yaklaşım kullanılarak sentezlenmektedir (Petrou ve Sarigiannis, 2018).

### 1.3.1. Sentetik Peptitlerin Kullanım Alanları

Sentetik peptitler biyotıp, ilaç geliştirme, ilaç iletimi, kozmetik, gıda endüstrisi gibi bir çok alanda kullanılan sentetik peptitlerin en yaygın kullanım amaçlarına örnek olarak antikor geliştirme, protein-protein etkileşimlerinin takibi ve yeni nesil aşı çalışmaları verilebilir. İlk olarak 18. yy'da Edward Jenner tarafından çiçek aşısının bulunmasıyla kullanıma başlanan aşılardan günümüze kadar zayıflatılmış ya da inaktive edilmiş virüs ve bakterileri içeriyordu. Ancak geleneksel aşılardan hazırlanması ve kullanımındaki zorluklar, büyük ölçekli aşı preparatlarının üretiminin maliyetinin hayli yüksek olması, aşı içeriğinde kullanılan patojenlerin yüksek genetik değişkenlik göstermesi ve hastalık etkeninin sızma riski gibi dezavantajları, yeni nesil aşı çalışmalarını bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için gerekli olan patojenin küçük bir bölümünü içeren yüksek saflıkta alt birim aşılardan üretime dolayısıyla mRNA ve peptit gibi küçük molekül bazlı aşı çalışmalarına yönlendirmiştir (Moisa ve Kolesanova, 2010; Plotkin, 2009; Siagian, 2018; Yadav, 2014; Zhang ve Ulery, 2018).

Aşı çalışmalarında kullanılan peptitler herhangi bir hastalığa karşılık gelen bir antijene özgü epitopu içerir ve 20 ila 30 aa'ten meydana gelir. Kimyasal olarak sentezlendikleri için klasik aşılara göre daha güvenilir olan sentetik peptit bazlı aşılardan kanserden alerjiye kadar birçok hastalığa karşı geliştirilebilirler (Burdon, 1988; Knittelfelder, Riemer, ve Jensen-Jarolim, 2009; Nevagi, Toth, ve Skwarczynski, 2018; Yang ve Kim, 2015). Sentetik peptit bazlı aşılardan geleneksel aşılara göre bazı avantajları bulunmaktadır. İlk olarak bu aşılardan biyolojik materyal içermediklerinden uygulandıklarında istenmeyen bağışıklık tepkisi oluşturmazlar. Ayrıca geleneksel aşı preparatlarına göre üretimleri daha hızlı, daha az maliyetli ve daha yüksek saflıktadır. Daha da önemlisi şuan geleneksel aşılardan en büyük problem olan soğuk zincir taşıması sentetik peptit bazlı aşılardan için gerekli değildir. Sentetik peptitlerle yapılan aşı çalışmaları devam etmekte olup henüz insan kullanımı için onaylanmış bir peptit aşısı bulunmamaktadır (Li, Joshi, Singhania, Ramsey, ve Murthy, 2014; Marintcheva, 2018; Nevagi ve ark., 2018; Skwarczynski ve Toth, 2016; Yang ve Kim, 2015).

Sentetik peptitler, özel antikorlar oluşturmak için antijen olarak kullanılabilir. Bir taşıyıcı proteine bağlandığında, peptit bir konakçı humoral bağışıklık tepkisini uyarabilir ve hem monoklonal hem de poliklonal antikorlar oluşturabilir. Bu yaklaşım, epitopu, tüm doğal proteini kullanırken olduğundan çok daha kolay kontrol etmenize olanak sağlar (Lee, Huang, Jayathilaka, Lee, ve Gupta, 2016).

Sentetik peptitler radyokimyasal etiketlemelerle tanısal veya terapötik farmasötik sistemlere dahil edilerek hastalıkların tanısı ve tedavisi, ilaç geliştirme, ilaç iletimi amaçlarıyla (De Jong, 2008) da kullanılırlar. Örnek olarak; nöroendokrin ve prostat kanserlerinin peptit reseptör radyonüklid tedavisi (PRRT) için somatostatin reseptör alt tiplerini hedefleyen peptitler rutin olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak 177Lu- / 90Y-etiketli peptit konjugatları ile tedavi edilen hastalarda tümör gerilemesi, uzama sağkalımı ve artmış yaşam kalitesi gözlenmiştir (Fernandes, 2017).

Tez kapsamında sentetik peptitlerden antikor geliştirme çalışmaları kapsamında immünojen olarak faydalanılmıştır.

### **1.3.2. İmmünojen Olarak Sentetik Peptitler**

Sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanımı ilk olarak 1982'de Young ve Atassi tarafından bildirilmiş ve o zamandan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Antikorların üretimi için bu tür bir kullanım, aşı araştırma ve geliştirme için popüler bir seçim olmuştur. Bu tekniği kullanmanın en büyük avantajı, çoğu immünoanaliz deneyinde genellikle büyük bir endişe olan yüksek derecede çapraz reaktiviteden kaçınmaktır (Banada & Bhunia, 2008).

İyi bir peptit tasarlamak için peptidin optimal uzunluğunun 10-20 aa uzunluğunda olması, bir antijenik bölgeye veya alana sahip olması ve stabil olması gerekir. Çok uzun, çok kısa veya kararsız peptitler, konjugasyon veya sentez sırasında molekülde sterik veya konformasyonel değişikliklere neden olarak çapraz reaktiviteye sebep olur. Mevcut peptit sentez teknolojisi, peptit uzadıkça verimin düşmesine neden olur, böylece çok uzun sentetik peptitler mümkün olsa da pratik değildir. Diğer yandan rekombinant teknoloji ile çok daha uzun amino asit dizilerine sahip peptitler hazırlanabilir (Saper, 2009).

Peptitler kendi başlarına bir bağışıklık tepkisi indüklemek için küçük olduğundan, sığır serum albümeni (BSA) veya anahtar deliği limpet hemosiyanın (KLH) gibi uygun bir taşıyıcı molekül eklenir veya bazen peptitler çoklu antijen peptitleri (MAP'ler) olarak sentezlenir (Angeletti, 1999).

Sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanımının, daha önce karakterize edilmemiş proteinlere karşı antikor üretimi için önemli bir yol olduğu kanıtlanmıştır. Bir genin oligonükleotid dizisi belirlendikten sonra, o gen tarafından kodlanan herhangi bir proteinin amino asit dizisi tahmin edilebilir. Böyle bir diziden seçilen peptitler daha sonra doğal protein ile çapraz reaktif olabilen antikorları oluşturmak için kullanılabilir. Bu yaklaşım kullanılarak birçok proteine karşı antikor üretilmiştir (Peptide As Immunogens, 2017).

Öte yandan moleküler biyoloji çalışmalarında spesifik proteinlere özgü prob olarak kullanılmak üzere antikor geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Antikor geliştirme çalışmaları

büyük ölçüde uygun immünojenlerin hazırlanmasına bağlıdır. Bunun için tamamlayıcı bir deoksiribonükleik asit (cDNA) veya ilgili proteini kodlayan gen dizisi bir heterolog türde (genellikle bakteriler) ifade edilebilir ve elde edilen saflaştırılmış protein bir immünojen olarak kullanılabilir. Bir diğer yol olarak da cDNA asitinden veya genden türetilen amino asit dizilerini içeren küçük sentetik peptitler sentezlenebilir. Bu şekilde sentetik peptitler kullanılarak antipeptit antikorlar geliştirildiğinde antikor tarafından tanınması beklenen epitopun iyi tanımlanmış olması sebebiyle söz konusu antikorların karşılık gelen doğal yapıyı protein ile şaşırtıcı derecede yüksek frekansla etkileşime girdiği tespit edilmiştir (Niman ve ark., 1983). Bu bilgiler ışığında proteinlerde bulunan yüksek oranda korunmuş, aktif, hücre içi, hücre dışı ya da fosforilasyon bölgeleri gibi translasyon sonrası modifikasyon geçiren tüm özel bölgeler için antikor geliştirilmesi çalışmalarında sentetik peptitler uygun immünojen adaydırlar. Ancak sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılması için peptit sekansının belirlenmesi, sentezi ve taşıyıcı proteine konjugasyonu gibi aşamalarda dikkat edilmesi gereken hususlar vardır.

#### *Peptit Sekansının Belirlenmesi*

Bir çok peptit sekansı iyi bir immünojendir ancak bu dizinin türetildiği proteinle etkileşim veren antikorların geliştirilmesini sağlayacağı anlamına gelmez. Genel olarak peptit immünojenler, bir anti-protein antikoru oluşturmada yaklaşık %50 başarılıdır (Hancock ve O'Reilly, 2005). Antiprotein antikor geliştirme için peptit immünojenleri kullanmanın başarısını; bir protein dizisinden kullanılacak peptitlerin sayısı ve aşılama için mevcut olan hayvanların sayısı, kullanılacak dizi verisinin mevcudiyeti ve doğruluğu, proteinin doğal yapısının tahmin edilen ikincil katlanması ve belirlenen sekansın sentezinin kolaylığı ya da zorluğu gibi faktörler etkilemektedir.

Peptit sekansı belirlenirken dikkate alınması gereken en önemli faktörlerden biri peptitin öngörülen yapısıdır. Son teknolojik gelişmeler ışığında biyoinformatik araçlar ve algoritmalar kullanılarak herhangi bir bir amino asit dizisini antijeniklik, hidrofilitiklik, esneklik, yüzey olasılığı ve yük dağılımı açısından değerlendirmek mümkündür. Chou ve Fasman'ın ve Robson ve Garnier'in (Chou ve Fasman, 1978; Garnier, Osguthorpe, ve Robson, 1978) algoritmaları;  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet gibi ikincil yapıların 3-D yapıda peptidin hangi bölgesinde oluştuğuna dair temel oluşturmakta, İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü'nün (<http://www.expasy.ch/>) proteomik sunucusu olan Uzman Protein Analiz Sistemi (ExPASy) ile de birincil ve ikincil yapı analiz araçlarına erişim sağlanabilmektedir. Başka bir tahmin ölçeği olarak da amino asitlerin dönüşlerde bulunmasına dayanılarak Pellequer ve Westhof'un (Pellequer ve Westhof, 1993) tarafından geliştirilen ve antijeniklik seviyesini tahmin etmede %70 başarı gösteren dönüş ölçekleri kullanılabilir. Farklı tahmin araç ve algoritmalarının avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurularak sekans belirlenmesi gerekmektedir.

Bir diğ er husus ise, seç ilen peptit sekansı dizinin tü rediğ i protein üzerinde translasyon sonrası modifikasyon bölgesi oluşturabilir ve netice olarak proteinin 3D yapısında eriş ilabilir olmaması sebebiyle iyi bir immünojen adayı değ ildir. Yüksek oranda başarılı etkileş im verecek bir peptit için en önemli gereklilik sekansın olgun proteinin dış yüzeyinde ve eriş ilbilir olmasıdır. Genel olarak bir proteinin C-terminali N-terminaline göre daha eriş ilbilir olması sebebiyle peptit sekansı seç ilirken ilk tercihtir. Ancak C-terminali bazı durumlarda proteinlerin membrana bağ lanma bölgelerini içerir bu da onları hidrofobik ve kötü bir seç im yapar. Epitoplar (protein üzerinde antikora bağ lanan dizi), paratoplarla (antikor üzerinde proteine bağ lanan dizi) polar ve Van der Waal bağ ları ile etkileş irler, iyonik bağ lar kurmazlar. Bu sebeple yüksek yük ve yüksek hidrofilitik de peptit sekanslarının immünojen olarak başarısını düşürür. Öte yandan hidrofilitik a-sarmal bölgeleri, sentetik peptitin kendisinin bir sarmal oluşturmaya yetecek kadar uzun olması koş uluyla, çoğ u zaman olgun proteine özdeş bir konformasyonu oluşturur böylelikle iyi bir peptit epitop adaydırlar (Hancock ve O'Reilly, 2005).

Peptit sekansları için bir diğ er önemli husus ise seç ilen peptitin uzunluğ udur ve iyi bir immün yanıt için genellikle tavsiye edilen uzunluk 10–20 amino asitir. 7 aa'den kısa peptitler immün sistemi indüklemek için yetersiz kalırken, 20 aa'dan daha uzun olan peptitlerin dizinin alındığ ı protein üzerinde buldukları konformasyondan baş ka kendi baş larına yeni bir konformasyon oluşturma ihtimalleri yüksektir.

Buna ek olarak, ilgili protein dizisinin farklı bölgelerinden birkaç aday peptit kullanmak ve her bir peptit ile birden fazla hayvanı bağ ışı klaş mak da protein ile etkileş ime giren anti-peptit antikorumların geliştirilmesinde başarı yüzdesini artıracaktır.

İmmünojeniteyi etkileyen bir diğ er husus ise seç ilen peptit sekansının sentezlenme kolaylığ ıdır. Genellikle olgun proteinin yüzeyinde bulunmaları ve sentezlenmelerinin kolay olması sebebiyle hidrofilitik diziler uygun peptit adaylarıdır. Öte yandan poliklonal antikora oluşturuken %75 veya daha az saflıkta peptitler yeterli olurken monoklonal antikorumlar geliştirilirken peptitlerin daha yüksek saflıkta sentezlenmesi gerekmektedir (Hancock ve O'Reilly, 2005).

### *Peptit Sentezi*

Genel olarak peptit sentezinin yoğ un emek ve peptit kimyası hakkında uzmanlaş mış personel gerektirmesi, ayrıca peptit sentezinde maliyeti yüksek otomatik sentez yapan makineler kullanılması sebebi ile sentetik peptitler, konusunda uzmanlaş mış özel ş irketlerden satın alma yolu ile temin edilebilirler (Hancock ve O'Reilly, 2005).

Katı faz peptit sentezi, korunmuş amino asitlerin çözünmeyen bir destek üzerine sırayla eklenmesine dayanır. Ekleme, karboksi terminalinden amino terminaline doğru ilerler. Birinci amino asit, bir bağ layıcı ile katı bir desteğ e bağ lanır ve gerekirse, yan zincir amino asit işlevi zincir düzeneğ i boyunca korunur. Gelen, aç illeyici amino asidin karboksi

grubu, birleştirme için aktive edilirken, amino grubu her birleştirme adımı için geçici olarak korunur ve ardından bir sonraki döngü için koruması kaldırılır. Korumanın kaldırılması ve birleştirme döngüleri, amino asit zinciri tamamlanana kadar sürdürülür. Peptit daha sonra katı destekten ayrılır ve amino asit yan zincirlerinin koruması kaldırılarak nihai peptit ürünü elde edilir. Genel olarak, bir peptit yapıldığında sekans değiştirilemez. Asetilasyon, fosforilasyon veya ek kalıntıların eklenmesi (örneğin konjugasyonda kullanım için) gibi modifikasyonlar sentezden önce planlanmalıdır. Değişiklikler daha sonra sentez prosedürüne dahil edilebilir. Örneğin, fosfopeptitler, özel olarak türetilmiş yan zincirlere sahip amino asit kalıntıları kullanılarak sentezlenir. Nihai ürün genellikle ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (su / asetonitril gadyanlı C8 veya C18 kolonları) ve kütle spektrometresi ile değerlendirilir. Antikor üretimi için uygun miktarda peptit yaklaşık 50 mg'dır. Bu, antikorların afinite saflaştırmasına ve antikor engelleme deneylerine, antikor spesifikliğini ve ayrıca immünizasyonun gösterilmesine izin verir. Çoğu peptit dizisinin 20 aa uzunluğundaki bölgedeki sentezinin şu anda oldukça rutin olduğu düşünölmektedir. Bununla birlikte, her zaman istisnalar vardır. Belirli dizilerin sentezlenmesi son derece zor olabilir ve alternatif sentetik stratejiler gerektirebilir (Bodanszky, 1988; Chan, 2000).

#### *Peptitlerin Taşıyıcı Proteinlere Konjugasyonu*

Peptitler genellikle iki amaç kapsamında taşıyıcı proteinlerebağlanırlar; birincisi humoral bağışıklığın aktive edilmesi, ikincisi ise yüksek etkili "yakalama antijeni" (capture antigen) geliştirilmesi Her ne kadar antikorlar B-lenfositleri olan plazma hücreleri tarafından üretilse de, humoral bağışıklığın tam olarak indüklenmesi için T lenfositleri ile B lenfositlerin birlikte aktive edilmesi gerekir. Çoğu peptit B hücresi epitoplarmı içerirken T lenfositleri için epitop içermez ve her ne kadar 10-20 aa uzunluğundaki peptitler immünojen olarak iyi bir aday olsalar da immün sistemi indüklemek için zayıf kalırlar (Carter, 1994). Bu nedenle etkili anti-peptit antikorları oluşturmak için aday peptitler immünojenik taşıyıcı proteinlere kovalent olarak bağlanırlar. Peptit-taşıyıcı protein konjugatında; taşıyıcı protein ile temel histo-uyumluluk kompleksi sınıf II (MHCII) aracılığıyla T-hücresi reseptörleri aktive edilirken, peptitin kendisi B hücre determinantı olarak hizmet eder (Hancock DC, OReilly NJ., 2005). Yaygın olarak kullanılan taşıyıcı proteinler; KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (Bovine serum albumin, sığır serumu albumini), HSA (human serum albumin) ve OVA (ovalbumin) proteinleridir (Singh, Kaur, Varshney, Raje, ve Suri, 2004).

Peptit konjugasyonu için bir diğer amaç ise etkili bir "yakalama antijeni" geliştirmektir. Yakalama antijenleri çoğunlukla enzim immünoassay (EIA) gibi antijen bağlama deneylerinde kullanılırlar. Hazırlanan peptit-taşıyıcı protein konjugatının hem geliştirilen antikora hem de spesifik olmayan bir şekilde plastik bir mikrotitre plakasına bağlanması beklenir. 20 aa'dan büyük peptitler ELISA plakalarına kolaylıkla bağlanırken,



daha küçük peptitler bağlanmada zayıf kalırlar ve taşıyıcı proteinler sayesinde konjugatların yüzeylerinde taşınan peptitler, antikor moleküllerine spesifik bağlanma için erişilebilir durumda kalır (Carter, 1994).

Peptitler, taşıyıcı moleküllere uygun bir çift işlevli reaktif vasıtasıyla kovalent olarak bağlanırlar. Konjugasyona peptitlerin amin ve sülfhidril grupları dahil olur. Bu tür konjugatlar kullanıldığında taşıyıcı molekül üzerinde bulunan epitoplara karşı da önemli miktarda antikor titreleri oluşur. Geliştirilen anti-taşıyıcı antikorlar, poliklonal antipeptit antikor geliştirilirken anti-peptit antikorların poliklonal antikor havuzunda yüzdesinin düşmesine sebep olur. Anti-peptit monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında ise sıklıkla daha zayıf olan anti-peptit tepkisi maskeleyerek peptide özgü çoğu hibridomanın kaybolması ile neticelenir.

En kolay konjugasyon gluteraldehitin çift işlevli reaktif olarak kullanılmasıyla yapılır. Konjugasyon sırasında taşıyıcı protein ve peptit üzerindeki amin grupları çapraz bağlayan gluteraldehit ile kolay ve etkili bir konjugat hazırlanabilir ve üretilen konjugat kısa bir peptitten üretilse daha iyi anti-peptit antikorların geliştirilmesini sağlar. Öte yandan bir çift işlevli reaktif olarak ester kullanıldığında (örneğin MBS; m-Maleimidobenzoyl-N-hidroksisüksinimid), ester peptit üzerinde bulunan sisteine ait tiyol grubu ile taşıyıcı üzerindeki amino grubunu çapraz olarak birbirine bağlar. Bu sebeple MBS esteriyile konjugasyon peptitin ucunda indirgenmiş bir sistein olmasını gerektirir ve hatta seçilen peptit sekansı dahili bir sistein içeriyorsa bu yöntem konjugasyon için önerilmez (Hancock ve O'Reilly, 2005).

## 2. AMAÇ

Günlük hayatta bozulmuş ya da doğru hazırlanmamış konserveler sebebiyle gıda zehirlenmelerine sebep olan BoNT serotipleri, aynı zamanda CDC tarafından A sınıfı biyolojik ajan kategorisinde bulunan toksinlerdir. Etkinlik/ağırlık oranı bir hayli yüksek olan BoNT serotipleri vücuda alındıktan kısa bir süre sonra geri dönülemez hasarlar oluşturmakta hatta ölüme sebebiyet vermektedir. Bu nedenle tespiti oldukça elzem olan BoNT serotiplerinin hızlı tanısı için tanı sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. BoNT serotiplerinin tespit ve teşhisi için geliştirilen antikora dayalı tanı testlerinde, diğer benzer test sistemlerinde ve analiz laboratuvarlarında yoğunluklu olarak toksinin hastalık yapıcı doğal formu kullanılır. Toksinin doğal formu ile yapılan çalışmalar bir taraftan doğrulama gerektirdiğinden çok sayıda deney hayvanının kullanılmasına, diğer yandan toksinle çok uzun süreler çalışılmasını gerektirdiğinden laboratuvar çalışanlarının toksinle maruziyetlerinin artmasına sebep olur.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların amacı, toksinlerin tespit ve teşhisi için yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarında ve hatta analiz laboratuvarlarında toksinlerin hastalık yapıcı doğal formunun kullanılmasının yerine araştırmanın ya da analizin niteliğine göre toksinlerden seçilen özgün bölgelerinin sentetik olarak üretilmeleri ve çalışmalarda bunların kullanılabilmesine yönelik yöntemleri ortaya koymaktır. Tezin amacına yönelik hedef molekül olarak BoNT A seçilmiş, antikor geliştirme amaçlı yapılan çalışmalarda sentetik peptitler immünojen olarak kullanılarak BoNT A'ya karşı antikor geliştirilmesi ve yüksek hassasiyette BoNT A tespiti yapılması amaçlanmıştır. BoNT A çok toksik bir protein olduğundan ve elde edilmesi zor olduğundan, doğal yapılı toksinin kendisi yerine sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılması hem deney hayvanlarının kullanımını azaltmış hem de laboratuvar çalışanları için daha az risk oluşması sağlanmıştır. Sonuç olarak, peptitlere karşı bağışıklık tepkisi incelendiğinde pg seviyelerinde yüksek bir anti-BoNT A antikor tepkisi elde edildiği gösterilmiştir. BoNT A ile yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanılarak protein yapılı toksinlerle çalışılması durumunda söz konusu toksinlerin protein yapılarına özgü seçilen sentetik peptit yapılarının araştırma geliştirme çalışmalarında, analiz ve test metodlarında ve hatta validasyon çalışmalarında toksinin doğal yapılı halinin yerine geçmesi amaçlanmıştır.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Cihazlar

##### 3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.1’de sunulmaktadır.

**Tablo 3.1.** Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

MADDE ADI	KATALOG NO	FİRMA ADI
<b>İmmünizasyonda Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>		
BoNT A Rekombinant Hafif Zinciri	4489-ZN-010	Novus
Freund’s Adjuvant Complete	F5881-10ml	Sigma Aldrich
Freund’s Adjuvant, Incomplete	F5506-10ml	Sigma Aldrich
Glikoz	G8270-100G	Sigma Aldrich
P1 Peptidi	--	Gen Script
P2 Peptidi	--	Gen Script
P3 Peptidi	--	Gen Script
Sitrik Asit	8187071000	Sigma Aldrich
Sodyum Sitrat	6132-04-3	Sigma Aldrich
<b>ELİSA’da Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>		
Anti C. Botulinum Toksin A Antikoru Tavşan Poliklonal	NB110-17098 0,6 mg	NOVUS
Anti Fare Ig(G, A, M) – Alkalen Fosfataz Konjugatı	A0162-1ml	Sigma Aldrich
Anti Fare IgG Alkalen Fosfataz Konjugatı	A3688	Sigma Aldrich
Anti Fare IgM Alkalen Fosfataz Konjugatı	SAB3701200	Sigma Aldrich
Anti Tavşan Ig(G, A, M) – Alkalen Fosfataz Konjugatı	A3812-5ml	Sigma Aldrich
Anti Tavşan IgG– Alkalen Fosfataz Konjugatı	A3812-5ml	Sigma Aldrich
Çinko Klorür (ZnCl <sub>2</sub> )	Z0152-100G	Sigma Aldrich
Magnezyum Klorür (MgCl <sub>2</sub> )	M8266	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	1064621000	Merck
BONT Low Std	Lot: 110221-41074	HSGM’den temin edildi
BONT Med Std	Lot: 110221-41074	HSGM’den temin edildi
Sodyum Klorür (NaCl)	31434-1KG-R	Sigma Aldrich
Sodyum Fosfat Dibazik	04273-1KG	Sigma Aldrich
Para-Nitrofenil Fosfat (PNPP)	20-106	EMP-Milipore
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1048731000	Merck

MADDE ADI	KATALOG NO	FİRMA ADI
Potasyum Hidroksit (KOH)	105021100	Merck
Skim Milk Powder (Süt tozu)	70166-500G	Fluka Anayt.
Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O )	1063451000	Merck
Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Album: BSA)	A-9647	Sigma Aldrich
Tripan Mavisi ( C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> Na <sub>4</sub> )	72-57-1	Sigma Aldrich
Tween 20	8221840050	Merck
<b>Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>		
8-Azaguanin (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O)	861448	Sigma Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	34943	Sigma Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D5648-10L	Sigma Aldrich
HAT Supplement (50x)	21060-017- 100ml	Gibco
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	7365-45-9	Sigma
HT Supplement (100X)	11067030	Gibco
Penisilin-Streptomisin- Amfoterisin (PSA)	516104-M	Sigma
Polietilen glikol 4000 (PEG4000)	8074901000	Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	S5761	Sigma Aldrich
Fetal Sığır Albumini (FBS)	95110	Multicell
<b>Western Blot, SDS Page ve Gümüş Boyamada Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>		
Anti-C. Botulinum Toksin A Antikoru	NB110-17098	NOVUS
Anti C. Botulinum A Toksoid Antikoru	Ab40786	Abcam
Anti-C. Botulinum Toksin A Antikoru	NB100-73116	NOVUS
Anti-Rekombinant BoNT A Hafif Zincir Antikoru	MAB4489	NOVUS
Akrilamid /Bis- Akrilamid (%30luk)	1610154	BioRad
Amonyum Per Sülfat (APS)	A3678	Sigma Aldrich
Asetik Asit	100056	Merck
Etanol	100983	Merck
BCIP/NBP Substrat	B5655	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	RV862	Fermentas
Formaldehit (37'lik)	1.04003	Merck
Glisin	G8898	Sigma Aldrich
Gümüş Nitrat	209139-25G	Sigma Aldrich
Laemmlı Örnek Tamponu- 4X	1610747	BioRad
Metanol	1424109	Merck
Page Ruler Prestrained Protein Ladder	26616	Thermo
Mono Potasyum Fosfat	P0662	Sigma Aldrich
Dipotasyum Fosfat	P3786	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	71725	Sigma Aldrich
Sodyum Karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1.06392	

MADDE ADI	KATALOG NO	FİRMA ADI
Sodyum Tiyosülfat (Na <sub>2</sub> S 2O <sub>3</sub> )	106512	Merck
Sodyum Tiyosülfat Pentahidrat (Na <sub>2</sub> S 2O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O)	1.06516	Merck
Potasyum Hidroksit (KOH)		Sigma Aldrich
Tetra Metil Etilen Diamin (TEMED)	17919	Thermo Scientific
Trizma Baz	T-6066-1KG	Sigma Aldrich
<b>Genel Amaçlı Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>		
Asetik asit (glasiyal) 100%	1000632511	Emsure
HCl	7647-01-0	Merck
Magnezyum klorür anhidrid	M8266-100G	Sigma Aldrich

### 3.1.2. Hücre Hatları ve Deney Hayvanları

Söz konusu tez çalışmasında in vitro çalışmalar için F<sub>0</sub> isimli myeloma hücre hattı (ATCC CRL-1646) in vivo çalışmalar için ise Balb/C türü fareler ile bu farelerden elde edilen dalak ve makrofaj primer hücreleri kullanılmıştır. Kullanılan fareler TÜBİTAK MAM GMBE deney hayvanları ünitesinden temin edilmiş olup 1009 Tavşan Serumunu Projesi kapsamında etik kurul onayları mevcuttur (TÜBİTAK HADYEK Etik Kurul No 16563500-111-103).

### 3.1.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

#### *Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması*

- DMEM Besi yeri: 13,36 g DMEM, 2 g Sodyum Bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) ve 5,96 g HEPES 1 L otoklavlanmış dH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve NaOH ile pH 7,2'ye ayarlandı. Hazırlanan besi yeri steril kabin içinde 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandıktan sonra kullanıldı.
- Hücre Besi yeri: %90 DMEM, %10 fetal sığır serumu (FBS), %0,1 PSA
- PEG (Polietilen Glikol) Çözeltisi: 2 g PEG, 1 ml dH<sub>2</sub>O ve 1 ml PBS içinde çözüldükten sonra otoklav edilerek sterilize edildi, 37°C'de steril koşullarda saklandı.
- HAT İçeren Besi Yeri: Hücre besi yerine 50x HAT %2 oranında (20ml/L) eklendi.
- HT İçeren Besi Yeri: Hücre besi yerine %1 oranında (10ml/L) HT (50x) eklendi.
- Dondurma Çözeltisi: %20 FBS, %70 DMEM ve %10 DMSO veya %70 FCS, %20 DMEM ve %10 DMSO şeklinde hazırlandı.

#### *SDS PAGE Jel İçeriğinin Hazırlanması*

- %10 APS: 0,1 g APS 1 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek taze olarak kullanıldı.
- Tris-HCl (1,5 M pH: 8,8): Gereken hacim kadar 1,5 M Tris-Baz tartıldı, dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü, HCl ile pH 8,8'e ayarlandı.
- Tris-HCl (1M pH: 6,8): Gereken hacim kadar 1 M Tris-Baz tartıldı, dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü, HCl ile pH 6,8'e ayarlandı.
- 10X SDS Yürütme Tamponu: 10 g SDS, 30,3g Tris-Baz ve 144,1 g Glisin tartıldı, 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.
- %10 SDS: 10 g SDS, 100 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü.

#### *Gümüş Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması*

- Fiksasyon Tamponu: %50 MeOH, %12 Asetik Asit, 0,5 ml %37 Formaldehit, dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlandı.
- Yıkama Tamponu: %50 EtOH, %50 dH<sub>2</sub>O
- Ön Muamele Tamponu: 0,2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O tartıldı, dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlandı.
- Bant Fiksasyon Tamponu: AgNO<sub>3</sub> (2g/L) ve 0,75 ml %37 Formaldehit
- Geliştirme Tamponu: 60 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4 mg/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve 0,5 ml %37 Formaldehit
- Durdurma Tamponu: %50 MeOH, %12 Asetik asit, dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlandı
- Son Yıkama Tamponu: %50 MeOH, %50 dH<sub>2</sub>O

#### *Western Blot Çözeltilerinin Hazırlanması*

- Fosfat Tamponu: 150 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 150 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltileri hazırlandı. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinin pH'ı 7,2'ye ayarlandı.
- 1X PBS: 10 mM fosfat tamponu ve 150 mM NaCl istenilen hacim kadar dH<sub>2</sub>O içinde çözülüp hazırlanmıştır.
- 1X TBS: 32 g NaCl, 9,68 g Tris-Baz tartıldı. 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü, pH 7,6'ya ayarlandı.
- 1X TBS-T: 1 L TBS çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween-20 eklendi.
- 1X Transfer Tamponu: 0,592 g Tris-Baz ve 0,293 g Glisin tartıldı, 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. %10'luk SDS çözeltisinden 337 µl eklendi ve pH 9,2'ye ayarlandı. Kullanım esansında %20 metanolla seyreltilerek kullanıldı.
- %1 Membran Bloklama Çözeltisi: %1 yağsız süt tozu 1X TBS içinde çözüldü.
- Substrat Tamponu: 10 ml dH<sub>2</sub>O içerisine 1 tablet BCIP/NBT substratı çözülerek kullanıldı.

#### *İmmünizasyon ve Kan Alımı Çözeltileri*

- Fare başına 75 µg antijen PBS içinde çözüldü, hacmi Freund adjuvanı ile 1:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı. İlk immünizasyon Freund'un tam adjuvanıyla, sonraki immünizasyonlar ise Freund eksik adjuvanla yapıldı, hatırlatma işleminde antijen miktarı yarıya düşürülerek adjuvansız olarak kullanıldı.
- Sodyum Sitrat Hazırlanması: 2,3 g sodyum sitrat, 0,8 g sitrik asit ve 2,2 g glikoz 100 ml damıtılmış su içinde çözüldü ve -20°C'de saklandı.

#### *Antikor Yanıtının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler*

Antikor yanıtlarının tespiti için dolaylı ELİSA yöntemi kullanıldı ve aşağıda verilen çözeltiler hazırlandı;

- Yıkama Tamponu: 1X PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween-20 eklendi
- Bloklama Tamponu: %1 yağsız süt tozu 1X PBS içinde çözüldü
- Substrat Tamponu: 0,027 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,04 g MgCl<sub>2</sub> ve 1,5 g Glisin 200 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü, KOH ile pH 10,4'e ayarlandı.
- Substrat Çözeltisi: 1mg/ml para-nitrofenil fosfat, substrat tamponu içinde çözüldü.

#### **3.1.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar**

Antikor yanıtlarının için tespiti için dolaylı ELİSA yapılırken Bio Tek Instruments marka ELİSA Çoklu Plak Okuyucu ve Yıkayıcı'dan; toksinin yapısının incelenmesi amacıyla SDS-PAGE, gümüş boyama ve Western-Blot yapılırken ve protein tayini yapılırken ise BioRad marka jel elektroforez sistemi ve blotlama cihazı ile Thermo Fisher Scientific marka The Qubit 2.0 Fluorometer cihazları kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında Olympys marka invert mikroskop kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Toksin Yapısının İncelenmesi**

HSGM'den temin edilen ve ELISA çalışmalarında kullanılacak olan BoNT standartlarının ve kültürde üretilen BoNT A toksinin nitel analizlerini yapmak amacıyla SDS-PAGE, Western Blotlama ve Gümüş Boyama teknikleri kullanıldı.

Öncelikle SDS-PAGE için %10'luk ayırma jeli hazırlandı ve BoNT standartları 10 ng olarak 95°C'de 10 dakika boyunca 1 mM DTT ile denatüre edilerek ve edilmeden

kuyulara yüklendi. 1 saat boyunca 100 voltta ve 1 saat 150 voltta yürütüldükten sonra, Gümüş Boyama protokolü uygulandı. İlk olarak jel, 1 saat süreyle fiksasyon tamponu (%50 MeOH, %12 Asetik Asit, 0,5 ml %37 Formaldehit) ile bekletildi ve daha sonra yıkama tamponu (%50 EtOH, %50 dH<sub>2</sub>O) ile 1 saat yıkandı. Yıkamadan sonra, jel 1 dakika boyunca ön-muamele tamponu (0,2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O) ile muamele edilmiştir. Damıtılmış su ile yıkanan jel bandı, bant sabitleme tamponu (2g/L AgNO<sub>3</sub> ve 0,75 ml %37 Formaldehit) ile 20 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra, jel tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve bantlar geliştirme tamponunda (60g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4 mg/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve 0,5ml %37 Formaldehit) görülene kadar bekledi. Bantların belirginleşmesinden sonra reaksiyon, durdurma tamponu (%50 metanol, %12 Asetik asit, %38 dH<sub>2</sub>O) ile durduruldu ve son yıkama tamponu (%50 MeOH, %50 dH<sub>2</sub>O) ile yıkandı.

Western Blotlama için ise 1 mM DTT ile denatüre edilen ve edilmeyen örneklerin yukarıda tarif edildiği gibi jelde yürütülmesinin ardından jel 30 dakika boyunca BioRAD Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi yoluyla bir PVDF membranı üzerine transferi gerçekleştirildi. Transfer sonrası spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için membran 20 ml %1 süt tozu ile bloke edildi. Bloklama sonrası üç kez 20 ml TBS-T (20 mM Tris, %0,9 NaCl, %0,05 Tween-20, pH 7.4) ile yıkandı ve anti-BoNT A tavşan pAB (Novus Biologicals NB110-17098) antikoru ile TBS içinde bekletildi. Son olarak membran üç kez daha TBS-T ile yıkandı ve substrat çözeltisi içinde kontrollü bir şekilde oda sıcaklığında bekletilerek bant görüntüleri değerlendirildi.

### **3.2.2. Peptit Tasarımı**

İlk olarak, literatürden (Zarebski ve ark., 2008) BoNT A'nın hafif zinciri, reseptör bağlanma alanı ve translokasyon alanı için aday peptitler seçildi. Immune Epitop Database (IEDB) ve Discovery Studio 4.0 Visualizer'daki epitop tahmin araçlarını kullanarak, seçilen epitopların dizileri PDB kodu 3BTA ile BoNT A'nın kristal yapısında gözlemlendi. Toksinin yüzeyinde görüntülenen doğrusal epitoplar peptit olarak seçildi. Peptitler, Gen Script firmasından gluteraldehitin çift işlevli reaktif olarak kullanılmasıyla taşıyıcı proteinlere (BSA, OVA ve KLH) konjüge edilmiş bir formda satın alındı.

### **3.2.3. Antikor Üretiminde Kullanılan Yöntemler**

#### *İmmünizasyon*

Çalışmalarda sekiz haftalık erkek BALB/C fareleri kullanıldı. Hazırlanan immunojenler ile 2 hafta aralıklarla fareler immünize edildi. İlk enjeksiyon dozunda tam Freund adjuvanı kullanıldı, sonrakilerde ise dozlar eksik Freund adjuvanı içinde hazırlandı.



Her başışıklamadan sonra 10. günde farelerden kan alımı yapıldı ve serumlar, santrifüjleme yoluyla toplandı. Antikor titreleri yeterli bulunan farelere füzyon öncesi son kez damar içine olacak şekilde hatırlatma dozu uygulandı. Hatırlatma işlemi adjuvansız ve normalde kullanılan antijen miktarının yarısı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### *İmmün Yanıtlarının İncelenmesi*

Peptitlerin başışıklık tepkisi kabiliyetini belirlemek için, aşılanan farelerin serumundaki antikor titreleri ELISA ile belirlendi. Fareler serumundaki antikor titrelerini ölçmek için dolaylı enzime bağlı immünosorban deneyi (ELISA) kullanıldı. Öncelikle plaklara kaplanacak en uygun antijen miktarı bulundu ve kuyu başına 100 ng antijenin kullanılmasına karar verildi. 100 ng P1-KLH, P2-KLH ve P3-OVA konjugatları ELISA plaklarına kaplandı. Plakanın kaplaması, gece boyunca 4°C'de gerçekleştirildi. Bazı kuyular PBS ile negatif kontrol olarak bekletildi. Kuyucuklar PBS içinde %1 yağsız süt çözeltisi ile 37°C'de 1 saat süreyle bekletildi. Plakalar üç kez yıkama tamponu (PBS-T) ile yıkandı. 100, 1000 ve 5000 kat seyreltilmiş fare serumları veya seyreltilmemiş kültür üst fazı, belirlenmiş kuyucuklara dağıtıldı. İmmünize edilmemiş fare serumu veya PBS negatif kontroller olarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak 2000 kat seyreltilmiş AP konjüge edilmiş tavşan anti-fare polivalent antikoru (SIGMA) kullanıldı. Yıkama tamponu ile beş kez yıkandıktan sonra, substrat tamponunda (1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M glisin pH 10.4) hazırlanan p-nitrofenil fosfat AP substratı olarak kullanıldı. 405 nm'deki absorbans, bir mikropłaka okuyucu ile ölçüldü.

#### *Antikorların BoNT İle Etkileşimlerinin Karakterizasyonu*

Peptitler ile oluşturulan immün yanıtların BoNT A toksin standardı ile etkileşimin izlenmesi amacıyla dolaylı ELISA yapıldı. Öncelikle plaklara kaplanacak toksin miktarının optimizasyonu yapılarak kuyu başına 10<sup>-3</sup> ng ve 10<sup>-4</sup> ng toksin standardı kullanılması uygun bulundu. ELISA plağının toksinle kaplanması gece boyunca 4°C'de gerçekleştirildi. Bazı kuyular PBS ile negatif kontrol olarak bekletildi. Kuyucuklar PBS içinde %1 yağsız süt çözeltisi ile 37°C'de 1 saat süreyle bekletildi. Plakalar üç kez yıkama tamponu (PBS-T) ile yıkandı. 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> ve 5x10<sup>3</sup> kat seyreltilmiş fare serumları veya seyreltilmemiş kültür üst fazı, belirlenmiş kuyucuklara dağıtıldı. İmmünize edilmemiş fare serumu veya PBS negatif kontroller olarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak 2x10<sup>3</sup> kat seyreltilmiş AP konjüge edilmiş tavşan anti-fare polivalent antikoru (SIGMA) kullanıldı. Yıkama tamponu ile beş kez yıkandıktan sonra, substrat tamponunda (1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M glisin pH 10.4) hazırlanan p-nitrofenil fosfat AP substratı olarak kullanıldı. 405 nm'deki absorbans bir mikropłaka okuyucu ile ölçülmüştür.

#### *Myeloma (F0 Hattı) Hücrelerinin Hazırlanması*

Sıvı nitrojende (-196°C) stoklanmış olan F<sub>0</sub> (CRL-1646, ATCC) myeloma hücreleri füzyondan 10 gün 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Dondurma besi yerinde bulunan DMSO'dan hücrelerin kurtarılması için çözünen hücreler üzerine 1:10 olacak şekilde taze besi yeri eklendi, 1250 rpm'de 5 dk. çöktürüldü. Üst faz atılarak DMSO uzaklaştırıldı. Hücre peleti %10 FBS, %1 PSA içeren taze besi yeri içinde çözüldü ve yeni kültür şişesine alındı. Hücreler ilk pasajlandığında büyüme besi yerine 20 µg/ml olacak şekilde azaguanin eklendi ve HGPRT (-) mutantlı hücrelerin oluşturulması sağlandı. Füzyona kadar 1-5x10<sup>8</sup> myeloma hücresi olacak şekilde pasajlanması ve takibi yapıldı.

#### *Hücre Sayımı*

- Miktar tayini yapılmak istenen hücre süspansiyonundan 10-20 µl kadar alınıp 1:1 olacak şekilde tripan mavisi ile karıştırıldı.
- Karışım hemositometre üzerine alınarak 25 kare içine düşen hücre miktarı sayıldı.
- Sayılan hücre miktarı hücrelerin içinde bulundaki hacim ve 10<sup>4</sup> (sabit sayı) ile çarpılarak toplam canlı hücre sayısı bulundu.

#### *Besleyici Hücrelerin Hazırlanması*

Besleyici hücre, füzyon işlemi sırasında oluşturulacak olan hibridoma hücrelerine uygun yaşama ortamı hazırlayan hücreler için kullanılmaktadır. Besleyici hücreler daha önceden bağışıklanmamış fareden alınan makrofajlardır. Makrofajlar bir yandan sitokin salgılayarak hibrit hücrelerin yaşamasına destek olurken bir yandan da fagositoz ile dalaktan gelen atıkların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar. Bunun için;

- Füzyondan bir gün önce daha önce bağışıklanmamış bir fare alındı servikal dislokasyon ile öldürülerek %70 EtOH içine alındı.
- Laminar akımlı kabinde steril koşullarda pens ve makas yardımı ile periton zarına zarar vermeden farenin derisi yüzüldü.
- Periton zarın içine 5 ml serumsuz DMEM enjekte edildi ve 1 dk. sonra geri alındı.
- Fareden alınan besleyici hücreler 20 ml besi yeri içine alındı, sayımı yapıldı ve 96 kuyucuklu plağa kuyu başı 6000 hücreyi geçmeyecek şekilde 100 µl olarak dağıtıldı.

#### *Dalaktan B Hücre İzolasyonu*

P1, P2 ve P3 antijenleriyle bağışıklanan edilen farelerin serumlarındaki antikor yanıtları ELİSA ile kontrol edilerek yüksek antikor yanıtı veren fareler füzyon için seçildi. Seçilen farelerin B hücreleri aşağıdaki basamaklar takip edilerek alındı;

- Füzyon günü antikor titresini yüksek olan fare servikal dislokasyon ile öldürülüp %70 EtOH içinde alındı.

- Laminar akımlı kabin içinde karın bölgesi kesilen fareden ELISA deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere 0,1 ml kalp kanı toplandı ve 1:1 oranda sodyum sitratla karıştırılıp, santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrıldı.
- Sonrasında bağışık farenin dalağı kesilerek çıkarıldı ve petri kabında bulunan süzgeç içine alındı.
- Süzgeç içinde bulunan dalak steril şırınga arkası ile mekanik olarak ezildi ve DMEM ile yıkanarak hücrelerin açığa çıkması sağlandı.
- Toplanan dalak hücreleri DMEM içerisinde dağıtıldı, 2 kez 1250 rpm'de 5'er dk yıkandı ve sayımı yapılarak füzyon işlemine hazır hale getirildi.

#### *Hücre Füzyonu ile İn Vitro B Hücre Kültürü*

İmmünizasyonlar sonucunda dolaylı ELİSA ile antikor titreleri yeterli bulunan fareler hibridoma yöntemiyle antikor geliştirilmesi amacıyla füzyon işlemine alındı. İşlem öncesinde fareler son kez intravenöz olacak şekilde hatırlatma dozuna tabii tutuldu. Hatırlatma işlemi adjuvansız ve normalde kullanılan antijen miktarının yarısı kullanılarak gerçekleştirildi. Füzyon işlemi için aşağıda sunulan basamaklar takip edildi;

- Sayımı yapılan dalak hücreleri ile F<sub>0</sub> myeloma hücreleri 3:1 oranında birleştirildi, süspansedildi ve 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz uzaklaştırıldı, dalak ve myeloma karışımı pelet üzerine 1 ml PEG (37°C) 1 dakika boyunca yavaşça eklendi.
- 1 dk boyunca hücreler nazik hareketlerle karıştırıldı.
- 4 dk boyunca 4 ml DMEM yavaşça ilave edildi.
- 5-10 dk boyunca 10 ml DMEM yavaşça ilave edildi.
- Karışım 5 dk CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletildi, sonra 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz uzaklaştırıldı, pelet HAT içeren besi yeri içerisinde çözüldü ve 150 µl/kuyu olacak şekilde bir önceki gün hazırlanan besleyici hücre içeren 96 kuyucuklu plaklara dağıtıldı.
- Füzyon işleminden sonra plaklara 10 gün boyunca hiçbir işlem uygulanmadan hibritlerin etüvde büyümesi sağlandı.
- 10 gün sonra ELİSA ile tarama yapılan kuyulara HAT içeren taze besi yeri eklendi.
- Füzyonun 12-14. günü arasında hücrelerin klon büyüklüklerine göre HT içeren besi yerine geçiş sağlandı.
- Füzyondan sonra 3. haftadan itibaren ise hibritlerin normal besi yerine ne (%10 FBS içeren) geçişi sağlandı.

#### *Anti-Peptid Antikor Üreten Hibridomaların Seçilimi*

- Füzyon sonrası 10. günde hibrit hücre tespiti için ters mikroskop ile taranarak tüm plaklar tarandı, hibrit tespit edilen kuyular işaretlendi ve antikor yanıtları dolaylı ELISA ile kontrol edildi.
- Bu işlem 3 hafta üst üste yapıldı ve her hibrit en az 2 kere antikor yanıtı için test edildi.
- Antikor titreleri yüksek olan hibritler önce 24 kuyucuklu plaklara, sonra 6 kuyulu plağa alınarak yedeklendi.

#### *Seçilen Hibridomaların Ayırıştırılması*

- Antijenlere özgü antikor üreten hibrit hücrelere yedekleme yapıldıktan sonra hücre kolonisinde saflık sağlamak amacıyla tek düşürme işlemi yapıldı.
- Seçilen hibrit hücreler her kuyuya tek hücre düşecek şekilde bir seyreltildi ve plaklara dağıtıldı.
- Tek düşürmeden 1 hafta sonra hibrit hücre gözlenen kuyular antikor yanıtı için dolaylı ELISA ile test edildi ve yanıt alınan hücre tekrar tek düşürme işlemine tabi tutularak hibrit kolonisinin tek bir klondan oluşması sağlanmış oldu.

#### *Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması*

- F<sub>0</sub> myeloma hücreleri %10 ile %20 arasında FBS ve %0,1 PSA içeren hücre besi yerinde büyütülerek, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem koşullarındaki inkübatörde muhafaza edildi. Kültür çalışmalarında kullanılacak tüm bütün sıvı malzemeler kullanım öncesi 37°C'ye ısıtıldı. Hücreler yaşam alanlarında %70'lik yoğunluğa geldiklerinde alt pasajlama yapıldı.
- Hücre pasajı için öncelikle hücre kültür şişesindeki üst sıvı steril bir kaba alındı, hücre şişesi içine 1X PBS eklenerek yüzeye tutunan hücreler kazıyıcı yardımıyla nazikçe kaldırıldı. Toplanan hücreler 1250 rpm'de 5 dakika kadar santrifüj edildi. Üste kalan sıvı atıldı ve hücre peleti %10 FBS içeren DMEM ile çözülerek steril kültür şişelerine ekildi.
- Dondurma işlemi için ise; hücre kültür şişesinden kaldırılan hücreler 1X PBS ile yıkanıp ve santrifüjle çöktürüldükten sonra %70 FBS, %20 DMEM, %10 DMSO içeren çözeltiye eklendi ve gece boyu -80°C'de bekletilerek uzun süreli muhafaza için sıvı nitrojen tankına kaldırıldı. Her bir dondurma tüpünde  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  hücre olmasına dikkat edildi.

### **3.3. İstatistiksel Analizler**

Tez çalışması kapsamında, tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı. Veriler, GraphPad Prism 5 (San Diego, CA) kullanılarak ANOVA testi ile analiz edildi ve  $p < 0,05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. LOD, LOQ ve r değerleri Microsoft Excel veri analiz araçları ile hesaplandı.



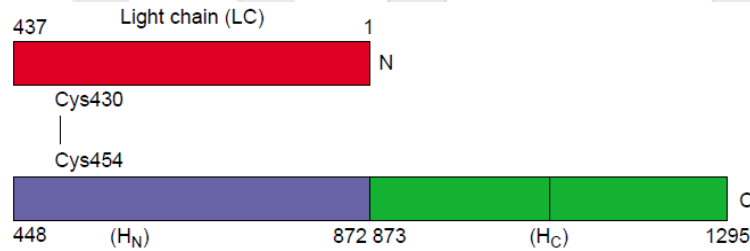
## 4. BULGULAR

### 4.1. Diagnostik Amaçlı Anti-BoNT A Antikor Üretimi

Tez kapsamında BoNT A tespitinde kullanılmak üzere anti-BoNT A antikorların geliştirilmesi için sentetik peptitler immünojen olarak kullanıldı. Öncelikli olarak BoNT A proteininin her üç etki alanına özgü olarak peptit sekansları tasarlandı ve devamında bu peptitler bağışıklamada kullanılarak immün yanıt oluşturmadaki etkinlikleri karşılaştırıldı. Sentetik peptitlerle yapılan çalışmalarda yüksek antikor titresi oluşturan fareler füzyon işlemine alınarak monoklonal antikor geliştirme çalışmalarına dahi edildi. Bununla birlikte, sentetik peptitlere alternatif olarak ticari olarak temin edilen BoNT A rekombinant hafif zinciri ile de bağışıklama çalışmaları yapıldı.

#### 4.1.1. Peptit Antijen Tasarımı

BoNT A iki zincirli yapıdadır. Hafif zincir nörotoksin etkiyi gösterirken ağır zincir hafif zincirin sinir hücrelerine taşınmasına yardımcı olur. Ağır zincir iki adet protein etki alanından oluşur; reseptör bağlanma bölgesi ve translokasyon bölgesi. Reseptör bölgesi sinir hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörlere toksinin bağlanmasını sağlarken translokasyon bölgesi toksinin hafif zincirinin sinir hücrelerinin zarlarından geçerek sitoplazmaya ulaşmasını sağlar (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Botulinum Nörotoksin A'nın iki zincirli yapısı (Turton, Chaddock, ve Acharya, 2002)

Yapılan çalışmalarda, nörotoksinin reseptör bağlanma bölgesi kesilerek sadece hafif zincir ve translokasyon bölgesi olduğu durumlarda da sinir hücrelerinin sitoplazmasına ulaştığı gösterilmiştir. Hafif zincir ve ağır zincirde bulunan her iki protein etki alanı immünojen bölgeler içermektedir (Immune Epitope Database And Analysis Resource). Bu sebeple BoNT A'nın nörotoksin etkisinin çıkış yolu üzerinden yola çıkılarak her üç etki alanı için de peptit bölgesi seçildi. Peptit dizayn edilirken izlenen basamaklar aşağıda verildiği gibidir;

1- Aday peptitler, literatürde listelenen epitoplardan seçildi (Zarebski ve ark., 2008) (Tablo 4.1)

**Tablo 4.1.** Diagnostik Kullanım İçin Peptit Seçimi

Etki Alanı	Aa Sekansı	Bölge
L	GQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTN	28-53
	AVTLAHELHAGHR	218-231
HN	ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTN	449-473
	FFSPSEDNFTNDLNKGEEI	463-481
	KGEEITSDTNIEAAEENIS	477-495
	DYVKKVNKATEAAMFLGWV	589-607
HC	GITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQ	1230-1254
	NKCKMNLQDNNGNDIGFIG	1233-1251
	IGFIGFHQFNIAKLVASN	1247- 1265
	LVASNWYNRQIERSSRTL	1261-1279
	SRTLGCSEWFIPVDDGWGERPL	1275-1296

2- IEDB'deki epitop tahmin araçları kullanılarak tasarlanan epitopların dizileri, seçilen epitoplarla aşağıdaki gibi karşılaştırıldı;

i. IEDB'den "B hücresi Epitop Tahmin Araçları" seçildi (Şekil 4.2)

The screenshot shows the IEDB Analysis Resource website. The main navigation bar includes 'Overview', 'T Cell Tools', 'B Cell Tools', 'Analysis Tools', 'Tools-API', 'Download', 'Datasets', 'Contribute Tools', and 'References'. The 'B Cell Epitope Prediction Tools' section is highlighted, listing several tools: 'B Cell Epitope Prediction' (with a sub-link for 'Prediction of linear epitopes from protein sequence'), 'Discotope - Prediction of epitopes from protein structure', 'EliPro - Epitope prediction based upon structural protrusion', and 'Methods for modeling and docking of antibody and protein 3D structures'. A 'Structure Tools' section is also visible, featuring 'LYRA (Lymphocyte Receptor Automated Modelling)'. A note at the bottom indicates that tools under AR Labs are experimental and not yet ready for production.

**Şekil 4.2.** İmmün Epitop Veritabanından “B cell Epitope Prediction Tools” Seçilimi

ii. Algoritma olarak, "Protein dizisinden lineer epitopların tahmini", yöntem olarak ise “Bepipred Lineer Epitop Tahmini 2.0” seçildi. BoNT A için UniProtKB-P0DPI1 referans dizisi erişim numarası kullanıldı. BoNT A'nın her bir protein alanı için FASTA'lar

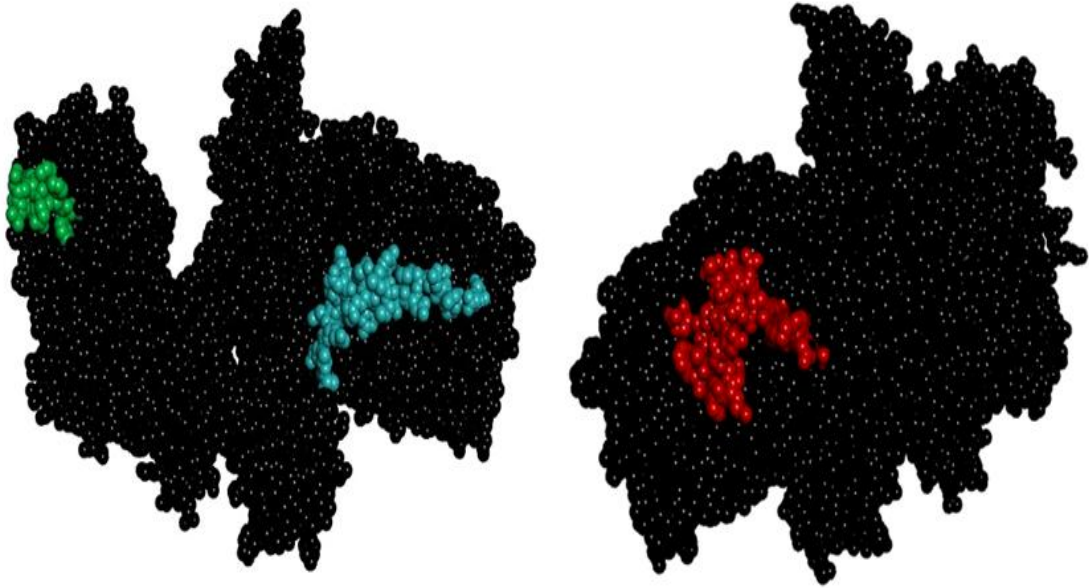
ayrı ayrı girildi ve bunlardan en muhtemel doğrusal epitop bölgelerine sahip olan adaylar kaydedildi (Tablo 4.2);

**Tablo 4.2.** İmmünizasyonlar İçin Seçilen Peptitler

L	HN	HC
45-89 (45 aa)	464-494 (31 aa)	1081-1096 (16 aa)
199-220 (22 aa)	751- 777 (27 aa)	1225-1247(23 aa)
137-147 (11 aa)	613-628 (16 aa)	

iii. Seçilen epitopların sekansları, Discovery Studio 4.0 Görüntüleyici ile BoNT A'nın (UniProtKB - P0DPI1) kristal yapısı üzerinde görüntülendi. 45-75 arasındaki L dizisi için, HN 470-495 ve HC 1230-1242 için proteinin yüzeyinde en görünür epitoplar bulunmuştur (Şekil 4.3).

iv. İmmünizasyon için optimal peptit uzunluğu 10-20 aa tortusu olarak kabul edildi, bu nedenle Tablo 4.3'de gösterilen peptitler sentez için seçildi. Seçilen peptitler, Gen Script'ten >%85 saflık ile taşıyıcı proteinlere bağlı bir formda (BSA, KLH ve OVA proteinlerine) satın alındı ve BSA'ya bağlı olan peptitlerle fare bağışıklamaları yapıldı.



**Şekil 4.3.** Botulinum Nörotoksin A Epitop Seçiminin Üç Boyutlu Modeli (Mavi; L 45-75, Yeşil; HN 470-495, Kırmızı; HC 1230-1242)



**Tablo 4. 3** Seçilen Peptitlerin Amino Asit Dizisi

Peptit Adı	Bölge	Sekans*	Uzunluk (aa)	Konjugat
P1	L	C-PEEGDLNPPPEAKQ	54-67 (14+1 aa)	BSA
P2	HN	NDLNKGEEITSDTNC-C	473-487 (15+1 aa)	BSA
P3	HC	QGITNKCKMNLQ-D	1229-1241 (13 aa)	BSA

\*: Yeşil ile belirtilen aa'ler muhtemel konjugasyon yeri

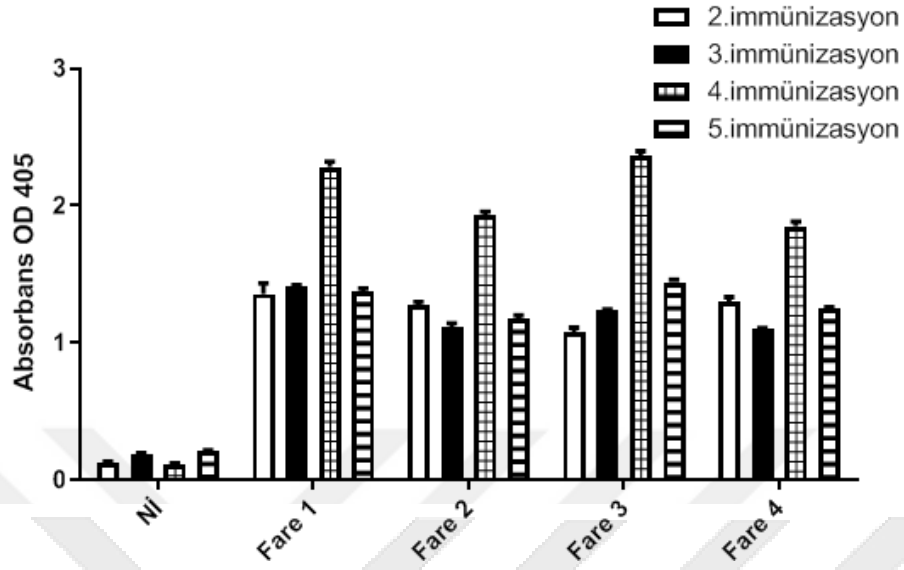
#### 4.1.2. Peptitlere Spesifik Antikor Üretim Çalışmaları

Tez kapsamında sentetik peptitler kullanılarak BoNT A nörotoksine özgü antikor üretilmesi hedeflendi ve bu amaca yönelik olarak BoNT A'ya özgü sentezlettirilen sentetik peptitlerle fare immünizasyonları gerçekleştirildi.

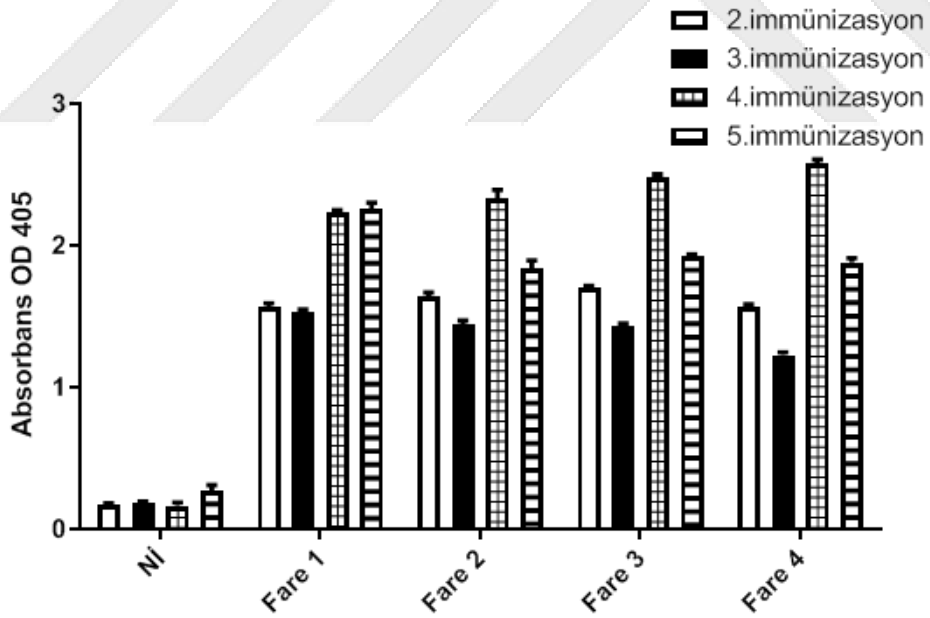
Antikor üretimi için hibridoma teknolojisi kullanıldığında farklı özellik ve yapıda çeşitli adjuvan seçenekleri bulunmaktadır ancak keşfedildiğinden beri Freund'un tam adjuvanı (Freund, 1956; Freund, Casals , & Hosmer, 1937; Freund & McDermott, 1942) üretiminde en etkili bulunan ve en yaygın olarak kullanılan adjuvandır. Freund'un tam adjuvanı, bağışıklık uyarıcı yeteneği ile diğer adjuvanlara karşı üstünlük ortaya koymaktadır (Stills, 1991). Yüksek immün sistem uyarıcı özelliği ve humoral yanıtın indüklenmesinde gücü sebebiyle söz konusu adjuvanla immünizasyon yapılan deney hayvanlarında immün cevabın çok uzun süreler korunduğu bilinmektedir (Lindblad, 2000). Bu sebeple adjuvan olarak Freund adjuvanı seçildi ve immünizasyon çalışmalarında sekiz haftalık erkek BALB/C fareleri kullanıldı. Peptit immünizasyonlarında grup başına 4 adet fare sırasıyla P1-BSA, P2-BSA ve P3-BSA peptitleriyle 75 µg peptit/fare olacak şekilde ve rekombinant hafif zincir immünizasyonlarında (Novus Marka 4489-ZN-010 katalog numaralı rekombinant nörotoksin hafif zinciri) ise 3 adet fare 1,5 µg peptit/fare olacak şekilde fareler 2 hafta aralıklarla immünize edildi. İlk enjeksiyon dozunda tam Freund adjuvanı kullanıldı, sonrakilerde ise dozlar eksik Freund adjuvanı içinde hazırlandı. Her bağışıklamadan sonra 10. günde farelerden kan alımı yapıldı ve serumlar santrifüjleme yoluyla toplandı. İmmünize edilen farelerin antikor yanıtlarını belirlemek üzere farelerden alınan serumlar P1 ve P2 peptitleri için KLH'a bağlı peptit kaplanmış plaklarda, P3 peptiti için ise OVA'ya bağlı peptit ile kaplanmış plaklarda dolaylı ELISA ile test edildi.

Peptitlerle yapılan immünizasyonların antikor yanıtları değerlendirildiğinde (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) fare serumlarındaki her peptit için antikor titrelerinin dördüncü bağışıklamadan sonra çoğunlukla zirveye ulaştığı görüldü. Peptitlerle bağışıklanan her bir grup detaylı incelendiğinde 4. immünizasyon sonunda, sırasıyla P1-BSA ile bağışıklanan grupta 3 no'lu farenin, P2-BSA ile bağışıklanan grupta 4 no'lu farenin, P3-BSA ile

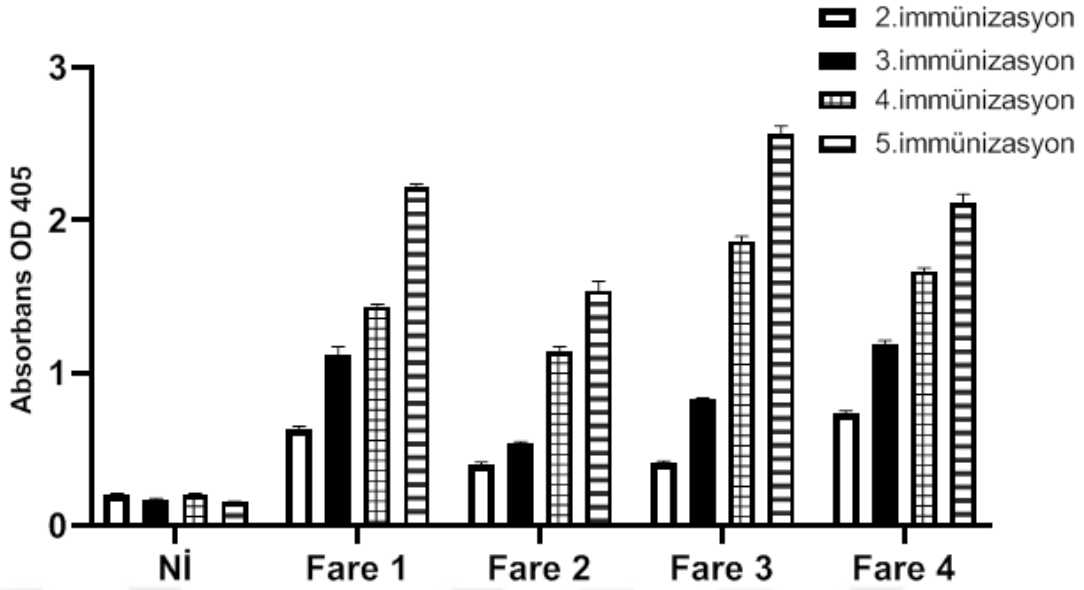
bağışıklanan grupta ise 3 no'lu farenin diğerlerine göre yüksek antikor yanıtı verdiği belirlendi (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.4. P1-BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi



Şekil 4.5. P2-BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi



Şekil 4.6. P3- BSA İle İmmünize Edilen Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, tasarlanan sentetik peptitlerle yapılan bağışıklama çalışmalarında 4. immünizasyon sonrası farelerde yüksek bir antikor titresi geliştiği görüldü. Bu sonuç biyoinformatik araçlarla B hücresi antijenik belirleyicilerine özgü tasarlanan ve BSA ile bağlı formda temin edilen her üç sentetik peptidin de immün sistemi indüklemeye başarılı olduğunu gösterdi.

Çalışmanın devamında immünojen olarak kullanılan sentetik peptitlere karşı diğerlerine göre daha yüksek düzeyde antikor cevabı verdiği belirlenen 3 fare ile başlanarak çok sayıda füzyon çalışması yapıldı. Antikor titreleri yeterli bulunan fareler füzyon öncesi son kez intravenöz olacak şekilde hatırlatma dozuna tabii tutuldu. Hatırlatma işlemi adjuvansız ve normalde kullanılan antijen miktarının yarısı kullanılarak gerçekleştirildi. Her üç grupta da, peptitlere karşı bağışıklanan fare serumlarının toksin standardına karşı yanıtları dolaylı ELİSA ile kontrol edildiğinde 405nm’de absorbans değerlerinin 0,7’den büyük olduğu görüldü (standart olarak low std kullanılmış,  $1/10^{-4}$  olarak dilüe edilmiştir, kullanılan fare serumları  $1/10^{-3}$  dilüe edilmiştir). Bu sebeple her üç grupta da farelerin büyük çoğunluğu sırasıyla füzyon işlemine alındı. Gerçekleştirilen füzyonların detayları Tablo 4.4’de sunulmaktadır.

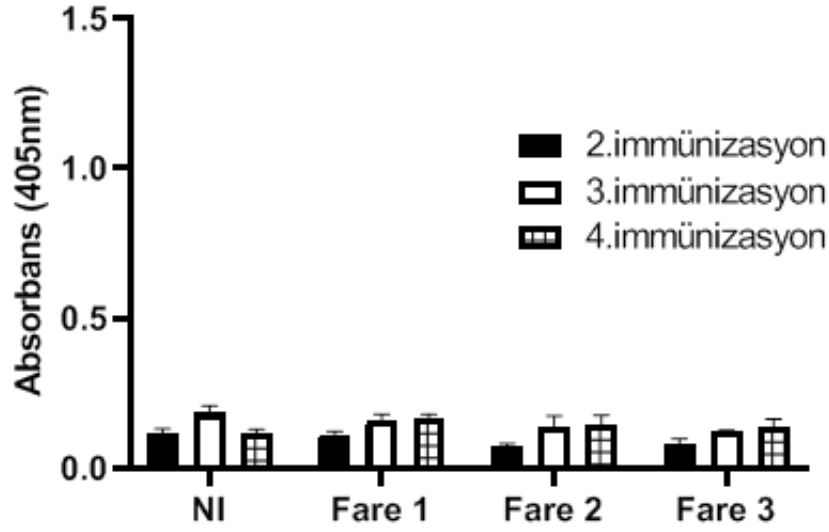
Füzyon çalışmalarının bir kısmında hibrit oluşumunda sıkıntılar yaşansa da çoğunlukla çok sayıda hibrit hücre elde edildi. Bununla birlikte söz konusu hibrit hücrelerin tek düşürme (klonlama) ve çoğaltma çalışmaları devam ederken eş zamanlı olarak hibrit hücrelerin üst sıvıları kullanılarak antikorlarının BoNT A standartları ile dolaylı ELISA testleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre tez çalışmaları kapsamında yapılan füzyon işlemlerinden toksin standartları ile etkileşim veren bir hibrit elde edilemedi.

**Tablo 4.4.** Peptitlerle Bağışıklanan Farelerle Gerçekleştirilen Füzyonların İncelenmesi

Antijen	Fare	Füzyon			Taramalar		
		Dalak Hücre Sayısı	F <sub>0</sub> Sayısı	F <sub>0</sub> /Dalak Hücre Oran	Hibrit Sayısı	Aktif Hücre Sayısı	mAb Üreten Hücre Sayısı
P1	1	470x10 <sup>6</sup>	120x10 <sup>6</sup>	1:3	253	47	Hibritler standardı tanımadı. Füzyon Sonlandırıldı
P1	2	420x10 <sup>6</sup>	140x10 <sup>6</sup>	1:3	421	10	
P1	3	375x10 <sup>6</sup>	125x10 <sup>6</sup>	1:3	383	22	
P1	4	450x10 <sup>6</sup>	150x10 <sup>6</sup>	1:3	345	34	
P2	1	475x10 <sup>6</sup>	120x10 <sup>6</sup>	1:3	367	31	
P2	3	375x10 <sup>6</sup>	125x10 <sup>6</sup>	1:3	557	25	
P3	1	480x10 <sup>6</sup>	160x10 <sup>6</sup>	1:3	478	17	
P3	2	380x10 <sup>6</sup>	130x10 <sup>6</sup>	1:3	356	28	
P3	3	255x10 <sup>6</sup>	70x10 <sup>6</sup>	1:3	417	23	
P3	4	375x10 <sup>6</sup>	125x10 <sup>6</sup>	1:3	298	38	

#### 4.1.3. BoNT A Hafif Zincire Spesifik Antikor Üretim Çalışmaları

Tez kapsamında sentetik peptitlere alternatif olarak Novus Marka 4489-ZN-010 katalog numaralı rekombinant nörotoksin hafif zinciri de fare immünizasyonlarında antijen olarak kullanıldı. 3 adet fare 4 kere 2 haftalık aralıklarla fare başına 1,5 µg olmak üzere immünizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Alınan serumlar antikor yanıtına dolaylı ELİSA ile değerlendirildiğinde farelerde yanıt oluşmadığı görüldü (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** BoNT A Rekombinant Hafif Zincir ile Bağışıklanan Farelerde Antikor Oluşumunun İzlenmesi

## 4.2. Toksin Yapısının İncelenmesi

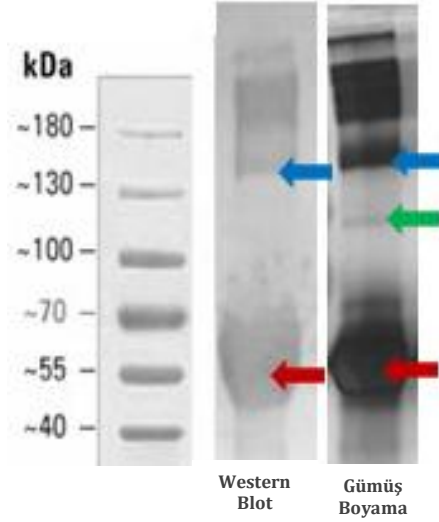
### 4.2.1. BoNT A Standardı İle Yapılan Çalışmalar

Özellikleri Tablo 4.5’de verilen BoNT A standartları HSGM’den liyofilize halde temin edildi.

**Tablo 4.5.** HSGM’den Temin Edilen Toksin Standartları

Standart Adı	Konsantrasyon	Lot
Low Std BONT A	0,81 ng/μl	110221-41074
Med Std BONT A	4,4 ng/μl	110220-41078

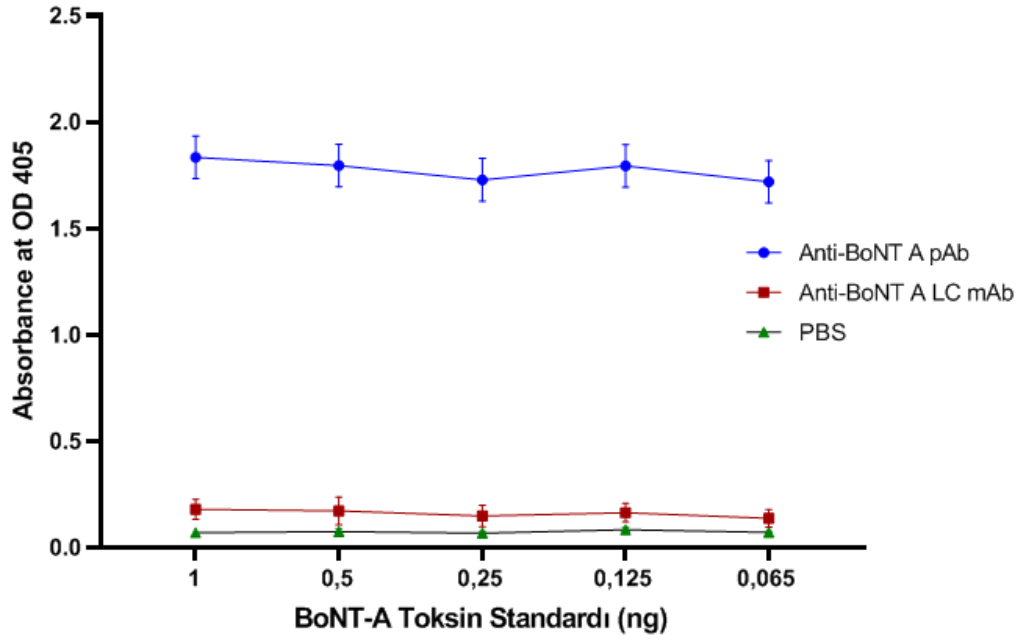
Low Std BoNT A, gümüş boyama ve western blotlama ile gösterimi sağlandı (Şekil 4.8). İlk olarak 10 ng BoNT A, 1 mM DTT varlığında 95°C’de 10 dakika denatüre edildi, %10 SDS jel içinde yürütüldü ve gümüş boyama (Şerit 3) ile gösterildi. Daha sonra, 0,8 ng BoNT A 1 mM DTT varlığında 95°C’de 10 dakika denatüre edildi, %10 SDS jelde yürütüldü ve PVDF membrana aktarılarak ve anti-Tavşan pAb (1/500) ile bekletildi. Gümüş boyama ile toksinin gösterimi sağlanırken, Western Blotlama ile de ticari bir antikora (anti-BoNT poliklonal antikorun) bağlanabildiği kanıtlandı.



**Şekil 4.8.** SDS-PAGE'i takiben Western blotlama yoluyla antikor bağlanması: SDS-PAGE'i takiben Western blotlama ile antikor bağlanması. 1. şerit; İşaretleyici. 2. şerit; 0,8 ng BoNT A, 1 mM DTT varlığında %10 SDS-jelleri üzerinde elektroforezlendi ve 1/500 TBS seyreltilmiş anti-BoNT A tavşan pAb ile membran problandı. 3. şerit; Gümüş boyama ile tespit edilen 10 ng BoNT A. Kırmızı, yeşil ve mavi oklar sırasıyla 50 kDa BoNT A (LC), 100 kDa BoNT A (HC), 150 kDa holotoksin'i temsil eder.

#### 4.2.2. Ticari Antikorların Toksin Standardı ile Etkileşimi

Ticari antikorların toksin standartları ile etkileşiminin değerlendirilmesi için dolaylı ELİSA yapıldı. Yalnızca Low std kullanılarak yapılan çalışmada, toksin standardı 15 kat seyreltilmiş olmasına rağmen Anti-BoNT pAb antikoruna karşı 405 nm'de alınan absorbans değerinde (ortalama olarak 1,8) ciddi bir değişiklik görülmedi ve standardın daha fazla seyreltilerek çalışmanın tekrarlanmasına karar verildi. Öte yandan çalışmada ticari Anti-BoNT LC monoklonal antikorunun toksin standardı ile etkileşime girmediği gözlemlendi. Ticari Anti-BoNT LC mAb'ın rekombinant hafif zincire karşı yapılmış monoklonal bir antikor olması sebebiyle rekombinant formda bağlandığı epitopun toksin standardının doğal yapılı formunda yüzeyde bulunmayabileceği değerlendirildi (Şekil 4.9).

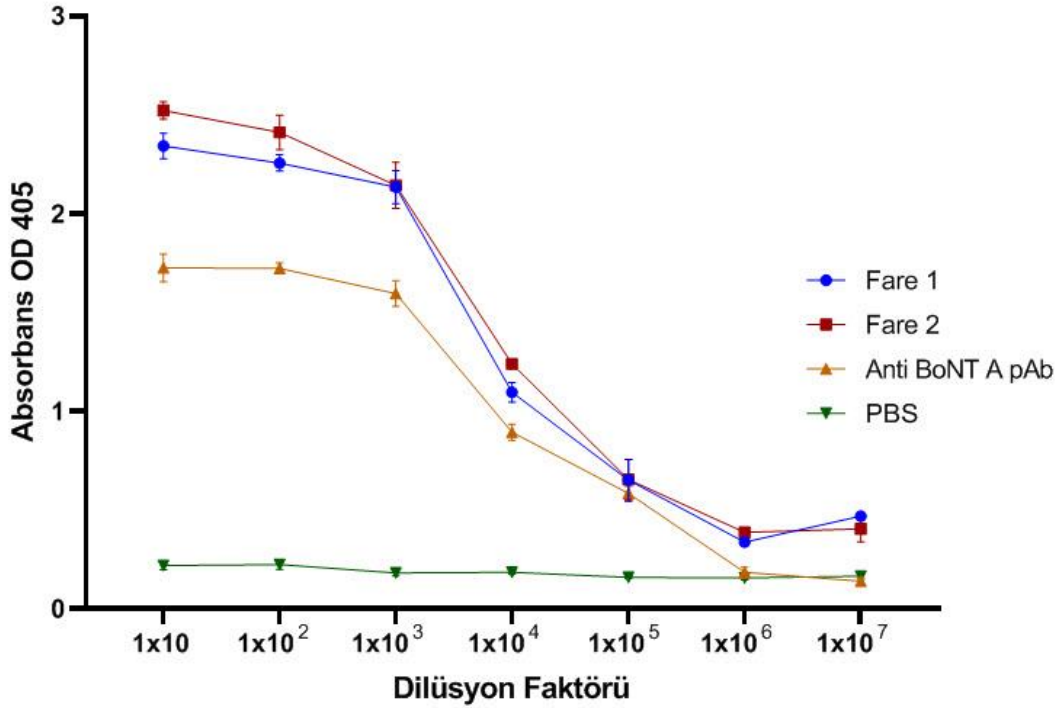


Şekil 4.9. Toksin Standardının Ticari Antikorlar ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi

BoNT A epitopik bölgelerine karşı üretilen anti-peptit antikorlarının ve ticari pAb'ın, doğal yapılı BoNT A ile hangi konsantrasyonda etkileşim gösterdiğinin incelenmesi amacıyla BoNT A konsantrasyonunun fare serumlarına karşı titre edildiği ELISA protokolü uygulandı. BoNT A Low std (0,81 ng/μl)  $1 \times 10^{-1}$  ve  $1 \times 10^{-7}$  arasında seyreltildi ve 7 farklı konsantrasyonda ELISA plağına kaplama yapıldı ve P2-BSA ile bağışıklanan farelerden rasgele seçilen 1 ve 2 no'lu farelerin 5. immünizasyon sonrasında alınan serumları  $1/10^3$  olarak seyreltildi ve Anti-BoNT A pAb ticari antikoru 400 ng olacak şekilde kuyulara eklendi (Tablo 4.6). Şekil 4.10'da verilen grafikte fare serumlarının ve ticari poliklonal antikoru ELISA testi sonucu standart toksine karşı verdiği antikor yanıtları görülmektedir.

Tablo 4.6. BoNT A Low Std'nin Fare Serumları ve anti-BoNT A pAb ile Yapılan ELISA Analizi

		Fare 1 Serumu			Fare 2 Serumu			Anti BoNT A pAb			PBS		
BoNT A (0,81 ng/μl) Seri Dilüsyonu	$1 \times 10^1$	2,416	2,317	2,295	2,55	2,471	2,546	1,794	1,754	1,768	0,244	0,211	0,201
	$1 \times 10^2$	2,289	2,21	2,27	2,43	2,316	2,486	1,718	1,752	1,745	0,251	0,213	0,206
	$1 \times 10^3$	2,118	2,061	2,226	2,185	2,234	2,012	1,643	1,621	1,522	0,193	0,165	0,186
	$1 \times 10^4$	1,115	1,04	1,134	1,235	1,265	1,221	0,941	0,923	0,912	0,177	0,194	0,182
	$1 \times 10^5$	0,75	0,54	0,664	0,738	0,54	0,684	0,621	0,548	0,584	0,158	0,167	0,154
	$1 \times 10^6$	0,331	0,339	0,342	0,382	0,391	0,386	0,211	0,198	0,184	0,154	0,167	0,148
	$1 \times 10^7$	0,484	0,453	0,468	0,48	0,37	0,364	0,154	0,164	0,143	0,152	0,164	0,182



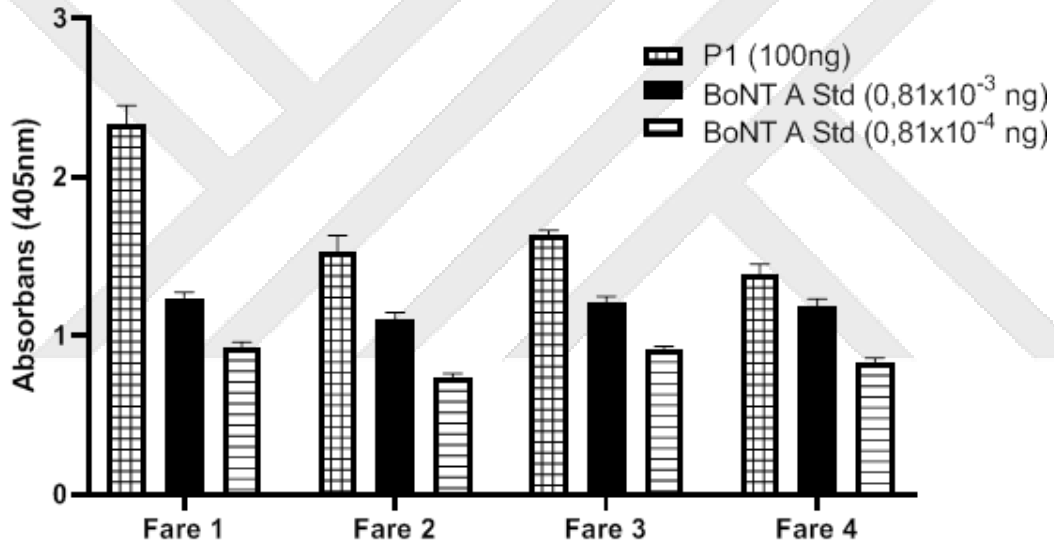
**Şekil 4.10.** P2-BSA ile Bağışıklanan 1 ve 2 No'lu Fare Serumları ile anti-BoNT A pAb'ın Toksin Standardı İle Etkileşiminin Değerlendirilmesi (fare serumları 1/10<sup>-3</sup> olarak seyreltilmiş, pAb 400 ng olarak kullanılmıştır)

Şekil 4.10'da verilen sonuçlar incelendiğinde, 405 nm'de alınan optik yoğunluk (OD) ölçümlerine göre anti-P2 antikorlarının tespit limiti (LOD) 17,06 pg/mL, kantifikasyon limiti (LOQ) 51,71 pg/mL ve grafiğin korelasyon katsayısı (r) 0,57 (orta derecede korelasyon anlamına gelir) olarak hesaplandı (Şekil 4.10). OD 1'in altındaki absorbans değerleri göz ardı edildiğinde, peptidlere karşı bağışıklanan farelerin serumunda geliştirilen antikorların, 0,81x10<sup>-4</sup> ng/µl yoğunluğunda BoNT A standardı ile etkileşim gösterdiği bulundu. Konsantrasyonu 0,81 ng/µl olarak bilinen BoNT A Low-Std 1x10<sup>3</sup> kat seyreltilene kadar fare serumlarının absorbans ölçümlerinin birbirlerine yakın olduğu, 1x10<sup>3</sup> kat seyreltme sonrasında ise absorbans değerlerinin düşmeye başladığı gözlemlendi. Bu sonuç, ELISA plağına yapılan kaplama için 1/10<sup>3</sup> oranında seyreltmenin yeterli olduğunu, bundan daha az seyreltilmiş konsantrasyonlarda ise yüzeye yapılan antijen kaplama miktarında doygunluk gerçekleştiği için doğru sonuçlar alınamayacağını göstermektedir. Öte yandan standardın 1/10<sup>3</sup> dilüsyonunda fare serumları ile etkileşimi incelendiğinde toksinin 0,81x10<sup>-3</sup> ng kadar az bir miktarının bile fare serumları ile etkileşim gösterdiği bulundu. Böylelikle toksin standardı ile fare serumlarının pg seviyelerinde etkileşiminin gösterimi sağlandı. Buna ek olarak fare serumları ve ticari pAb'ın BoNT A standardı etkileşimleri ayrı ayrı incelendiğinde ve absorbans değerleri kıyaslandığında fare serumları ile BoNT standardı arasındaki etkileşiminin absorbans değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Ticari antikorun konsantrasyonunun bilinmesi ve 400 ng olarak ELISA kuyularına

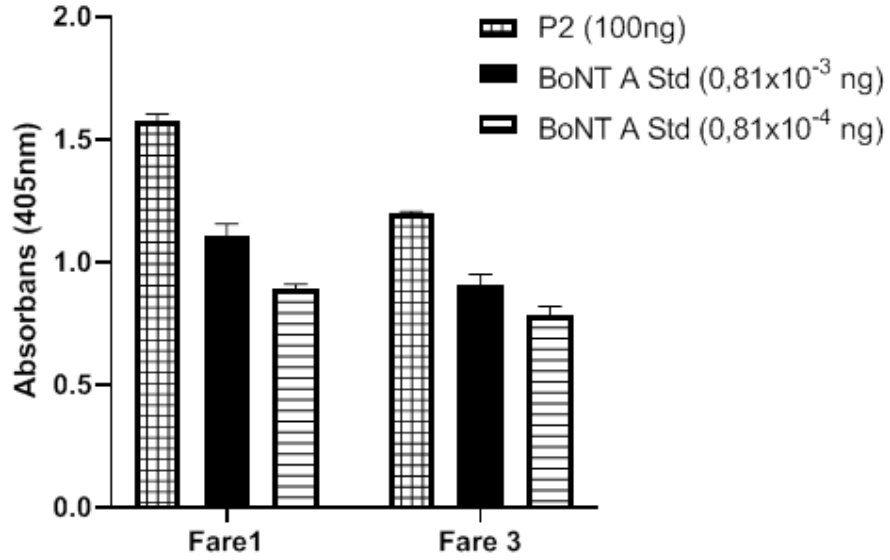


yüklenmesi, fare serumlarının ise konsantrasyondan bağımsız olarak 1/1000 olarak seyreltilerek kullanılması doğru bir karşılaştırma yapılmasına mani olsa da fare serumların tavşan orijinli ticari poliklonale göre saf olmaması bağlanma potansiyelinin daha yüksek olduğuna işaret etmektedir.

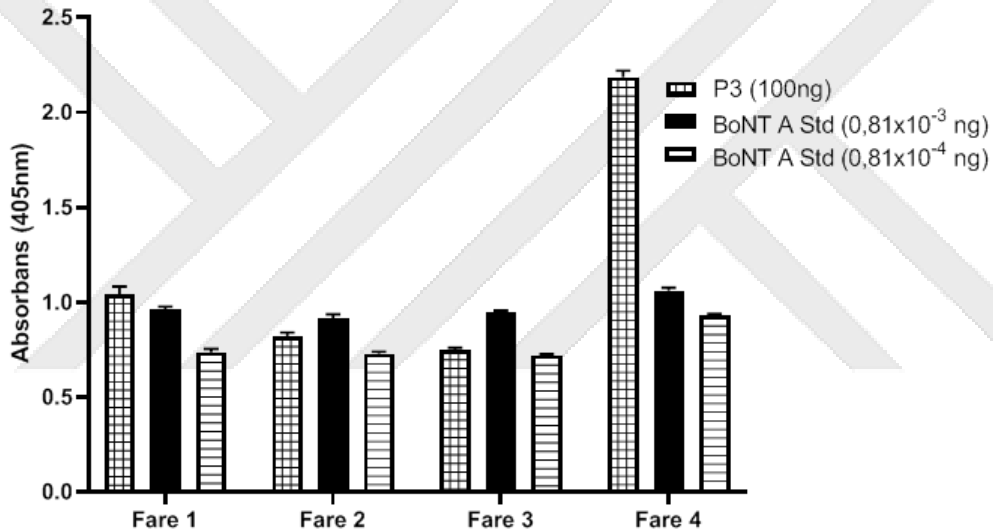
Fare serumunun toksin ile etkileşim yaptığı konsantrasyon aralığının belirlenmesine müteakip, P1-BSA, P2-BSA ve P3-BSA'ya karşı geliştirilen antikor yanıtını değerlendirmek amacıyla ELISA yapıldı (Şekil 5). P1, P2 ve P3 ile bağışıklanan farelerin 5. immünizasyon serumu 1/1000 oranında seyreltildi ve sırasıyla  $0,81 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  BoNT A,  $0,81 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$  BoNT A, 100 ng KLH ile bağlı peptit ve PBS ile kaplanmış ELISA plakalarına ilave edildi. P1, P2 ve P3 kullanılarak oluşturulan anti-peptit antikorlarının, hem KLH'a bağlı peptitlerle hem de doğal yapılı BoNT A ile etkileşime girdiği Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilen grafiklerde gösterildi.



**Şekil 4.11.** P1-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10<sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır)



**Şekil 4.12.** P2-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10<sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır)



**Şekil 4.13.** P3-BSA ile bağışıklanan fare serumlarının standart toksin ile etkileşimi (serumlar 1/10<sup>3</sup> oranında seyreltilerek kullanılmıştır)

Grafiklerden de anlaşılacağı üzere, anti peptit antikorlarının toksin standardı ile etkileşimi incelendiğinde absorbans değerlerinin peptitlerin kendileri ile etkileşiminin absorbans değerlerine genel olarak yakın olduğu gözlemlendi. P1-BSA ile bağışıklanan fare grubunda 1 nolu fare ve P3-BSA ile bağışıklanan farelerden 4 nolu farenin peptit ile etkileşiminin absorbans değeri, toksinle etkileşiminin absorbans değerinin yaklaşık olarak 2 katı kadar olsa da hem P1 hem de P3 fare gruplarında peptitlerle bağışıklanan diğer farelerde oluşan antikor yanıtlarının toksin ya da peptitlerle etkileşiminin absorbans ölçümleri değerlendirildiğinde ortalama 0,2 kadar fark olduğu görüldü.

## 5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, bilinen en etkili toksin olan BoNT'un A serotipine karşı antikor geliştirme çalışmalarında sentetik peptitler kullanılarak, peptitlerin immünojen olarak toksinlere karşı antikor üretiminde sağladığı yararların ortaya konulması hedeflendi. BoNT A'ya özgü peptitlere karşı antikorlar oluşturulmasıyla bu antikorların doğal toksine karşı etkileşiminin kabiliyetinin değerlendirilmesi, böylelikle protein yapılı toksinlere karşı antikor geliştirme çalışmalarında kullanılan toksin miktarının azaltılması amaçlandı.

Peptitler, keşfedildiklerinden beri immünolojide antikorların yakın arkadaşı oldular. Peptitler, bir taraftan proteinlerin bileşiminin ve yapısının anlaşılmasını kolaylaştırırken, diğer yandan da B hücresi özgüllüğü, gelişimi, antijen sunumu ve T hücresi özgüllüğü ve gelişimi, dolayısıyla da antikor özgüllüğü ve biyosentezinin moleküler biyolojisini deşifre etmek için önemli bir reaktif oldu. Moleküler biyoloji çalışmalarının önemli birer parçası haline gelen peptitler ve peptitler kullanılarak üretilen peptit antikorları, tıpkı doğal yapılı proteinlere karşı geliştirilen antikorlar gibi teşhis, tespit ve tedavi sistemlerinin önemli birer parçası haline geldiler (Trier, Hansen, ve Houen, 2019).

Geleneksel antikorlar ile peptit antikorları birbirlerinden temel olarak, aşılama için kullanılan immünojen noktasında ayrılır. Peptit antikorları küçük moleküler farklılıklar olsa bile herhangi bir peptide yönlendirilebilir, bu da onları geleneksel antikorların karşısında güçlü bir rakip yapar (Kao ve Hodges, 2009). Buna ek olarak, sentetik peptitler immünojen olarak kullanıldığında, proteinlerin kendilerinin antijen olması durumunda kontrol edilmesi oldukça zor olan post translasyonel modifikasyonlara, korunmuş bölgelere, hücre içi veya ekstra hücre alanlara, bölünme bölgelerine, etiketlere ve özellikli yapılarına yönelik antikor geliştirilmesi mümkün olur (Trier ve Houen, 2017). Skovbjerg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada deamide gliadin peptidine karşı monoklonal peptit antikorları üretmişlerdir. Bu antikor, peptidi yalnızca deamide edildiğinde tanır (Skovbjerg, Koch, Anthonsen, ve Sjöström, 2004). Benzer şekilde Otvos ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise p53'ün birincil fosforilasyonunu analiz ederken, birincil olarak bir mono-fosforile veya fosforile olmayan peptit üzerinde çift fosforile bir peptidi tanıyan bir monoklonal peptit antikorları geliştirmişlerdir (Otvos ve ark., 1998). Daha da önemlisi, peptit immünojenler ile geliştirilen antikorlar, yüksek özgüllüğü olan doğal ve denatüre proteinleri tanıyabilir ve hatta saflaştırılması ve geleneksel antikor üretiminde kullanılması zor olan toksik veya tehlikeli proteinlere yönlendirilebilir (Gant, 2002). Basiri ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (Basiri, Mousavi, Basiri, ve Rasooli, 2010) BoNT serotip A ve E'ye karşı rekombinant aşı geliştirmek amaçlı her iki serotipten antijenik determinantlar içeren bir çoklu antijenik polipeptit (MAP) tasarlanmış ve fare

bağışıklamaları bu çoklu sentetik peptitle yapılmıştır. Geliştirilen anti-MAP fare poliklonal antikolarının BoNT A ve BoNT E holotoksinlerini tanıdığı gösterilmiştir. Öte yandan, Alvarenga ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise immünojen olarak Tityus serrulatus türü akrebin zehirinin ana ölümcül bileşeni olan toksin TsIV'nin tüm amino asit dizilerini kapsayan, sabit boyutta, üst üste binen peptit setleri kullanılmıştır. Böylelikle, akrep toksinlerinin aa dizisinden türetilen peptitler kullanılarak, aynı kökenli zehri nötralize edebilen anti-peptit antikolarının üretilmesi ve anti serumların kolay hazırlanması için alternatif bir strateji sunulmuştur (Alvarenga, Diniz, Ganier, ve Chávez-Olórtegui, 2002).

Özet olarak, peptitlerin immünojen olarak kullanılması durumunda antijenik hedefin iyi tanımlanmış olması avantajı sayesinde, geliştirilen anti-peptit antikoların yüksek özgüllük ve afiniteye sahip olduğu bildirilmiştir. Böylelikle, peptitlerin immünojen olarak kullanılması sadece immünolojik araştırma yaklaşımları için değil aynı zamanda klinik tanılar için de güçlü bir araç haline gelmiştir. Hali hazırda sentetik peptitler kullanılarak üretilen antikolar immün-çökeltme (IP), sandviç deneyler, immün blotlama, immünositokimya ve immünohistokimya (IHC) gibi çeşitli immün analizlerde kullanılmaktadır. Peptit antikoları, teşhis alanında enfeksiyon ve hastalıkların teşhisine yardımcı olmak, kesin miktar tayini yapmak veya belirli bir maddenin varlığını belirlemek veya yerini belirlemek için çeşitli tahlillerde kullanılır (Trier ve ark., 2019).

Tez kapsamında yapılan çalışmalar ile sentetik peptitlerin antikor geliştirmedeki avantajları kullanılarak toksinlere karşı antikor geliştirme çalışmalarında peptitlerin toksinlerin yerine geçebilmesi, böylelikle toksine maruziyetin azaltılması hedeflendi. Yapılan çalışmada hedef molekül olarak BoNT serotip A seçildi. BoNT A'nın her üç etki alanı da immünojenik bölgeler içerdiği bilinmektedir (Vita ve ark., 2019). Bu nedenle, ilk olarak literatürde daha önceden tanımlanmış olan BoNT A'ya özgü B hücresi epitoplari (Zarebski ve ark., 2008) arasından toksinin yüzeyinde bulunan ve birbirine en uzak bölgeler diagnostik epitop bölgesi adayi olarak belirlendi. Sentetik peptitlerin sekanslarının belirlenmesinde B hücre epitoplari seçilmesinin nedeni B hücrelerinin antikor üretiminin ana hücreleri olması, T hücrelerinin ise hücre bazlı toksisite ve kompleman aktivasyonundan sorumlu olmasıdır. Bununla birlikte, B hücresi epitoplari doğrusal ya da konformasyonel (süreksiz) olabilir ve genellikle çoğu antijenik epitop ailesinde konformasyonel epitoplari çoğunluktadır (Ramana ve Mehla, 2020). Tasarlanan peptitlerin doğrusal olması ve proteinin yüzeyinde bulunması ile bu peptitleri kullanarak geliştirilecek olan anti-peptit antikoların toksinin doğal yapıli formuyla etkileşime girme olasılığı artar. Bu sebeple peptit tasarım aşamasında doğrusal B hücre epitoplari aranırken, konformasyonel olanlar göz ardı edildi.

Zarebski ve ark. (Zarebski ve ark., 2008) tarafından listelenen BoNT A'ya ait B hücre epitoplariından seçilen aday sekanslar, İmmün Epitop Veritabanı web sayfasında

bulunan epitop tahmin araçları kullanılarak tasarlanan epitopların dizileri ile karşılaştırıldı ve en muhtemel doğrusal epitop bölgelerine sahip olan adaylar kaydedildi. Seçilen epitopların sekansları, Discovery Studio 4.0 Görüntüleyici ile BoNT A'nın (3BTA, PDB Veri tabanı) kristal yapısı üzerinde görüntülendi. BoNT A hafif zincir (LC) için 45-75 arası, ağır zincir translokasyon bölgesi (H<sub>N</sub>) için 470-495 arası ve ağır zincir reseptör bağlama bölgesi (H<sub>C</sub>) için ise 1230-1242 arası proteinin yüzeyinde en görünür epitoplar olarak bulundu.

Peptit tasarımı yaparken bazı kuralların göz önünde bulundurulması gereklidir. Peptidin uzunluğu, yüksek immünojenisite için çok önemlidir. İmmünizasyon için optimal peptit uzunluğu 10-20 aa olarak kabul edilir; 7 aa'den kısa peptitler bir bağışıklık tepkisini indüklemek için yetersiz kalırken 20 aa'de daha uzun peptitler yeni bir 3D konformasyon benimseyerek bozulmamış proteindeki orijinal konformasyonu yansıtamaz. Optimum uzunluk sınırları içinde olsalar bile, peptitler hala bir taşıyıcı protein olmadan zayıf immünojenlerdir. Bir bağışıklık tepkisini indüklemek için, taşıyıcı proteinler MHC Sınıf II veya T-hücresi reseptör epitopları sağlarken, peptitler B hücresi belirleyicileri olarak hizmet eder (Hancock DC, O'Reilly NJ., 2005).

Peptitlerle taşıyıcı proteinlerin konjugasyonu için de dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Taşıyıcı proteinleri peptitlere bağlamak için serbest amino, karboksilik asit veya sülfhidril gruplarına ihtiyaç vardır. Normalde konjugatlar, peptidin N-terminaline ve C-terminaline veya varsa sistein (C) kalıntılarına eklenebilir. Yan zincirde NH<sub>2</sub> (lizin, asparajin) ve COOH (aspartik asit, glutamik asit) grupları içeren amino asitlerin varlığı veya peptit dizisinde birden fazla C bulunması, rastgele konjugasyon konumuna ve peptidin 3D yapısında bozulmaya neden olabilir (Grant, 2001).

Bu bilgilere dayanarak, öncelikli olarak P1 ve P2 20 aa'dan daha uzun olduğu için daha da kısaltıldılar. Her üç peptit de K, D ve E aa'lerini içerdiklerinden ne N-terminali ne de C-terminali konjugasyonu bu peptitler için uygun görülmedi. P1'in N-terminaline ve P2'nin C-terminaline C kalıntısı eklenerek, peptitlerin 3D yapısını bozmamak için bu peptitlerde C kalıntısı aracılığıyla konjugasyon gerçekleştirildi. Öte yandan P3, C terminaline yakın bir D artığı içerdiğinden, bir C terminal konjugasyonu yapılmasına karar verildi. Bu durumda, konjugenin D'nin yan zincirindeki COOH'ye mi yoksa C terminali COOH'ye mi eklendiğine bakılmaksızın, konjugenin C-terminalinde olması sağlandı ve peptitler Tablo 4.3'te görülen son hallerini aldılar. B, E ve F gibi insanlarda botulizme neden olan diğer Botulinum serotiplerinin (UniProt ID'leri sırasıyla P10844, Q00496, A7GBG3) FASTA'ları incelendiğinde seçilen peptit dizilerini içermediği görüldü. Seçilen peptitler, Gen Script'ten > %85 saflık ile bağlı bir formda (BSA, KLH ve OVA proteinlerine) satın alındı ve BSA'ya konjüge edilenlerle fare bağışıklamaları yapıldı.

Devam eden bağışıklama çalışmaları tasarlanan peptitlerin immün sistemi indükleme noktasında başarılı olduğunu gösterdi. Peptitlerle yapılan bağışıklama sonucu oluşan anti-peptit antikorlarının ise doğal yapılı toksin ile piko gram seviyelerinde etkileşime girdiği bulundu. Buna ek olarak, geliştirilen fare poliklonal ile ticari tavşan poliklonal kıyaslandığında, fare poliklonal antikorların daha başarılı olduğu görüldü. Böylelikle hem ilk kez BoNT A'ya özđü peptitlere karşı üretilen antikorların doğal yapılı toksin ile yüksek afinite ile bağlamasının mümkün olduğu hem de söz konusu etkileşimin mevcut ticari antikorlara kıyasla daha güçlü olduğu gösterildi.

Daha önce farklı gruplar tarafından BoNT A'ya karşı yüksek afiniteli mAb'lar ve pAb'lar geliştirilmiştir. Ancak bunların çoğu, BoNT'un holotoksin formu, toksoide dönüştürülmüş hali veya bir rekombinant formu immünojen olarak kullanılarak elde edilen antikorlardır (Chiao, Wey, Shyu, ve Tang, 2008; Sharma, Ferreira, Eblen, ve Whiting, 2006; Stanker ve ark., 2008). Sharma ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada BoNT serotip A, B, E ve F nörotoksin kompleksleri saf halde immünojen olarak kullanılmış ve tavşan, at ve keçide poliklonal antikorlar geliştirilmiştir. Geliştirilen antikorların DIG ile işaretleterek hassasiyetlerinin artırıldığı bir ELISA testinin tasarlandığı çalışmada BoNT A için 60 pg/ml, BoNT B için 176 pg/ml, BoNT E için 163 pg/ml ve BoNT/F için 117 pg/ml hassasiyet saptanmıştır (Sharma ve ark., 2006). Öte yandan Stanker ve arkadaşları BoNT A'nın toksoid halini kullanarak 4 adet yüksek afiniteli monoklonal antikor geliştirmiş ve 2 pg/ml toksin yakalama hassasiyetine ulaşmıştır. Bu çalışmaların yanısıra diagnostik amaçlı olmasa da Basiri ve arkadaşları tarafından (Basiri ve ark., 2010) peptit immünojenler kullanılarak BoNT A ve E'ye karşı antikorlar geliştirilmiştir. Söz konusu çalışmada BoNT serotip A ve E'ye özđü antijenik determinantlar içeren bir çoklu antijenik polipeptit (MAP) ile fare poliklonal geliştirilerek her iki holotoksinle de etkileşimi gösterilmiş ancak hazırlanan anti-MAP antikorlarının toksinlere karşı aviditesi MAP için olandan önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ışığında, tez kapsamında diagnostik amaçlı sentetik peptitler kullanılarak geliştirilen anti-BoNT A fare poliklonal antikorlarının ilk defa doğal yapılı toksin ile pg seviyelerinde etkileşim gösterdiği ve ticari tavşan poliklonal antikorlardan daha başarılı olduğu bulunmuştur. Sentetik peptitler immünojen olarak kullanıldıklarında immünizasyonlar tek çeşit peptit ile gerçekleştirildiğinde elde edilen poliklonal anti serumun genellikle bir monoklonal antikor kadar spesifik olduğu bildirilmiştir. Örnek olarak, Lagatie ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada polyomavirüse karşı tek tip sentetik peptitle immünizasyon yapılarak hiper immün serum geliştirilmiştir (Lagatie, Tritsmans, ve Stuyver, 2015). Tez kapsamında her üç peptide karşı geliştirilen fare poliklonal antikorların pg seviyelerinde hassasiyet göstermelerinin seçilen her üç peptidin de bağışıklama çalışmalarında ayrı ayrı kullanılması ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Sentetik peptitler, çoğu durumda çözelti içinde rastgele bir yapıya sahip olan doğrusal amino asit dizileridir. Anti-peptit antikorları üretmek zor olmasa da, antikorların peptitte bulunan aynı aa dizisini içeren bir proteini tanıması zorunlu değildir. Bunun gerçekleşmesi için, proteindeki aminoasitlerin, sentetik peptitte bulunana benzer bir şekilde antikora yönlendirilmesi gerekir. Bu genellikle proteinin üç temel özelliğini gerektirir; sekansın çözücüye maruz bırakılması, dizinin sürekli bir amino asit dizisi olması ve antikor popülasyonu tarafından tanınmaz hale getiren daha yüksek sıralı bir yapıya sahip olmamasıdır (Gant, 2002). Bu şartlara ek olarak, sentetik peptitlerle yapılan bağışıklama çalışmalarının mAb'dan ziyade pAb geliştirmeye daha uygun olduğu da bildirilmiştir. Aslında sentetik peptitler, taşıyıcı proteinlerle birlikte antijen olarak sunulduğunda bazı problemler ortaya çıkarır. Özellikle bu tür antijenlerle monoklonal antikorların geliştirilmesi istendiğinde, taşıyıcı proteine karşı antikor tepkisi daha zayıf anti-peptit tepkisini maskeleyebilir, bu da çok az sayıda peptide özgü hibridomaların gelişmesine ve hatta kaybına neden olabilir. Ne kadar titizlikle seçilmiş olsa da peptitlerin asıl protein ile etkileşime girecek antikor yanıtı oluşturmada başarısı %50 olarak kabul edilmiştir (Hancock ve O'Reilly, 2005). Öte yandan kullanılacak peptit sayısı, peptitlerin sekansları, doğal yapılı proteinin ikincil yapısının doğruluğu gibi faktörler sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılmasındaki başarısını etkilemektedir. Sonuç olarak tüm tasarlanan peptitler immünojenik olabilirler ancak doğal yapılı proteinle çapraz reaksiyon verecek antikorların üretilmesini indükleyecek peptitlerin tasarlanması zordur.

Burada açıklanan bilgiler ışığında, tez kapsamında fare pAb geliştirilmesinin başarısının yanı sıra neden mAb geliştirilemediğinin sebepleri de açıkça görülmektedir. Elde edilen sonuçlarla beraber, tehlikeli patojenlere (virüsler ve viral proteinler) veya toksik maddelere karşı antikor geliştirme çalışmalarında sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılmasının hem kurban edilen deney hayvanlarının sayısının azalmasını hem de laboratuvar personeli tarafından toksin maruziyet risklerinin bertaraf edilmesini sağlayacağı ortaya çıkmıştır.

### **5.1. Sınırlılıklar**

Tez çalışması kapsamında karşılaşılan en temel sınırlılık proje iç dinamikleridir. Söz konusu çalışma "TÜBİTAK 1009 Tavşan Serum Projesi" alt iş paketi olarak yürütülmüştür. Alt iş paketi kapsamında ilk olarak sentetik peptitler kullanılarak mAb geliştirilmesi hedeflenmiş ancak toksin teminindeki uluslararası yönetmelik ve kısıtlamalar sebebiyle çalışmanın asıl projeden çıkarılması sebebiyle elde kaynaklarla çalışmanın tamamlanması gerekmiştir. Projenin alt iş paketi olduğu 1009 projesinden çıkarılması neticesinde b planı devreye sokulamamış ve fare poliklonal yerine tasarlanan peptitlerle tavşan poliklonal antikor geliştirilmesi mümkün olamamıştır. Çalışma tavşan poliklonal

antikorların geliştirilmesi ve bu antikorların ticari muadillerine göre doğal yapılı BoNT A formu ile daha etkin şekilde etkileşime girdiği deneysel olarak gösterildiğinde daha güçlü hale gelecektir. Buna ek olarak ajan teminindeki güçlüklerin aşılması ve geliştirilen antikorların BoNT'un diğer serotipleri ile çapraz reaksiyon verip vermediğinin deneysel olarak gösteriminin sağlanması da çalışmada geliştirilen antikorların seçicilik noktasında başarısını artıracaktır.





## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, doğada bilinen en güçlü toksin olan Botulinum Nörotoksin A'ya karşı fare poliklonal antikorları geliştirilmiştir. CDC tarafından biyolojik ajanlar listesinde A kategorisinde sınıflandırılan BoNT A, yüksek toksisitesi nedeniyle hem laboratuvar analizleri hem de antikor geliştirme çalışmaları için zorlu bir moleküldür (Hancock ve O'Reilly, 2005). Anti-BoNT antikorlarının geliştirilmesi, bakterilerden toksin üretimi ve toksinin toksoidlere dönüştürülmesi gibi zaman alıcı ve zorlu aşamaları içerir (Keller, 2008). Bu çalışma kapsamında antijen olarak, doğal sağlam BoNT A'nın kendisi yerine 150 kDa proteininin yüzeyindeki immünojenik bölgelere spesifik olarak seçilmiş sentetik peptitler kullanıldı. Farelerde üç farklı peptide karşı üretilen antikorların pg seviyelerinde doğal BoNT A toksini ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Toksinlerin elde edilme ve manipülasyon güçlüğü, ciddi bir altyapı laboratuvarı gerektirmesi (BSL-3 gibi) ve bu çalışmalarda birçok deney hayvanının kullanılmasına neden olma gibi konular göz önünde bulundurulduğunda, tasarlanan peptitlerin kullanımı değerlendirilmiştir. Sadece BoNT serotipleri için değil, diğer tüm toksik moleküller için de bu şekilde biyoinformatik araçların kullanılması, teşhis testleri ve diğer Ar-Ge çalışmaları için büyük bir kolaylık olacaktır. Bu şekilde antikor geliştirilerek, toksik antijenlere karşı hızlı tanıma kitleri üretilir. Ek olarak, bu çalışmada üretilen poliklonal antikorlar gelecekteki çalışmalar için bir temel oluşturacak ve daha spesifik tanıma için monoklonal antikor üretimini teşvik edecektir.

Sonuç olarak, bu çalışma, sentetik peptitlerin, yüksek afiniteli antikorlar geliştirmek için en azından doğal toksin veya toksoidin kendisi kadar etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sonuçlarımız, bir fare modelinde, kısa sentetik peptitlerin immünojen olarak kullanılmasının, toksin tedariki ve bununla başa çıkma zorlukları göz önüne alındığında daha uygun olduğunu göstermektedir. Ek olarak, botulizm teşhisinin olabildiğince çabuk yapılması gerektiği ve teşhis sırasında birçok test hayvanının öldürüldüğü göz önüne alındığında, söz konusu tez çalışması, hem kurban edilen test hayvanı sayısını hem de kullanılan toksin miktarını dolayısıyla laboratuvar personeli tarafından toksine maruz kalınan sürenin azaltılması hususlarında sentetik peptit immünojenlerine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- Alvarenga, L. M., Diniz, C. R., Ganier, C., ve Chávez-Olórtegui, C. (2002). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*, 40(1), 89-95. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00197-0
- Angeletti, R. H. (1999). Design of useful peptide antigens. *J Biomol Tech*, 10(1), 2-10.
- Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., ... Tonat, K. (2001). Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *Jama*, 285(8), 1059-70. doi: 10.1001/jama.285.8.109
- Banada, P. P., ve Bhunia, A. K. (2008). Antibodies and Immunoassays for Detection of Bacterial Pathogens. In M. Zourob, S. Elwary, ve A. P. Turner, *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. New York, NY: Springer.
- Basiri, M., Mousavi, S. L., Basiri, H., ve Rasooli, I. (2010). An epitopic approach to designing and characterization of a multiple antigenic polypeptide against Botulinum neurotoxins A and E. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9), 1659-16. doi: 10.1007/s11274-010-0343-5
- Bigalke, H., ve Rummel, A. (2005). Medical aspects of toxin weapons. *Toxicology*, 30; 214(3): 210-20. 1 3. doi: 10.1016/j.tox.2005.06.015
- Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., ... Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 365(6442), 160-163. doi: 10.1038/365160a0
- Bodanszky, M. (1988). *Peptide Chemistry: A Practical Approach*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bozheyev, G., Kunakbayev, Y., ve Yeleukenov, D. (1999). *Former soviet biological weapons facilities in Kazakhstan: past, present, and future..* Monterey, Calif: Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies.
- Brin, M. F. (1997). Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl*, 6, 46-68.
- Brunt, J., Webb, M. D., ve Peck, M. W. (2010). Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins and *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol*, 76(13), 4143-4150. doi: 10.1128/aem.03059-09
- Cai, H., Reinisch, K., ve Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12(5), 671-82. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.005
- Capek, P., ve Dickerson, T. J. (2010). Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins (Basel)*, 2(1), 24-53. doi: 10.3390/toxins2010093
- Carter, J. M. (1994). Techniques for Conjugation of Synthetic Peptides to Carrier Molecules. B. M. Dunn içinde, *Peptide Analysis Protocols. Methods In Molecular Biology* (Cilt 36). Humana Press. doi: 10.1385/0-89603-274-4: 155
- Centers for Disease Control and Prevention. (1998). *Botulism in the United States, 1899-1998. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from <https://www.cdc.gov/botulism/pdf/bot-manual.pdf>
- Chan, W. C., ve White, P. D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.

- Chao, H. Y., Wang, Y. C., Tang, S. S., ve Liu, H. W. (2004). A highly sensitive immunopolymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon*, 43(1), 27-34. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.10.013
- Cheng, L., Land, K., ve Stanker, L. (2012). Current Methods for Detecting the Presence of Botulinum Neurotoxins in Food and Other Biological Samples. In S. Morse, *Bioterrorism*. doi: 10.5772/32953
- Chiao, D. J., Wey, J. J., Shyu, R. H., ve Tang, S. S. (2008). Monoclonal antibody-based lateral flow assay for detection of botulinum neurotoxin type a. *Hybridoma (Larchmt)*, 27(1), 31-35. doi: 10.1089/hyb.2007.0550
- Ching, K. H., Lin, A., McGarvey, J. A., Stanker, L. H., ve Hnasko, R. (2012). Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip. *Jour. of Imm. Methods*, 380(1-2), 23–29. doi: doi: 10.1016/j.jim.2012.03.008
- Chou, P. Y., ve Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.Relat. Areas Mol. Biol.*, 47, 45–158. doi: 10.1002/9780470122921.ch2
- Citterio, B., Manzano, M., Mifreni, M., ve Comi, G. (1992). Natural fish and shellfish poisons. *Ann Microbiol Enzimol*, 42, 203-16.
- Couesnon, A., Pereira, Y., ve Popoff, M. R. (2008). Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. 2008. *Cell Microbiol.*, 10(2), 375–387. doi: 10.1111/j.1462-822.2007.01051.x
- De Jong, M., Verwijnen, S. M., De Visser, M., Kwekkeboom, D. J., Valkema, R., ve Krenning, E. P. (2008). Peptides for Radionuclide Therapy. In *Targeted Radionuclide Tumor Therapy* (pp. 117-144). Springer.
- Demarchi, J., Mourgues, C., Orio, J., ve Prevot, A. R. (1958). Existence du botulisme de type D. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 142(21-22), 580-582.
- Demirev, P. A., ve Fenselau, C. (2008). Mass spectrometry in biodefense. *J Mass Spectrom*, 43(11), 1441-1457. doi: 10.1002/jms.1474
- Detrick, F. (n.d.). Biological Toxins. In R. G. Darling, *USAMRIID's Medical Management of Biological Causalties Handbook* (5 ed., pp. 80-100). Department of Defense. Retrieved from <http://www.operationalmedicine.org/Library/VNH%20Textbooks/USAMRIID%20Blue%20Book%205th%20Edition.pdf>
- Diaz-Amigo, C. (2009). Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice. In I. B. (Ed.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists* (pp. 221-245). New Jersey, USA: John Wiley ve Sons.
- Diaz-Amigo, C. (2010). Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice. In B. Popping, C. Diaz-Amigo, ve B. Hoenicke, *Molecular Biological And Immunological Techniques And Applications For Food Chemists* (pp. 223-45). New Jersey, USA: John Wiley ve Sons.
- Dolly, J. O., ve Aoki, K. R. (2006). The structure and mode of action of different botulinum toxins. *Eur J Neurol*, 13 Suppl 4, 1–9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01648.x
- Dolly, O. (2003). Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. *Headache*, 43 Suppl 1, 16-24. doi: 10.1046/j.1526-4610.43.7s.4.x
- Dorner, B. G., Zeleny, R., Harju, K., Hennekinne, J. A., Vanninen, P., Schimmel, H., ve Rummel, A. (2016). Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 89-102. doi: 10.1016/j.trac.2016.05.024

- Dressler, D. (2008). Botulinum toxin drugs: future developments. *J Neural Transm (Vienna)*, 115(4), 575–577. doi: 10.1007/s00702-007-0863-9
- Duracova, M., Klimentova, J., Fucikova, A., ve Dresler, J. (2018). Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins (Basel)*, 99, 10(3). doi: 10.3390/toxins10030099
- Duriez, E., Armengaud, J., Fenaille, F., ve Ezan, E. (2016). Mass spectrometry for the detection of bioterrorism agents: from environmental to clinical applications. *J Mass Spectrom.*, 51(3), 183-199. doi: 10.1002/jms.3747
- Elias, M., Al-Saleem, F., Ancharski, D. M., Singh, A., Nasser, Z., Olson, R. M., ve Simpson, L. L. (2010). Evidence That Botulinum Toxin Receptors on Epithelial Cells and Neuronal Cells Are Not Identical: Implications for Development of a Non-Neurotropic Vaccine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 605–612, 336(3). doi: 10.1124/jpet.110.175018
- Engvall, E. (1980). Enzyme immunassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol*, 70(A), 419-39. doi: 10.1016/s0076-6879(80)70067-8
- Fernandes, A. R., Oliveira, A., Pereira, J., ve Coelho, P. S. (2017). Nuclear medicine and drug delivery. In S. Maiti, ve K. K. Sen, *Advanced Technology for Delivering Therapeutics*. London: InTech. doi: 10.5772/65708
- Fischer, A., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I., Lou, J., Marks, J. D., Nakagawa, T., ve Montal, M. (2008). Molecular architecture of botulinum neurotoxin E revealed by single particle electron microscopy. *J. Biol. Chem.*, 283, 3997–4003. doi: 10.1074/jbc.M707917200
- Fosgerau, K., ve Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122–128. doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003
- Franz, D. R., Jahrling, P. B., McClain, D. J., Hoover, D. L., Byrne, W. R., Pavlin, J. A., ... Eitzen, E. M. (2001). Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Clin Lab Med*, 21(3), 435-73. doi: 10.1001/jama.278.5.399
- Freund, J. (1956). The mode of action of immunol adjuvants. *AdvTubercRes*, 7, 130-148.
- Freund, J., ve McDermott, D. (1942). Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 49, 548-553.
- Freund, J., Casals, J., ve Hosmer, E. P. (1937). Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med*, 37, 509-513.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., ve Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods of predicting the secondary structure of globular proteins. 120, 97–120. *J Mol Biol*, 120(1), 97-120. doi: 10.1016/0022-2836(78)90297-8
- Gant, G. A. (2001). Synthetic Peptides for Production of Antibodies that Recognize Intact Proteins. In J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, ve P. T. Wingfield, *Current Protocols in Protein Science*. doi: 10.1002/0471140864.ps1803s28
- Gate, J. W., Ozanich, R. M., Warner, M. G., Bruckner-Lea, C. J., ve Marks, J. D. (2010). Advances in assays and analytical approaches for botulinum-toxin detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(10), 1137-1156. doi: 10.1016/j.trac.2010.07.005
- Gu, S., Rumpel, S., Zhou, J., Strotmeier, J., Bigalke, H., Perry, K., ... Jin, R. (2012). Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science*, 335(6071), 977-981. doi: 10.1126/science.1214270
- Hakami, R. M., Ruthel, G., Stahl, A. M., ve Bavari, S. (2010). Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. *Trends Microbiol*, 18(4), 164–172. doi: 10.1016/j.tim.2010.02.001

- Hancock DC, O'Reilly NJ. (2005). Synthetic Peptides as Antigens for Antibody Production. *Methods Mol Biol*, 295, 13–25. doi: 10.1385/1-59259-873-0: 013
- Hong, W. (2005; ). SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*, 1744(2), 120-44. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.03.014
- Jansen, H. J., Breeveld, F. J., Stijnis, C., ve Gobusch, M. P. (2014). Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clin Microbiol Infect*, 20(6), 488-496. doi: 10.1111/1469-0691.12699
- Jones, K. (1992). Immunology: A short course. *Biochemical Education*, 20(1), 58-59. doi: 10.1016/0307-4412(92)90029-L
- Kao, D. J., ve Hodges, R. S. (2009). Advantages of a synthetic peptide immunogen over a protein immunogen in the development of an anti-pilus vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol Drug Des*, 74(1), 33-42. doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00825.x
- Kedlaya, D. (2019, Oct 10). *Botulinum Toxin: Overview*. Dec 12, 2020 tarihinde Medscape: <http://www.emedicine.com/pmr/topic216.htm>. adresinden alındı
- Keller, J. E. (2008). Characterization of New Formalin-Detoxified Botulinum Neurotoxin Toxoids. *Clinical And Vaccine Immunology*, 15(9), 1374-79. doi: 10.1128/CVI.00117-08
- Kılıç, S. (2006). Toxins as agents of biological weapons. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 63, 85-106.
- Knittelfelder, R., Riemer, A. B., ve Jensen-Jarolim, E. (2009). Mimotope vaccination—From allergy to cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(4), 493-506. doi: 10.1517/14712590902870386
- Kostrzewa, R. M., ve Segura-Aguilar, J. (2007). Botulinum neurotoxin: evolution from poison, to research tool--onto medicinal therapeutic and future pharmaceutical panacea. *Neurotox Res*, 12(4), 275-290. doi: doi: 10.1007/bf03033911
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M., ve Swaminathan, S. (2009). Domain organization in *Clostridium botulinum* neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *J Mol Biol*, 386(1), 233-245. doi: 10.1016/j.jmb.200
- Lacy, D. B., ve Stevens, R. C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol*, 291(5), 1091–104. doi: 10.1006/jmbi.1999.2945
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R., ve Stevens, R. C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*, 5(10), 898–902. doi: 10.1038/2338
- Lagatie, O., Tritsmans, L., ve Stuyver, L. J. (2015). Characterization of rabbit antibodies against the immunogenic jc polyomavirus peptide. *Viral Imm*, 28(7), 405-409. doi: 10.1089/vim.2015.0010
- Lamanna, C. (1959). The most poisonous poison. *Science*, 130, 763-772.
- Lee, B. S., Huang, J. S., Jayathilaka, L. P., Lee, P., ve Gupta, S. (2016). Antibody production with synthetic peptides. *Methods Mol Biol*, 1474, 25-47. doi: 10.1007/978-1-4939-6352-2\_2
- Li, W., Joshi, M., Singhanian, S., Ramsey, K., ve Murthy, A. (2014). Peptide vaccine: Progress and challenges. *Vaccine*. 2(3), 515-536. doi: 10.3390/vaccines2030515
- Lindblad, E. (2000). Freund's adjuvants. In D. O'Hagan, *Vaccine Adjuvants—Preparation Methods and Research Protocols* (pp. 49-63). Totowa NJ: Humana Press.
- Lindström, M., ve Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), 298-314. doi: 10.1128/cmr.19.2.298-314.2006

- Lubran, M. M. (1988). Bacterial toxins. *Ann Clin Lab Sci*, 18(1), 58-71.
- Maksymowych, A. B., ve Simpson, L. L. (2004). Structural features of the botulinum neurotoxin molecule that govern binding and transcytosis across polarized human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(2), 633-641. doi: 10.1124/jpet.104.0668
- Marintcheva, B. (2018). Viruses as Tools for Vaccine Development. In B. Marintcheva, *Lightning Round: Harnessing the Power of Viruses*. Amsterdam: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-810514-6.00008-8
- Marks, J. D. (2004). Medical aspects of biologic toxins. *Anesthesiology Clinics of North America*, 22(3), 509-32. doi: 10.1016/j.atc.2004.05.010
- Middlebrook, J. L., ve Franz, D. R. (1997). Botulinum toxins. In F. R. Sidell, E. T. Takafuji, ve D. R. Franz, *Medical aspects of chemical and biological warfare* (pp. 643-654). Washington, DC: TMM publications.
- Mitchell, A. R. (2008). Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment. *Biopolymers*, 90(3), 175-184. doi: 10.1002/bip.20925
- Moisa, A., ve Kolesanova, E. (2010). Synthetic peptide vaccines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 4(4), 321-332. doi: 10.1134/S1990750810040025
- Montal, M. (2010). Botulinum Neurotoxin: A Marvel of Protein Design. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 591-617. doi: 10.1146/annurev.biochem.051908.125345
- Neurotoxin*. (2021, September 11). April 11, 2020 tarihinde Wikipedia: en.wikipedia.org/wiki/neurotoxin adresinden alındı
- Nevagi, J. R., Toth, I., ve Skwarczynski, M. (2018). Peptide-based vaccines. S. Koutsopoulos içinde, *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (s. 327-358). Australia: Woodhead Publishing. doi: 10.1016/B978-0-08-100736-5.00012-0
- Niamtu, J. (2003). Botulinum Toxin A: A Review of 1, 085 Oral and Maxillofacial Patient Treatments. *J Oral and Maxillofac Surg*, 61(3), 317-324. doi: 10.1053/joms.2003.50069
- Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., ve Lerner, R. A. (1983). Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(16), 4949-53. doi: 10.1073/pnas.80.16.4949
- Otvos, L., Hoffmann, R., Xiang, Z. Q., O, I., Deng, H., Wysocka, M., ... Ertl, H. C. (1998). A monoclonal antibody to a multiphosphorylated, conformational epitope at the carboxy-terminus of p53. *Biochim Biophys Acta*, 1404(3), 457-474. doi: 10.1016/S0167-4889(98)00087-1
- Pal, M., Tsegaye, M., Girzaw, F., Bedada, H., Godishala, V., ve Kandi, V. (2017). An Overview on Biological Weapons and Bioterrorism. *American Journal of Biomedical Research*, 5(2), 24-34. doi: 10.12691/ajbr-5-2-2
- Patocka, J., ve Splino, M. (2002). Botulinum Toxin: From Poison to Medicinal Agent. *The ASA Newsletter*, 88, 14-24.
- Pellequer, J. L., ve Westhof, E. (1993). PREDITOP: a prog for antigenicity prediction. *J. Mol. Graph.*, 11(3), 204-210. doi: 10.1016/0263-7855(93)80074-2
- Peptide As Immunogens*. (2017, March 27). Retrieved Febr 17, 2020, from Cambridge Research Biochemicals: <https://www.crbdiscovery.com/technical/antibodies/peptides-as-immunogens/>

- Peruski, A. H., ve Peruski, L. F. (2003). Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(4), 506-513. doi: 10.1128/cdli.10.4.506-513.2003
- Petrou, C., ve Sarigiannis, Y. (2018). Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges. In S. Koutsopoulos, *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-21). Woodhead Publishing.
- Pickett, A., ve Perrow, K. (2011). Towards new uses of botulinum toxin as a novel therapeutic tool. *Toxins (Basel)*, 3, 63–81. doi: 10.3390/toxins3010063
- Plotkin, S. A. (2009). Vaccines: The fourth century. *Clin Vaccine Immunol*, 16(12), 1709-1719. doi: 10.1128/CVI.00290-09
- Popoff, M. R., ve Poulain, B. (2010). Bacterial Toxins and the Nervous System: Neurotoxins and Multipotential Toxins Interacting with Neuronal Cells. *Toxins*, 2(4), 683–737. doi: 10.3390/toxins2040683
- Ramana, J., ve Mehla, K. (2020). Immunoinformatics and Epitope Prediction Immunoinformatics. In N. Tomar, *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2131, pp. 155-171). New York, NY, USA.: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-0716-0389-5\_6
- Rheinstein, P. H., ve Klontz, K. L. (1993). Shellfish–Borne İllnesses. *Am Fam Phy*, 47(8), 1837-40.
- Sachdeva, S. (2016). Peptides as “Drugs”: The Journey so Far. *Int J Pept Res Ther*, 23(1), 49–60. doi: 10.1007/s10989-016-9534-8
- Sakamoto, Y., Lokey, R., ve Krzanovski, J. (1987). Shellfish and fish poisoning related to the toxic dinoflagellates. *South Med J*, 80(7), 860-70. doi: 10.1097/00007611-198707000-00016
- Sandvig, K., Torgersen, M. L., Engedal, N., Skotland, T., ve Iversen, T. G. (2010). Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett*, 584(12), 2626-2634. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.008
- Saper, C. B. (2009). A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem*, 57(1), 1-5. doi: 10.1369/jhc.2008.952770
- Schantz, E. J., ve Johnson, E. A. (1992). Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev*, 56(1), 80-99.
- Schiavo GG, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Laureto PP, Dasgupta BR et al. Tetanus and Botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 1992; 359: 832-5. (tarih yok).
- Schmitt, C. K., Meysick, K. C., ve O'Brien, A. D. (1999). Bacterial Toxins: Friends or Foes? *Emerg Infect Dis*, 5(2), 224–34. doi: 10.3201/eid0502.990206
- Shapiro, R. L., Hatheway, C., ve Swerdlow, D. L. (1998). Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiologic Review. *Ann Intern Med*, 129(3), 221-8. doi: 10.7326/0003-4819-129-3-199808010-00011
- Sharma, S. K., ve Whiting, R. C. (2005). Methods for detection of Clostridium botulinum toxin in foods. *J Food Prot*, 68(6), 1256-63. doi: 10.4315/0362-028x-68.6.1256
- Sharma, S. K., Ferreira, J. L., Eblen, B. S., ve Whiting, R. C. (2006). Detection of type A, B, E, and F Clostridium botulinum neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), 1231–38. doi: 10.1128/aem.72.2.1231-1238.2006

- Shone, C., Wilton-Smith, P., Appleton, N., Hambleton, P., Modi, N., Gatley, S., ve Melling, J. (1985). Monoclonal antibody-based immunoassay for type A Clostridium botulinum toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl Environ Microbiol*, 50(1), 63-67. doi: 10.4315/0362-028x-68.6.1256
- Siagian, R. C., ve Osorio, J. E. (2018). Novel approaches to vaccine development in lower-middle income countries. *International Journal of Health Governance*. 23(4), 288-300. doi: 10.1108/IJHG-03-2018-0011
- Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. (1997). *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Washington, DC: Office of The Surgeon General Department of the Army, USA.
- Simpson, L. L. (1992). Clinically relevant aspects of the mechanism of action of botulinum neurotoxin. *Journal of Voice*, 6(4), 358-364. doi: 10.1016/s0892-1997(05)80034-7
- Singh, K., Kaur, J., Varshney, G. C., Raje, M., ve Suri, C. R. (2004). Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 168-173. doi: 10.1021/bc034158v
- Skovbjerg, H., Koch, C., Anthonsen, D., ve Sjöström, H. (2004). Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta*, 1690(3), 220-230. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.009.
- Skwarczynski, M., ve Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*, 7(2), 842-854. doi: 10.1039/C5SC03892H
- SM, W. (tarih yok). Chemical and biological weapons. Implications for anaesthesia and intensive care. *Br J Anaesth*. 2002; 89(2): 306-24.
- Solomon, H., ve Lilly, T. (2001). *Clostridium botulinum*. In: *Bacteriological analytical manual*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum> adresinden alınmıştır
- Stanker, L. H., Merrill, P., Scotcher, M. C., ve Cheng, L. W. (2008). Development and partial characterization of high-affinity monoclonal antibodies for botulinum toxin type A and their use in analysis of milk by sandwich ELISA. *Journal of Immunological Met.*, 336(1), 1-8. doi: 10.1016/j.jim.2008.03.003.
- Stills, H. F., ve Bailey, M. Q. (1991). The use of Freund's complete adjuvant. *Lab animal (USA)*, 20, 25-30.
- Swaminathan, S., ve Eswaramoorthy, S. (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.*, 7, 693-99. doi: 10.1038/78005
- Trier, N., ve Houen, G. (2017). Peptide antibodies in clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem*, 81, 43-96. doi: 10.1016/bs.aac.2017.01.002
- Trier, N., Hansen, P., ve Houen, G. (2019). Peptides, antibodies, peptide antibodies and more. *International Journal of Molecular Sci*, 20(24), 6289. doi: 10.3390/ijms20246289
- Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamo, M., Tsuji, T., ve Kozaki, S. (2008). Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Microb. Pathog.*, 44, 484-493. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
- Turton, K., Chaddock, J. A., ve Acharya, K. R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(11), 552-558. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
- United Nations Security Council. (1995). *Tenth report of the executive committee of the special commission established by the secretary-general pursuant to paragraph 9(b)(I) of security council resolution 687*



- (1991), and paragraph 3 of resolution 699 (1991). <https://www.un.org/depts/unscom/sres95-1038.htm> adresinden alınmıştır
- US FDA. (1992). *Staphylococcus aureus*. In *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* (pp. 15-19). Giza, Egypt: U.S. Food ve Drug Administration.
- Van Emon, J. M. (2006). *Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques (1st ed. ed.)*. CRC Press.
- Van Regenmortel MH. Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassay. *Annales de Biologie Clinique*. 1993; 51(1); 39-41. (tarih yok).
- Van Regenmortel, M. H. (1988). Synthetic peptides as vaccines. J. P. Briand, S. Muller, S. Plaué, ve M. H. Van Regenmortel içinde, *Synthetic Polypeptides as Antigens* (1 b., Cilt 19, s. 177-191). Amsterdam: Elsevier. doi: 10.1016/S0075-7535(08)70011-1
- Vita, R., Mahajan, S., Overton, J. A., Dhanda, S. K., Martini, S., Cantrell, J. R., ... Peters, B. (2018, Oct 24). *The Immune Epitope Database (IEDB)*. doi: 10.1093/nar/gky1006.
- Wang, Y. F., ve Kobayashi, M. (2012). Antibody Detection: Principles and Applications. Y. W. Tang, ve C. W. Stratton içinde, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (s. 53-73). NY, USA. doi: 10.1007/978-1-4614-3970-7\_4
- Wellhöner, H. H. (1989). Clostridial toxins and the central nervous system: Studies on in situ tissues. In L. L. Simpson, *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin* (pp. 231–253). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Whitby, M., Street, A. C., Ruff, T. A., ve Fenner, F. (2002). Biological agents as weapons 1: smallpox and botulism. *Med J Aust*, 176 (9), 431-433. doi: 10.5694/j.1326-5377.2002.tb04486.x
- White, S. M. (2002). Chemical and biological weapons. Implications for anaesthesia and intensive care. *Br J Anaesth*, 89(2), 306-24. doi: 10.1093/bja/aef168
- Wictome, M., Newton, K., Jameson, K., ve Hallis, B. (1999). Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol*, 65(9), 3787-3792. doi: 10.1128/aem.65.9.3787-3792.1999
- Yadav, D. K., Yadav, N., ve Khurana, S. M. (2014). Vaccines: Present Status and Applications. In S. S. Verma, ve A. Singh, *Animal Biotechnology: Models in Discovery and translation* (pp. 491-508). USA: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-416002-6.00026-2
- Yang, H., ve Kim, D. S. (2015). Peptide immunotherapy in vaccine development: From epitope to adjuvant. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 99, 1-14. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.001
- Zarebski, L. M., Vaughan, K., Sidney, J., Peters, B., Gey, H., Janda, K. D., ... Sette, A. (2008). Analysis of Epitope Information related to *Bacillus anthracis* and *Clostridium botulinum*. *Expert review of vaccines*, 7(1);, 55-78. doi: 10.1586/14760584.7.1.55.
- Zhang, R., ve Ulery, B. D. (2018). Synthetic vaccine characterization and design. *Journal of Bionanoscience*, 12(1), 1-11. doi: 10.1166/jbns.2018.1498
- Zhu, K., Dietrich, R., Didier, A., Doyscher, D., ve Martlbauer, E. (2014). Recent Developments in Antibody-Based Assays for the Detection of Bacterial Toxins. *Toxins (Basel)*, 6(4). doi: 10.3390/toxins6041325

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Meryem IŞIK  
**Uyruğu** : Türkiye Cumhuriyeti

### 2. Eğitim Bilgileri

**Lisans** : 2004-2010 Boğaziçi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Yüksek Lisans** : 2011-2013 Gebze Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Doktora** : 2014-halen Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

**Yabancı Dili** : İngilizce

### 3. Ünvanları:

Moleküler Biyolog, Msc

### 4. Mesleki Deneyimi

**Araştırma Görevlisi** : 02/2011-10/2013 Gebze Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Araştırmacı** : 11/2013-09/2016 TÜBİTAK MAM Teknoloji Transfer Birimi

**Araştırmacı** : 09/2016-05/2017 TÜBİTAK MAM Ürün Yönetimi Birimi

**Araştırmacı** : 05/2017-halen TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji  
Enstitüsü

### 5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

--

## 6. Bilimsel Etkinlikler

- **Ulusal Hakemli Dergi**

1. Işık M, Bilici Z, Çine N, Öztürk S. Usage of peptide antigens for antibody based BoNT detection system. *KOU Sag Bil Derg.* 2017; 3: 30-34.

- **Projeler**

1. Tavşan Serumu Projesi (TÜBİTAK TARAL 1009), Alt İş Paketi Sorumlusu (2017, 2020)
2. BKTM Projesi, Proje Yönetim Grubu (2017, 2020)
3. AFLAMAM İAK Projesi (TÜBİTAK MAM- TOB İşbirliği), Yürütücü Yardımcısı (12/2018, 12/2020)
4. Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi (TÜBİTAK SBAG), Ankara Üniversitesi tarafından yürütülen proje için CD24 proteinine karşı MoAb geliştirilmiştir (2017, 2018)
5. Geleneksel Gıdalarda Mikotoksin Analiz Yöntemleri Geliştirilmesi (TÜBİTAK KAMAG 1007), Misafir Araştırmacı, 2014