ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyhmus Ersen KOLDEMİR

ARABIDOPSIS THALIANA BİTKİSİNDE SİTOKİNİN SİNYAL YOLLARINDA GÖREV ALAN AHP1 PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKORLARIN ÜRETİMİ, SEÇİMİ VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARABIDOPSIS THALIANA BİTKİSİNDE SİTOKİNİN SİNYAL YOLLARINDA GÖREV ALAN AHP1 PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKORLARIN ÜRETİMİ, SEÇİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ŞEYHMUS Ersen KOLDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ...../ ...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza	İmza	İmza
Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Nuray GÜZELER	Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARABIDOPSIS THALIANA BİTKİSİNDE SİTOKİNİN SİNYAL YOLLARINDA GÖREV ALAN AHP1 PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKORLARIN ÜRETİMİ, SEÇİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Şeyhmus Ersen KOLDEMİR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl : 2010, **Sayfa:** 66
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN

Bu çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkisinde sitokinin sinyal yollarında görev alan AHP1 proteinine karşı monoklonal antikorlarının üretimi, seçimi ve immünoanalizi yapılmıştır. Monoklonal antikorlar Ni Sepharose yüksek performanslı kromatografi kolonu kullanılarak monoklonal antikorlar saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyonu ELISA ve Western Blot teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda üç monoklonal antikorun monospesifik, diğer iki monoklonal antikorun ise polispesifik karakterde olduğu tespit edilmiştir. İzotipleme yöntemi ile monoklonal antikorların IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGM ve IgGA ikincil antikorları ile etkileşimi incelenerek; monoklonal antikorların ikincil antikorlardan hangisi ile daha iyi reaksiyon verdiği absorbans değerlerinin kıyaslanmasıyla belirlenmiştir. Monoklonal antikorlar kaba özütler üzerinde denenerek monospesifik karakterli antikorlardan ikisinin sadece AHP1 proteiniyle reaksiyon verdiği, diğer monospesifik karakterli monoklonal antikorun AHP1 proteininin yanı sıra AHP6 proteiniyle çapraz reaksiyon verdiği, polispesifik karakterli antikorların ise AHP1,2,3,4,5,6 proteinleriyle reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Monoklonal antikorlara hassasiyet testi yapılarak monoklonal antikorların seyreltme oranları hesaplanmıştır. Monoklonal antikorlardan birisinin epitop haritalandırılması gerçekleştirilmiştir. AHP1 antijeninin bu monoklonal antikora KVDPHVHQLK epitopu üzerinden bağlandığı MS/MS spektrofotometrisi ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: AHP1 proteini, sitkokinin sinyal yolları, monoklonal antikor.

ABSTRACT

MSc THESIS

PRODUCTION, SELECTION AND CARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AHP1 PROTEIN THAT HAS FUNCTION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SIGNALING PATHWAY

ŞEYHMUS Ersen KOLDEMİR

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year : 2010, **Pages:** 66
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Asst.Prof.Dr.Ramazan BİLGİN

In the present study; production, selection and characterization of monoclonal antibodies against AHP1 protein that has function in *Arabidopsis thaliana* signaling pathway are completed. Monoclonal antibodies are purified by using Ni Sepharose high performance chromatography column. Monoclonal antibodies were characterized by using ELISA and Western Blot techniques and three of them are classified as monospecific and two of them classified as polyspecific. Using by isotyping method; monoclonal antibodies are tested on IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGM and IgGA (secondary antibodies) to find out which secondary antibody gives best reaction with antibodies. Antibodies are tested on crude extracts and as a result; two of the monospecific antibodies are only specific to AHP1 protein, other monospecific antibody is specific to AHP1 and has cross reaction with AHP6 and polyspecific antibodies are specific to AHP1,2,3,4,5,6 proteins. Sensitivity test is used for each antibodies and best dilutions are calculated. Besides these epitope mapping is completed. According to MS/MS analysis; AHP1 protein is bounded to one of the antibody on KVDPHVHQLK epitope.

Key Words: AHP1, cytokinin signal pathway, monoclonal antibody

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabır ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda bana her zaman destek olan hocalarım Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e; Socrates-Erasmus öğrenci değişim programı dahilinde bulunduğum Çek Cumhuriyeti'nin Brno kentindeki Masarykova Üniversitesi Bitki Fizyolojisi Bölümünde araştırmalarımı yapabilme, laboratuarını kullanabilme fırsatı veren başta öğretim üyesi RNDr. Lubomir JANDA ve Mgr. Radka DOPITOVA'ya; öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen en değerli varlıklarım babam Veysi KOLDEMİR, annem Ayten KOLDEMİR, ablalarım Ebru DOĞAN ve Esin ALAÇI ile biricik yeğenlerim Yağız ve Ege'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ….. I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER DİZİNİ IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
RESİMLER DİZİNİ VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR IX
1. GİRİŞ 1
1.1. Bitki Hormonu Sitokininler 1
1.2. *Arabidopsis thaliana* Bitkisindeki Sitokinin Sinyal Yolları 2
1.2.1. İki Bileşenli Sistemde His-Asp Fosforilasyonu ile Sinyal İletimi 4
1.2.2. *Arabidopsis thaliana*'daki Histidin Kinazlar 5
1.2.3. *Arabidopsis thaliana*'daki Yanıtlayıcı Regülatürler 6
1.3. Bitkilerdeki HPt Proteinleri ve Fosforil Grubu Aktarımı 8
1.4. Sitokinin Sinyalinde İmmünokimyanın Uygulanışı 12
1.4.1. Monoklonal Antikor Üretimi 12
1.4.2. İmmünomodülasyon 16
1.5. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları 17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 18
3. MATERYAL VE METOD 21
3.1. Materyal 21
3.2. Metod 21
3.2.1. Protein Tayini 21
3.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 22
3.2.3. Western-Blot Analizi 23
3.2.4. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 24
3.2.5. AHP1 Proteininin Saflaştırılması 25
3.2.6. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması 26

3.2.7. Epitop Haritalandırılması....27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA....29
4.1. Antijenin Saflaştırılması....29
4.1.1. Ekspresyon İşleminin Optimize Edilmesi....29
4.1.2. Saflaştırma....30
4.2.Antikorların Seçimi....31
4.2.2. Aşılama....31
4.2.3. Hibridomaların Füzyonu....32
4.2.4. Monoklonal Antikorların Seçimi....32
4.2.4.1. ELISA Yöntemi....32
4.2.4.2. Western Blot Tekniği....36
4.2.4.2.(1). Polispesifik Karakterdeki Süperntantlar....36
4.2.4.2.(2). Monospesifik Karakterdeki Süpernatantlar....37
4.3. Antikorların Saflaştırılması....39
4.4. Antikorların Karakterizasyonu....44
4.4.1. Özgüllük....44
4.4.1.1. Monospesifik Karakterli Antikorlar....45
4.4.1.2. Polispesifik Karakterli Antikorlar....45
4.4.2. Kaba Özütler Üzerinde Deneme....46
4.4.2.1. Monospesifik Karakterli Antikorlar....48
4.4.2.2. Polispesifik Karakterli Antikorlar....50
4.4.2. Hassasiyet....51
4.4.3. İzotipleme....53
4.5. Epitop Haritalandırılması....54
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER....59
5.1. Sonuçlar....59
5.2. Öneriler....60
KAYNAKLAR....61
ÖZGEÇMİŞ....66

ÇİZELGELER DİZİNİ SAYFA

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için alt jelin bileşimi.....22
Çizelge 3.2. SDS-PAGE için üst jelin bileşimi. 22
Çizelge 4.1. 1 numaralı 96 kuyucuklu mikroplakanın, mikroplaka okuyucusundan elde edilen absorbans değerlerini gösteren çizelge. 34
Çizelge 4.2. 2 numaralı 96 kuyucuklu mikroplakanın, mikroplaka okuyucusundan elde edilen absorbans değerlerini gösteren tablo. 35
Çizelge 4.3. ELISA testi sonucunda monospesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri. 42
Çizelge 4.4. ELISA testi sonucunda polispesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri. 42
Çizelge 4.5. Bradford yöntemi sonucunda monospesifik ve polispesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri. 42
Çizelge 4.6. Bradford yöntemi sonucunda monospesifik ve polispesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri. 43
Çizelge 4.7. Bradford yöntemi sonu elde edilen değerlerden yola çıkılarak konsantrasyonların hesaplanmasını gösteren tablo. 43
Çizelge 4.8. 2,6,7,13 ve 14 numaralı antikorların seyreltme oranlarına karşılık absorbans değerlerini gösteren tablo. 52
Çizelge 4.9. ELISA testi sonucunda elde edilen monoklonal antikorların değişik ikincil antikorlar ile denenmesi sonucu elde edilen absorbans değerleri. 53

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Sitokinini temsil eden nükleotidlerin yapısı 2
Şekil 1.2. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde genel olarak sitokinin sinyal modeli.....3
Şekil 1.3. İki bileşenli sistemde tek basamaklı His-Asp fosforilasyonu.....5
Şekil 1.4. İki bileşenli sistemde çok basamaklı His-to-Asp fosforilasyonu 5
Şekil 1.5. *Arabidopsis thaliana*'daki Histidin kinazlar 6
Şekil 1.6. *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki yanıtlayıcı düzenleyiciler.....8
Şekil 1.7. A: histidin içeren fosfotransfer proteinlerinin (AHP'lerin) karakteristik özelliklerinin benzerliklerine göre sınıflandırılması. B: *Arabidopsis thaliana*'daki histidin içeren fosfofotransfer proteinlerinin aminoasit sekanslarının dizilimi 9
Şekil 1.8. Monoklonal antikorların genel yapısı. 13
Şekil 1.9. Hibritleştirme teknolojisinin basamaklarını içeren şematik sunum.....15
Şekil 4.1. Ekspresyon işleminde kullanılarn vektör. 29
Şekil 4.2. 6 numaralı monospesifik antikorun saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen zamana bağlı protein miktarını gösteren grafik.....40
Şekil 4.3. 6 numaralı monospesifik antikorun saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen zamana bağlı protein miktarını gösteren grafik.....41
Şekil 4.4. 2,6,7,13 ve 14 numaralı antikorların hassasiyetinin ölçümüne ait grafik ..52
Şekil 4.5. Tripsin ile hidroliz edilmiş AHP1 proteinine ait fragmentleri gösteren grafik. 55
Şekil 4.6. Hidroliz işleminin kontrolüne ait grafik. 56
Şekil 4.7. Tripsin ile çökeltilmiş AHP1 proteininin 2 numaralı antikor ile reaksiyonu sonucunda elde edilen epitop haritalanmasına ait grafik. 57

RESİMLER DİZİNİ **SAYFA**

Resim 1.1. AHP1 proteininin PyMOL programı kullanılarak çizilmiş üç boyutlu yapısı.....11
Resim 4.1. Saflaştırma sonucu elde edilen AHP1 antijenine ait SDS-PAGE görüntüsü. 31
Resim 4.2. Süpernatantların AHP1 antijenine karşı etkinliklerinin ölçüldüğü 1 numaralı 96 kuyucuklu mikroplaka.....34
Resim 4.3. Süpernatantların AHP1 antijenine karşı etkinliklerinin ölçüldüğü 2 numaralı 96 kuyucuklu mikroplaka.....35
Resim 4.4. Polispesifik karakterli süpernatantlara örnek.....37
Resim 4.5. Monospesifik karakterli süpernatantlara örnek.....38
Resim 4.6. Karakterizasyon işleminde kullanılan AHP proteinlerinin commasive blue ile boyanması sonucu elde edilen görüntü.....44
Resim 4.7. A) 2 numaralı antikor, B) 6 numaralı antikor, C) 7 numaralı antikor.....45
Resim 4.8. D) 13 numaralı antikor, E) 14 numaralı antikor. 46
Resim 4.9. Bakteri stoklarından hazırlanan kaba özütlerin commasive blue ile boyanması sonucu elde edilen jel.....47
Resim 4.10. His-tag ile yapılan kontrol sonucu. 48
Resim 4.11. Monospesifik karakterdeki 2 ve 6 numaralı antikorlar. 49
Resim 4.12. Monospesifik karakterli 7 numaralı antikor. 50
Resim 4.13. Polispesifik karakterli 13 numaralı ve 14 numaralı antikorlar. 51
Resim 4.14. AHP1 proteininin PyMOL programı kullanılarak çizilmiş üç boyutlu yapısı.....58

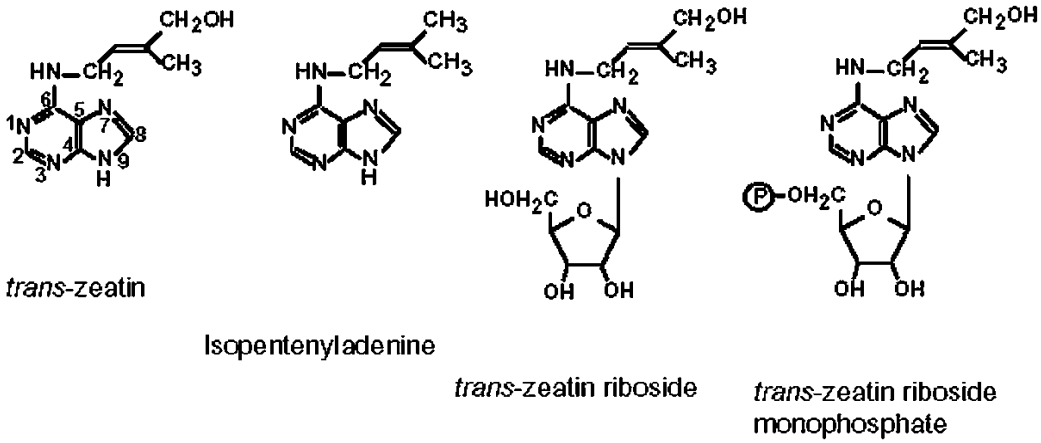
SİMGELER VE KISALTMALAR

AHP	:Arabidopsis HPt phosphotransmitter
HPt	:Histidine phosphotransmiter
APHP	:Arabidopsis *p*seudo-HPt phosphotransmitter
ARR	:Arabidopsis yanıtlayıcı düzenleyici
Asp	:Aspartat
CK	:Sitokinin
ddH_2O	:Deiyonize edilmiş su
ELISA	:Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FPLC	:Fast Protein Liquid Chromatography
His	:Histidin
HK	:Histidin kinaz
MAb	:Monoklonal antikor (Monochlonal Antibody)
MS	:Kütle Spektrometrisi (Mass spectrometry)
OD	:Optical density
PAGE	:Poliakrilamid jel elektroforezi
RD	:Alıcı Bölüm (Receiver domaine)
RR	:Yanıtlayıcı Düzenleyici (Response regulator)
TB	:Terrific Broth ortamı
TZ	:Transient Alan
SDS PAGE	:Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
PhyB	:Phytochrome B
HAT	:Hipoksantin-aminopterin-timidin
PAS	:Kromofor bağlama bölümü
TM	:Transmembran bölümü
ED	:Ekstraselüler bölüm
KD	:Kinaz bölümü
RLD	:Alıcı benzeri bölüm (Receiver-like Domain)
H	:Histidin
D	:Aspartat

1. GİRİŞ

1.1. Bitki Hormonu Sitokininler:

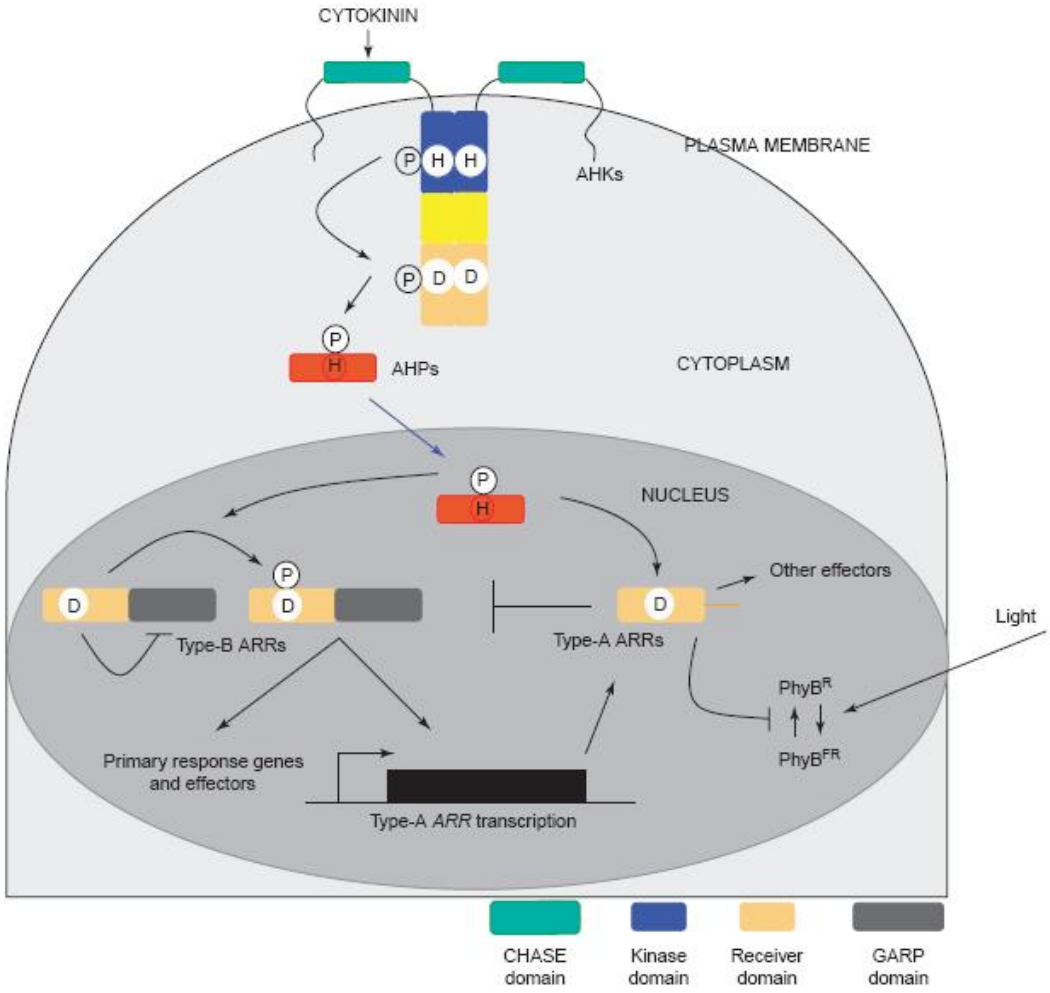
Sitokininler, bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde pek çok etkisi olan bitki hormonlarıdır. Hücre bölünmesi, sürgün başlatma, yaprak ve kök farklılıkları, kloroplast biyojenezi ve yaşlanmayı etkilemektedirler. Sitokininin auxin varlığında, hücre bölünmesini indükleyen önemli bir faktör olduğu daha önce yapılan araştırmalar sonucunda keşfedilmiştir. Aynı zamanda sitokininler hücresel düzenleyici proteinlerdir. Vücudun farklı dokularında çeşitli hücreler tarafından belirli uyarıcılara karşı salgılanıp pek çok farklı biyolojik fonksiyonları kontrol eden sitokininlerin en önemli etkilerinden biriside hücre bölünmesi üzerinedir. Bazı sitokininler hücre döngüsünün ilerlemesinde pozitif rol oynarken, bazıları da hücre bölünmesini engelleyici etki gösterir. Sitokininlerin hücre bölünmesi üzerindeki pozitif ve negatif etkileri hücre tipine göre değişir. Sitokininler çeşitli uyarılara karşı cevap olarak hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkilemek üzere özel hücreler tarafından salgılanır. Sitokinin belirli bir çeşidi farklı dokulardaki hücrelerden salgılanır fakat hepsinin biyolojik etkisi aynıdır. Çeşitli bitki türleri üzerinde uygulanan ve günümüzde de geçerli olan genetik ve moleküler çalışmalara göre iki bileşenli sinyal proteinleri sistemi sitokinin sinyaline uyum sağlarlar. İki bileşenli (histidin protein kinaz ve yanıtlayıcı düzenleyiciden oluşan) sistemler pek çok prokaryotik hücrede ve birkaç ökaryotik hücrede gözlenir. Sinyal yolu histidin protein kinaz sensörünün çevresel uyarıların sonucunda modülasyonu ile başlar. Fosforilasyonla; korunan histidin artığından, cevap düzenleyicisi olan aspartat artığına fosfat transferi gerçekleşir.(Hwang, 2001)



Şekil 1.1. Sitokinini temsil eden nükleotidlerin yapısı (Kakimoto ve ark., 2003).

1.2. *Arabidopsis thaliana* Bitkisindeki Sitokinin Sinyal Yolları

Sitokinin sinyalinde geçerli olarak kabul edilen model çok basamaklı fosforilasyondur. Bu fosforilasyon prokaryotik iki bileşenli sistemde çevresel uyarılara yanıt niteliğindedir. Son yıllarda sitokinin sinyalinin moleküler mekanizmasının araştırılması konusunda ilerlemeler kaydedilmiştir. (Ferreira ve Kiber, 2005)



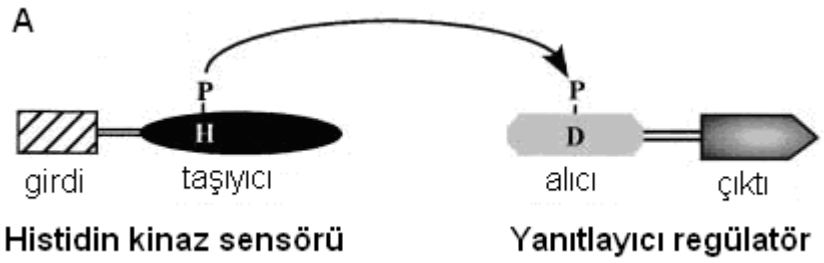
Şekil 1.2. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde genel olarak sitokinin sinyal modeli (Ferreira ve Kieber, 2005).

Şekil 1.2'de *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki sitokinin sinyal modeli basitçe gösterilmiştir. Sitokinin; hibrid sensörünün kinaz bölümü üzerinde bulunan histidin artığının oto fosforilasyonunun gerçekleştiği hücre zarı üzerinde algılanır. Bunun ardından fosforil grubu, sensörün alıcı bölümüne dahil olan aspartat artığı üzerine transfer olur. Bunu; fosforil grubunun AHP proteini üzerinde bulunan histidin artığına moleküller arası transferi izler. Aktive edilmiş AHP çekirdeğe doğru yer değiştirir ve fosforil grubunu yanıtlayıcı düzenleyicideki (ARR) aspartat artığına transfer eder. B tipi ARR alıcı bölüm kendi transkripsiyonun gerçekleşmesini engeller. Fosforilasyon üzerindeki bu baskı sonucu B tipi ARR'lar, A tipi ARR'ların ve diğer birincil yanıtlayıcı genlerin ekspresyonunun artmasını sağlar. A tipi ARR'lar

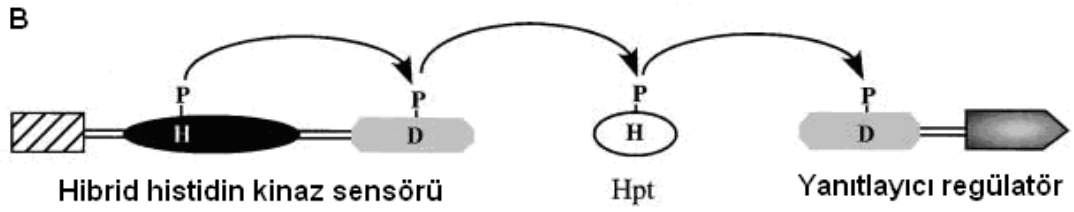
sitokinin sinyalinin iletimine negatif yönde etki eder ve kendi transkripsiyonlarını gerçekleştirir. ARR4; karanlıktan gelen PhyB'nin negatif yönde regüle edildiği, ışığın bulunduğu ortamda birikir. (Ferreira ve Kieber, 2005)

1.2.1. İki Bileşenli Sistemde His-Asp Fosforilasyonu ile Sinyal İletimi

Basitçe iki bileşenli sistemler histidin kinaz sensörü ve yanıtlayıcı düzenleyiciden oluşur. Histidin kinaz, bir N-terminal girdi bölgesi ve C-terminal kinaz bölgesi ile değişmez bir histidin bölgesi içerir. Yanıt düzenleyicisi bir N-terminal algılayıcı bölgesi ile değişmez aspartat bölgesi ve bir C-terminal çıktı bölgesi içerir. Örnek olarak *E. coli* hücresinde ozmotik cevap EnvZ-OmpR iki bileşenli sistemi tarafından kontrol edilir. Histidin kinaz EnvZ sensörünün girdi bölümü dış ortamdaki ozmolaritedeki değişimleri algılar ve buna göre hücre içindeki kinaz ve fosfat aktivitesini ayarlar. Yüksek ozmolarite otofosfarilasyonu tetikler. Otofosforilasyonu takiben fosforil grubunun transferi algılayıcı düzenleyici OmpR'de bulunan aspartat bölgesi tarafından algılanır. Aksi durumda düşük ozmolarite fosforilize olmuş OmpR'nin defosforilasyonunu tetikler. OmpR'nin fosforilasyon durumu hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol altında tutabilmek için çıktı bölgesinin DNA-bağlanma aktivitesine göre değişim gösterir. Böylece fiziksel sinyal (örneğin bir çevresel uyarı) "His-Asp fosforilasyonu" ile iki bileşenli sinyal sisteminde biyokimyasal bir reaksiyona dönüştürülebilir. İki bileşenli sistemlerde fosforilasyon iki türlü gerçekleşebilir. Bunlardan birincisi iki bileşenli sistemde tek basamaklı His-Asp fosforilasyonu (Şekil 1.3) diğeri ise iki bileşenli sistemde çok basamaklı His-Asp fosforilasyonudur (Şekil 1.4). İki sistem arasındaki fark; çok basamaklı His-Asp fosforilasyonunda His içeren fosfotransfer proteininin, histidin kinaz sensörü ile yanıtlayıcı düzenleyici arasında fosfat grubunun taşınmasını sağlamasıdır (Urao ve ark., 2000).



Şekil 1.3. İki bileşenli sistemde tek basamaklı His-Asp fosforilasyonu. Basit bir prokaryotik hücrede histidin kinaz sensörü ve yanıtlayıcı düzenleyiciden oluşan iki bileşenli sistem şematize edilmiştir (Hutchison ve Kieber, 2002).



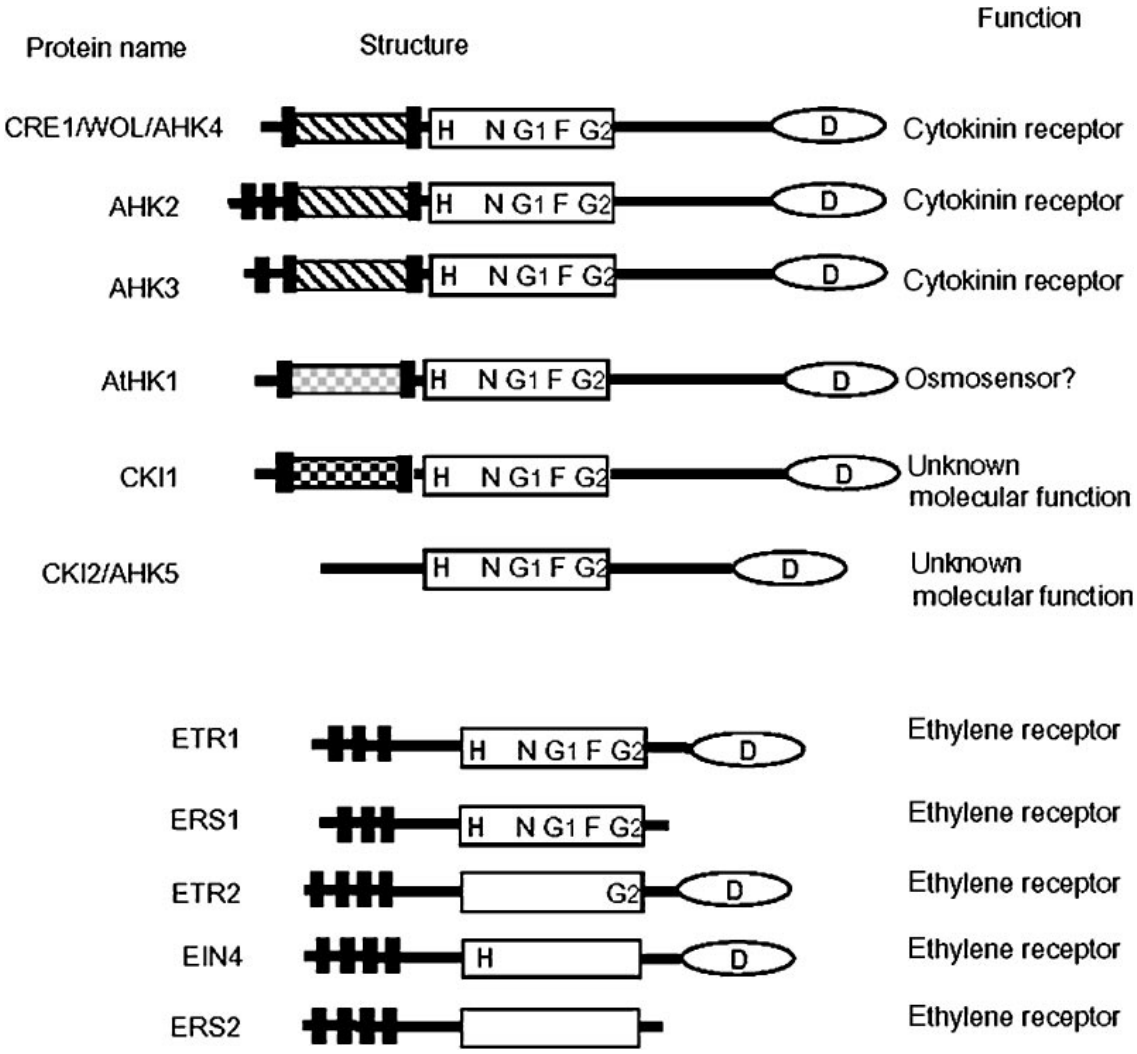
Şekil 1.4. İki bileşenli sistemde çok basamaklı His-to-Asp fosforilasyonu. Girdi, hibrid histidin kinaz sensörü, taşıyıcı, yanıtlayıcı bölüm ve çıktı ile histidin içeren fosfotransfer proteinden (Hpt) oluşan çok basamaklı fosforilasyon sistemi (Hutchison ve Kieber, 2002).

1.2.2. *Arabidopsis thaliana*'daki Histidin Kinazlar:

Bitkiler sitokinine iki bileşenli sinyal yoluyla karşılık verir. Kabul edilen modele göre üç Arabidopsis histidin kinazı, AHK2, AHK3 ve AHK4/CRE1 transmembran sitokinin reseptörü olarak görev yaparlar. Reseptörler sinyali fosforilizasyon aracılığıyla çekirdeğe transfer eder ve Arabidopsis yanıt düzenleyicilerinin (ARR'lar) iki birincil sınıfıyla aktive olurlar ki bu yanıt düzenleyicilerine A tipi ARR ve B tipi ARR denir.

Şekil 1.5'te *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki iki bileşenli sistem örneklerine göre histidin kinaz ve etilen reseptörlerinin karakteristik yapılarını gösteren birincil bölümlerin yapısı şematize edilmiştir. Baştaki siyah dikdörtgen kısım, transmembran bölümünü; çizgili dikdörtgen kısım, ekstraselüler chase bölümünü, açık dikdörtgen kısım verici bölümü; H, N, G1, F, G2 simgeleriyle gösterilenler histidin kinaz

fonksiyonlarının karakteristik özelliklerini; oval kısım ise D harfiyle simgelenen fosforilizasyona uğrayabilecek durumdaki aspartat artığı ile alıcı bölümünü gösterir.



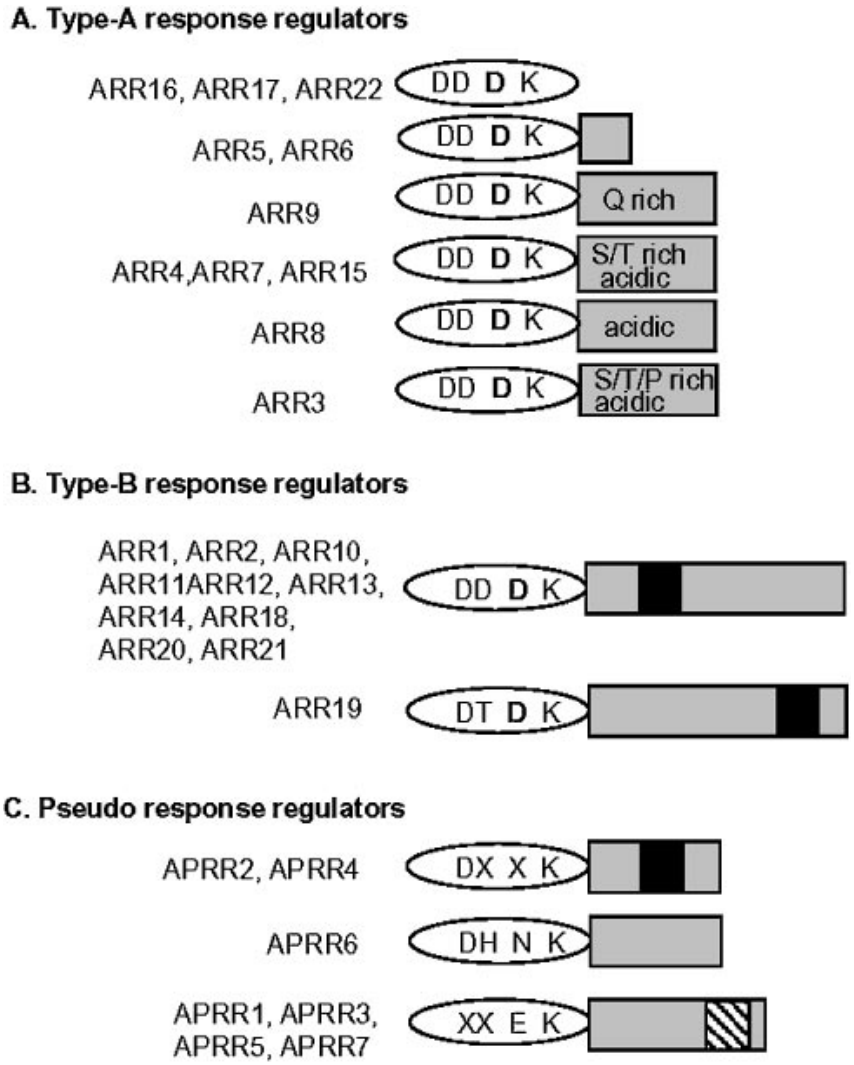
Şekil 1.5. *Arabidopsis thaliana*'daki Histidin kinazlar (Kakimoto, 2003).

1.2.3. *Arabidopsis thaliana*'daki Yanıtlayıcı Düzenleyiciler

Arabidopsis yanıtlayıcı düzenleyicileri (Arabdopsis Response Regulators) A tipi ARR'ler ve B tipi ARR'ler olmak üzere iki sınıf altında gruplandırılmış 22 genden ibarettir. Bu gruplandırma genlerin bölümsel yapıları ve aminoasit sekansları benzerlikleri baz alınarak yapılmıştır. Bunlardan 11 tanesi ARR sınıfındadır ve her

biri carboksil (C)-terminal üzerinde 90 aminoasitten daha az sayıda aminoasit içeren kısa değişken uzantılara sahiptir. Diğer 11 gen ise B tipi ARR sınıfındadır. Bunlardan her biri GARP adı verilen DNA-bağlayıcı bölüm ve değişken bölgeler içerir. B tipi ARR'ler transkripsiyon aşamasında görev alırlar ve sitokinin birincil yanıt genlerindeki transkripsiyonu A tipi ARR'lar içeren ortamda indüklerler. B tipi ARR'ların sitokinin cevabında pozitif düzenleyici olarak görev almalarına karşın A tipi ARR'lar sitokinin sinyalinin negatif düzenleyicileridir. Böylece sitokinin efektörlerinin bağlantısı negatif geri besleme döngüsü ile sonraki yanıtların büyüklüğünü kontrol etmek için düzenlenirler. Ek olarak fosforilasyon için alıcı benzeri bölüm taşıyan fakat korunmuş aspartat artığı içermeyen başka proteinlerde vardır. Bunlar Arabidopsis pseudo-response regulators (APRRs) olarak sınıflandırılmıştır.

Şekil 1.6'da *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki yanıtlayıcı düzenleyiciler verilmiştir. Fosforilasyonda görev alan aspartat artığı D, her bir yanıtlayıcı düzenleyiciye göre farklılık gösteren aminoasit artıkları ise X ile gösterilmiştir. Oval kısım yanıtlayıcı bölümü, içi dolu kutular GARP motifini, taralı kutular CCT motifini, gri kutular değişken kısımları, D aspartat, K lizin, H histidin, N asparjin, E glutamat, T treonini temsil eder (Kakimoto, 2003).



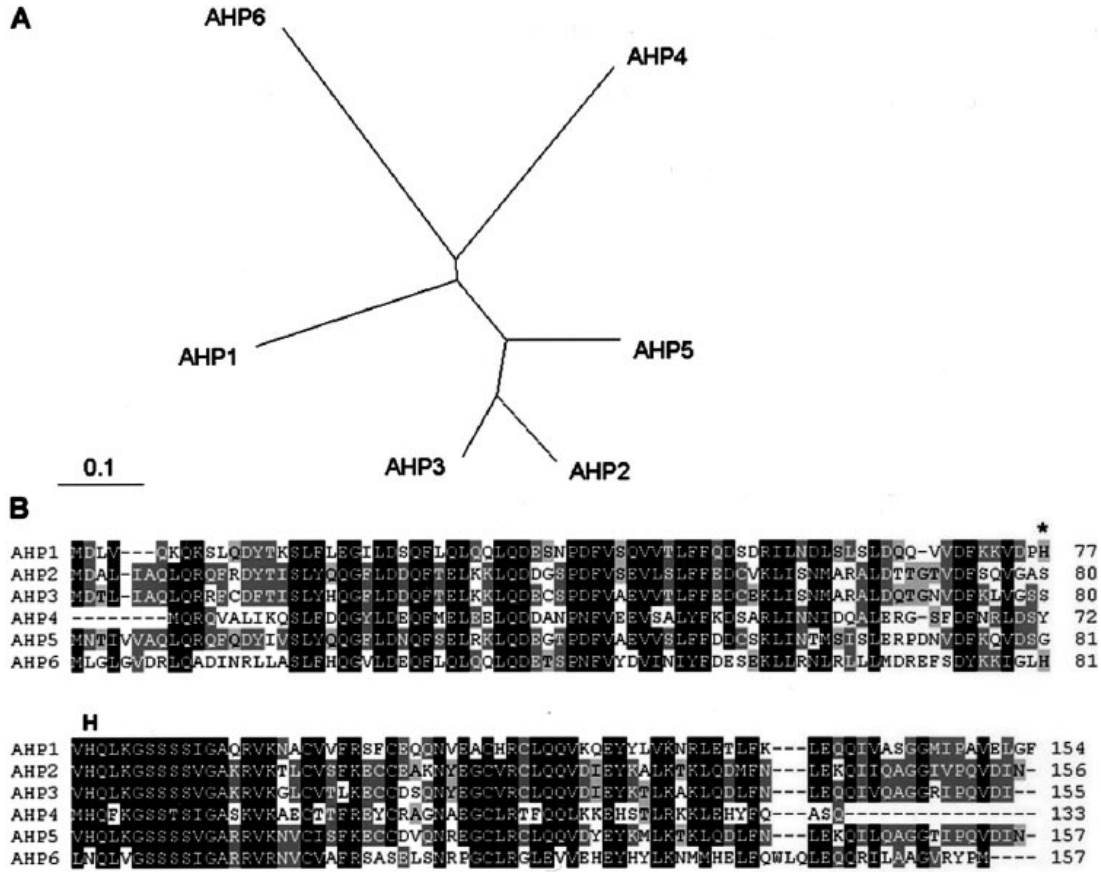
Şekil 1.6. *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki yanıtlayıcı düzenleyiciler. A) A tipi ARR'lar, B) B tipi ARR'lar, C) APRR'ler.

1.3. Bitkilerdeki HPt Proteinleri ve Fosforil Grubu Aktarımı

Hemen her durumda fosforil grubu dönüşümlü olarak His ve Asp artıkları arasında transfer olur. Bu transfer işleminin gerçekleşmesinde Hpt proteinleri görev alır. *Arabidopsis thaliana*'daki Hpt proteinleri altı gen ailesi (AHP1,2,3,4,5 ve 6) içerir ve her bir gen farklı sayıda (ortalama 150) aminoasit içerir. Dizilim için Clustral X, grafiksel çıktı için ise TreeView programları kullanılmıştır ve bütün aminoasit sekansları belirlenmiştir. AHP1, AHP2, AHP3, AHP4 ve AHP5; histidin

fosforilasyonunda görev alan bölümü içeren iyi korunmuş XHQXKGSSXS motifini içermektedir. AHP6'nın histidin fosforilasyonu artığı olarak kabul edilen bölümü asparajin ile değişmiştir.

Şekil 1.7'de H harfi iyi korunmuş fosforilasyon bölümünü, asterisk işareti (*) ise AHP6'nın potansiyel histidin fosforilasyon artığını simgeler.

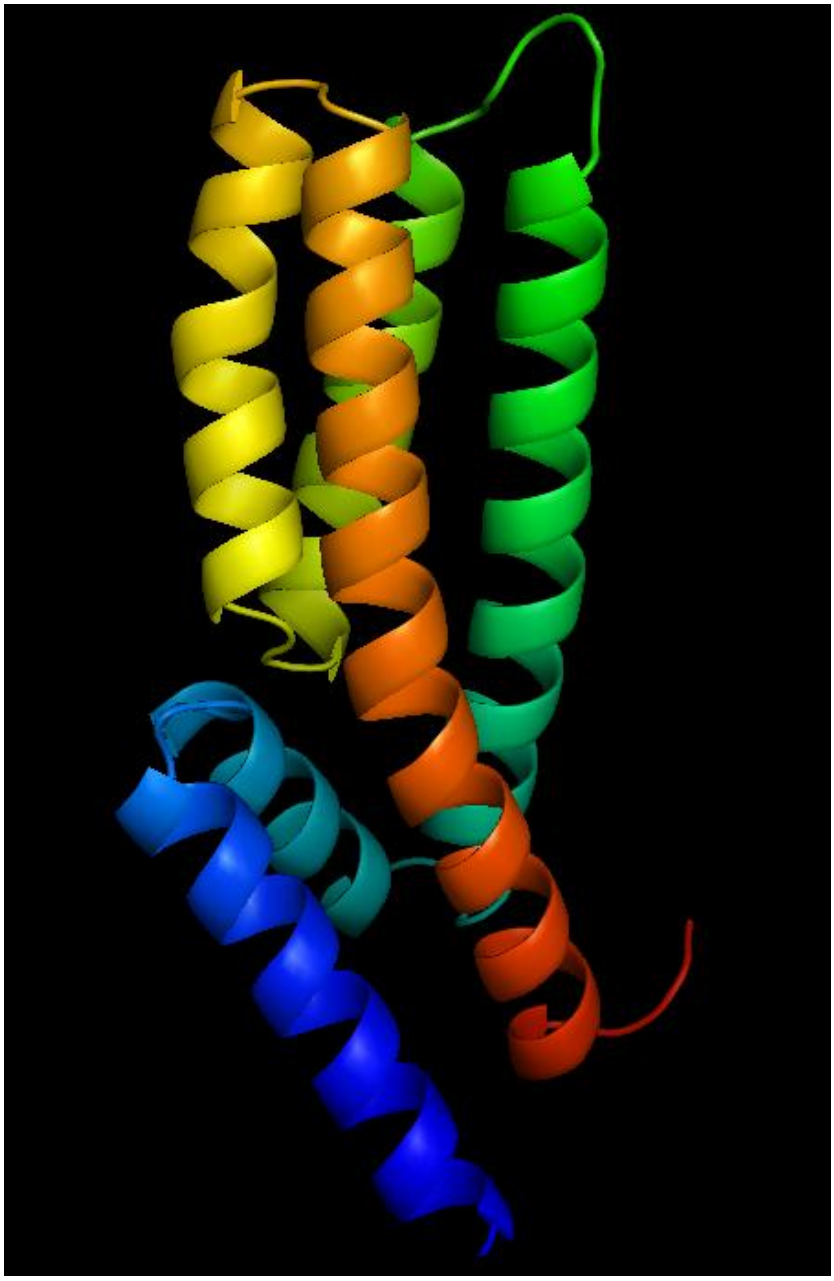


Şekil 1.7. A: histidin içeren fosfotransfer proteinlerinin (AHP'lerin) karakteristik özelliklerinin benzerliklerine göre sınıflandırılması. B: *Arabidopsis thaliana*'daki histidin içeren fosfofotransfer proteinlerinin aminoasit sekanslarının dizilimi (Hwang 2002).

AHP1 proteini 154 amino asitten oluşur ve molekül ağırlığı 17,615 Da'dur. AHP1 proteininin amino asit dizilimi şu şekildedir:

```
                10                  20                  30                  40
MDLVQKQKSL  QDYTKSLF  LEGILDSQFL  QLQQLQDESN
                50                  60                  70                  80
PDFVSQVVTL  FFQDSDRILN  DLSLSLDQQV  VDFKKVDPHV
                90                  100                 110                 120
HQLKGSSSSIG  AQRVKNACVV  FRSFCEQQNV  EACHRCLQQV
                130                 140                 150
KQEYYLVKNR  LETLFKLEQQI  VASGGMIPAV  ELGF
```

Resim 1.1'de AHP1 proteininin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Bunun için; AHP1 proteininin UniProt data bankından (www.uniprot.org) alınan amino asit dizilimi kullanılarak PyMOL programı ile çizilmiştir. Her bir α-helix grubu renklendirilerek belirgin hale getirilmiştir. AHP1'in diğer Hpt'ler gibi 4 α-helix içerdiği ve buna ek olarak fazladan 2 α-helix daha içerdiği görülmektedir.

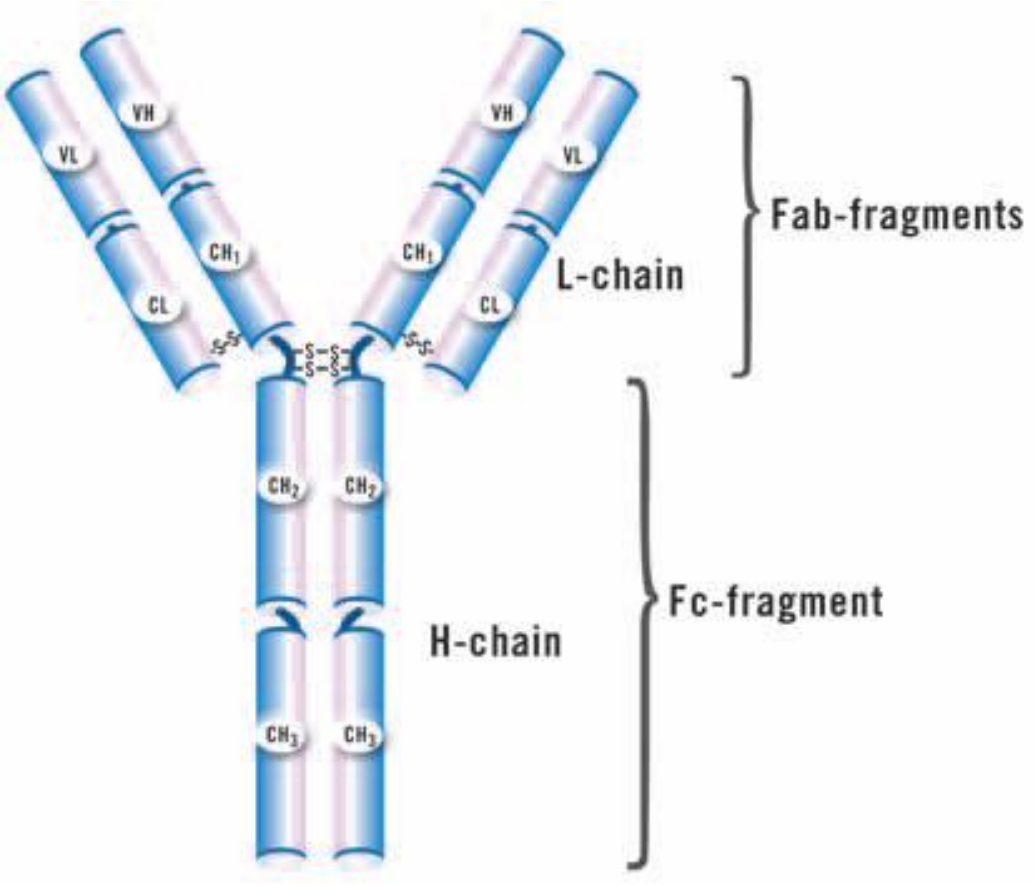


Resim 1.1. AHP1 proteininin PyMOL programı kullanılarak çizilmiş üç boyutlu yapısı.

1.4. Sitokinin Sinyalinde İmmünokimyanın Uygulanışı

1.4.1. Monoklonal Antikor Üretimi

Tüm immunoglobulinlerin kendine özgü, diğer immunoglobulinlerden farklı hassasiyeti vardır. Fakat yapıları benzerdir. Dört polipeptid zincirinden oluşur. Bunlardan ikisi özdeş ağır zincirdir. Her ikisi de oligosakkarit gruplarına kovalent olarak bağlanmışlardır. Diğer iki polipeptid ise özdeş non-glycosylated (L) hafif zincirdir. Bir disülfit bağı ağır zincir ve hafif zinciri bir arada tutar. Ağır zincirlerin arasında da disülfit bağı bulunur (Şekil 1.8). Bu disülfit bağları ***hinge*** adı verilen alanlarda konumlanmışlardır. Bu 12 aminoasitlik bölge, kimyasal veya enzimatik bölünme sonucu ortaya çıkmıştır. Küre biçimindeki her bir alan polipeptidlerin katlanmasıyla formunu oluşturmuştur. Dört polipeptid zinciri de sabit "C" ve değişken "V" bölümler içerir. Ağır ve hafif zincirler bir V bölümüne sahiptir. Hafif zincir aynı zamanda bir C bölümüne sahiptir. Ağır zincir ise üç C bölümü içerir. Ağır ve hafif zincirlerin her ikisindeki V bölümü de iki özdeş antijen bağlanma alanı bulundurur (bu alan antikorun antijene bağlandığı alandır). Antikorda plasental transport veya antijen bağlanmış hücresel toksikler gibi önemli fonksiyonların gerçekleştiği yapısal kısım immunoglobulinin Fc bölümüdür.

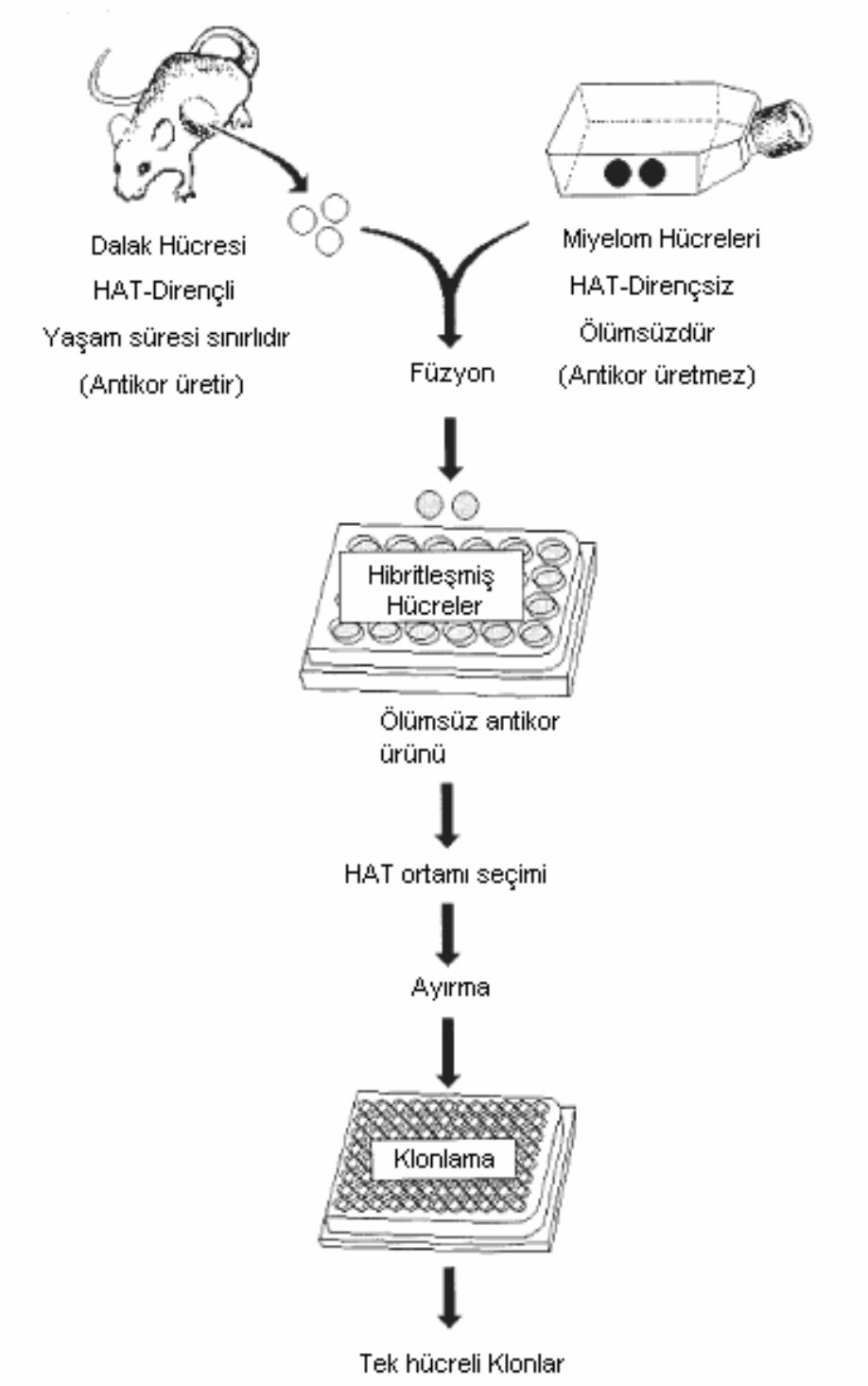


Şekil 1.8. Monoklonal antikorların genel yapısı.

George Köhler ve Cesar Milstein'in 1975 yılında "hibridoma teknolojisi"ni kullanarak monoklonal antikorların (mAbs) üretimini gerçekleştirmeleri sonucunda temel biyolojik araştırmalar ve klinik tıp alanlarında büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Fakat bu ilerlemelerin etkisi aynı süreç içerisinde tam olarak hissedilememiştir. mAbs'nin geliştirilmesi ve immunoloji dışındaki alanlarda da kullanılmaya başlanması 10 yıllık bir süreci kapsar. Günümüzde mAbs'nin kullanımı immunolojinin yanı sıra; hücre biyolojisi, biyokimya, mikrobiyoloji, viroloji, parazitoloji, psikoloji, genetik ve moleküler biyoloji; ve hatta klinik tıp alanında, patoloji, hematoloji, onkoloji bilim dallarında ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynamaktadır. 1984 yılında Köhler ve Milstein'ın tıp alanında Nobel Ödülü almasıyla mAb'lar hakkında yapılan araştırmalar artmaya başlamıştır.

Şekil 1.9'da hibritleştirme teknolojisinin basamaklarını içeren şematik sunum görülmektedir. Hibritleştirme teknolojisi için iki önemli noktadan birisi; immünize

edilmiş hayvanların antikor üreten lenfositlerinin in vitro koşullarda kültüre edildikleri zaman ömürlerinin çok kısa olması; diğeri ise her bir miyelom hücre ipliklerinin kalıcı olarak kültür içerisinde büyüyebilmesi, fakat elde edilen antikorların önceden belirlenmiş özgünlüklerinin olmamasıdır. Lenfosit ve miyelom hücreleri füzyona uğradığında, oluşan hibritler hem önceden belirlenmiş özgünlüğe sahip antikorları üretebilme özelliğine hem de sürekli büyüme özelliğine sahip olabilmektedirler. İmmunoglobulinleri üretebilen ve kültür ortamında yaşamalarını sürdürebilme yeteneğine sahip hibritleşmiş hücreleri elde etmek için immunize konakçının (örn, fare) dalak hücreleri miyelom hücreleri ile füzyona uğratılır. Dalak hücreleri arasındaki antikor üretebilen B lenfositler hibritleşmiş hücrelere immunoglobulin sentezleyebilme yeteneğini sağlayan hücrelerdir. B lenfositlerle füzyona uğrayan miyelom hücreleri (aynı türden alınmış miyelom hücreleri) ise hibritleşmiş hücrelere ölümsüz olma özelliğini sağlamaktadırlar. Miyelom hücreleri purin nukleotid biyosentezinde yan yolda görev alan bir enzim olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) enzimini kodlayan gende bir mutasyona sahiptir. Füzojen (örneğin polietilen glikol, PEG) kullanılmasıyla komşu miyelom hücrelerindeki ve / veya antikor salgılayan hücrelerdeki plazma membranları kaynaştırılırlar, ve iki veya daha fazla çekirdekli tek bir hücre oluşur. Bunu takip eden mitoz aşamasında kromozomlar kardeş hücrelere ayrılırlar. Hibritleşmiş hücreler hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren ortamda kültüre edilir. Aminopterin DNA ve RNA sentezi sırasında ana yolları engeller. Sentezin gerçekleşmesi ise RNA yolu için hipoksantin, DNA yolu için timidinin varlığıyla olur. Miyelom hücrelerinde HPRT enziminin olmaması nedeniyle miyelom hücreleri HAT içeren ortamda büyüyemezler ve füzyona uğramamış miyelom hücreleri ölürler. B hücreleri ürün oluşumunu sağlamak için yan yolu kullanılabilecek yapıdadırlar ancak kültürde uzun süre canlı kalamazlar. Bu nedenle sadece proliferasyon yapan hücreler hibritleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler tek hücreli klonlar oluşturmak üzere klonlanabilirler. Ve bu klonlar antijenik etkenlere karşı direkt etkili olabilecek monoklonal antikorlar oluşturur.



Şekil 1.9. Hibritleştirme teknolojisinin basamaklarını içeren şematik sunum (Freysdottir, 2000).

İmmunojen hazırlanırken, seçilen immunizasyon tipinin ve immunize edilecek hayvanın seçimi, antikor üretiminin amacına bağlıdır. Monoklonal antikorlar yapıları ve fonksiyonları önceden bilinen antijenlere karşı üretildiği gibi; henüz bilinmeyen yeni moleküllere karşı da üretilebilir.

Füzyon öncesinde bir tarama metodunun belirlenmiş olması önemlidir, bu metod mAbs nin potansiyel kullanımına göre değişir. Aynı zamanda birkaç ayırma metodu da (doku kesitlerinin immunolojik boyanması (immunostaining of tissue sections/cytospins), Western Blot, flow cytometry ve enzim tutturulmuş immunosorbent çalışması (ELISA)) kullanılabilir. (Freysdottir, 2000)

1.4.2. İmmünomodülasyon

Antikor mühendisliği ve antikor üretimi moleküler biyoloji alanında çok hızlı ilerleyen bir alandır. Rekombinant DNA teknolojisi ile genlerin manipülasyonu; çeşitli organizmalardan veya bitkilerden alınabilen, spesifik ankorlar veya antikor fragmentlerinin üretimini mümkün kılmıştır.

İmmünomodülasyon tekniği bize sınırsız internal antikor (intrabodies) üretme olanağı sağlar. Protein fonksiyonlarını inhibe edebilecek antikorların üretilmesi sinyal mekanizmaları üzerindeki çalışmalarda çok önemli bir yer tutar. İmmünomodülasyon çalışmaları için spesifik ve yüksek saflıkta antikor elde edilmiş olunması önemlidir. Bitkiden elde edilen antikorun afinite sabiti, proteinlerin veya ligand ve proteinlerin bağlama sabitinden daha yüksek olmalıdır. Bunların yanı sıra antikor fonksiyonel bölümü fark edebilecek yapıda olmalıdır.

İmmünomodülasyon yaklaşımında, monoklonal antikorların kullanımında en kritik iki nokta; hibridomalardan seçilen klonlanmış scFv'lerin (single chain fragments) duyarlılığını kaybetmesi ve/veya in vivo koşulların antikorları negatif yönde etkilemesidir. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için antikorlardan oluşmuş bir panel kullanılabilir. ELISA yönteminin yanı sıra; antikorlar arası farklılıkları tanımakta fazla spesifik olmayan Western Blot tekniği de tercih edilebilir. Optimal immünomodülasyon koşullarının yaratılması için seçilmiş antikorların duyarlılığının ve epitop hassasiyetinin karşılaştırılması gereklidir.

Seçilmiş antikorların *E. coli*'den saflaştırılması ile sabit ve değişken koşullardaki stabilitesi kontrol edilebilir.

1.5. Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Monoklonal antikorlar protein, DNA veya küçük ligandların belirlenmesinde ve ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Yakın geçmişte monoklonal antikorların; pek çok hastalığın teşhisi, tedavisi ve hatta pasif bağışıklık kazandırarak hastalıklardan korunmada kullanılmasıyla tıp alanında da önemli bir yer almıştır. Yapılan yeni araştırmalarla monoklonal antikorlar immünomodülasyon yöntemleri kullanılarak fonksiyonel çalışmalarda moleküllerin elimine edilmesinde kullanılmaya başlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kakimoto ve ark. (1998), sitokininin bitki gelişiminde temel rolü üstlenmesine karşın, sitokininin; biyosentez, distribüsyon, dağılım ve sinyal transferinin sınırlı olduğu bilinmektedir. Günümüzde geçerli olan moleküler genetik çalışmalar, sitokinin sinyal yolunda iki bileşenli sistemleri de kapsar. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışma sonucunda sitokinin sinyali sırasında değişik sitokinin cevapları ve genleri içeren yeni mutantlar bulunmuştur.

Clark, B. G. ve ark. (2001), bazı temel sinyalizasyon mekanizmalarında değişik uyarıcı – yanıtlayıcı tepkime yolları üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada; kalsiyum bazlı sinyalizasyon, G-protein aracılığıyla gerçekleşen sinyalizasyon ve inositol fosfolipitler içeren sinyalizasyon mekanizmaları ve sinyalizasyonda görev alan protein kinazlar ile fosfatazlar hakında tartışılmıştır. Çarpıcı bir sonuç olarak makalede büyüme ve gelişmede etkili olan üç ekstraselüler bileşeninin (ekstraselüler calmodulin, ekstraselüler ATP ve integrin reseptörleri) sinyal sinyal iletiminde görev almadıkları saptanmıştır.

Hwang I. ve ark. (2002), prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde histidin protein kinazın iki bileşenli sistemde sinyal giriş ve çıkışında aracı olarak görev yaptığını vurgulamıştır. Arabidopsis'teki sinyal iletiminde 54 histidin protein kinazının tanımlanması, histidin içeren fosfotransfer proteinleri, yanıtlayıcı düzenleyiciler ve ilgili proteinler iki bileşenli fosforilizasyonda önemli rol oynadığı bulunmuştur.

Gülaçtı ve ark. (2004), sığır vebası virüsünün (RPV) hemaglutinin proteinine (H) karşı monoklonal antikor (MA)'ların üretimini ve bu antikorların karakterize edilmesini amaçlamışlardır. Mevcut çalışmada, ilk olarak, RPV'nin aşı suşuyla (RBOK) immunize edilen farelerin dalak hücreleriyle myeloma hücrelerini (FO) polietilen glikol-dimetil sülfoksid (PEG/DMSO) yardımıyla füzyon işlemi uygulamışlardır. Hibrid hücrelerin seçimini hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) içeren hücre kültür vasatında gerçekleştirmişlerdir. Sığır vebası virüsüne karşı antikor salgılayan hibrid hücre kuyucuklarının seçimini enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) ile yapmışlardır. Limiting dilusyon işlemini takiben gerçekleştirilen sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve immunblotting

ile H proteinine karşı antikor salgılayan klonları belirlemişlerdir. Klonlara ait antikorların alt tipleri ve nötralizasyon etkileri gibi bazı özelliklerini karakterize etmişlerdir. Bu çalışma ile, RPV virüsünün hemaglutinin proteinine karşı MA'ların üretilmesi ve bu antikorların karakterize edilmesini gerçekleştirmişlerdir.

Ferreira ve Kieber (2005), çalışmalarına göre sitokinin sinyalini anlatan geçerli çok basamaklı fosforilasyon modeli prokaryotik hücrelerdeki iki bileşenli sistemle aynıdır. Son günlerde, sitokinin sinyalinin temelini oluşturan moleküler mekanizmayı daha iyi anlamamızı sağlayacak ilerlemeler kaydedilmiştir. Mutantlar üzerine yapılan moleküler ve genetik araştırmalar sonucunda iki bileşenli elementlerin sitokinin sinyalinde gerekli olandan fazla ve sinyali olumsuz yönde etkileyici rollerinin olduğu açıklanmıştır. Bu elementlerin üretken bitkilerin kök ve filizindeki meristemleri regüle ettiklerini ve sonuçta nutrient seviyesinde değiştirerek cevabı modüle ettiklerini kanıtlamışlardır.

Hutchison ve ark. (2006), yaptıkları çalışma sonucu AHP1,2,3,4,5 mutantlarının verimliliği düşürmek, tohumun büyüklüğünü arttırmak, damarların büyümesini yavaşlatmak ve ana kökün kısalmasını sağlamak gibi büyüme ve gelişmeyle ilgili bazı anormalliklere neden olduklarını ispatlamışlardır. Bu bilgilere dayanarak AHPs'in fazlasının gereksiz olduğunu miktarın yeterli olduğu takdirde AHPs'in sitokinin sinyalinde ve bitkinin gelişiminde pozitif regulatör olarak rol aldıklarını göstermişlerdir.

Dortay ve ark. (2006), bitki hormonu olan sitokinin sinyalinin histidin kinaz sensörü tarafından algılanması ve bitkinin iki bileşenli sistemini oluşturan diğer sistemlere transferinin sağlanması üzerinde çalışmışlardır. Sinyal mekanizmasının açıklanabilmesine rağmen birçok bileşenin bulunduğu sistemde hangi bileşenin biyolojik prosesi yavaşlatıcı yönde etki gösterdiğinin anlaşılması çok zordur. Çalışmanın amacı Arabidopsis sitokinin sinyal yolunda en çok hangi bileşenlerin etkileşim gösterdiğinin araştırılmasıdır. Sonuç olarak %90'ından fazlası in vitro koşullarda saflaştırma nedeniyle olmak üzere 42 yeni etkileşim bulunmuştur. Bu çalışma, sitokinin sinyal sisteminde anlaşılamayan protein etkileşimlerini tanımlamak için yapılacak in planta fonksiyonel çalışmaları öncesinde çalışmaların iskeletini oluşturacak niteliktedir.

Tamaki ve ark. (2007), çalışmalarıyla fotohormonların azot açısından eksik, root-shoot sinyalinde olası rollerini tanımlamayı amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda ananas bitkisinde azot varlığında, yukarıya doğru sitokininle ve aşağıya doğru auxinle sinyal yolu olduğu saptanmıştır.

Bukovsky ve ark. (2008), yaptıkları çalışma sonucunda ZP2, ZP3 ve ZP4 baculovirus rekombinantlarına karşı monoklonal antikor üretmişlerdir. Spesifik zona proteinlerini tanımlamada ELISA ve Western Blot yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda MAbs üretimi ile zona proteinlerine karşı spesifik monoklonal antikorlar üretilebilmişler ve immunobiyolojik çalışmalar için yararlı sonuçlar elde etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araç ve gereçler: Spektrofotometre (Spectronic Unicam), Mini-Protean 3 aparatı, PowerPac Basic güç kaynağı (bio-Rad), Power Pac P25 güç kaynağı (Biometra), "semidry" eloktrotransfer aparatı: Fast blot 33 (Biometra), Biometra WT 12, Mikrotiter plakaları için Spektrofotometre – Sunrise (Tecan), Thermomixer 5437 (Eppendorf), karıştırıcı inkübatör Multitron II (HT Infors), FPLC ÄKTA, Frac-950 (GE Healthcare), Hiload 16/60 Superdex-75 (GE Healtcare), Ultrasantrifüj cihazı J-301 (Beckamn), Ultrasonik Sonikatör UP 100 H prob MS/ (Hielscher), PVDF membran (Immobilon^{TM}), mikroplaka (Sarstedt), Ni Sepharose High Performance kolonu (Amersham Bioscience), santrifüj filtrasyon kolonu Amicon® Ultra-4 30 000 NMWL (Milipore).

3.2. Metod

3.2.1. Protein Tayini

Protein derişiminin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Bu yöntem için gerekli kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için standart olarak saf BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Seyreltilmiş lizat veya saflaştırılmış proteinin 10mL'si alınır. Reaksiyon karışımı 790 mL saf su ve 200 mL Bradford Coomassie Brilliant Blue Protein eklenir. Karışım iyice karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 595nm dalga boyunda absorbansı ölçülür. Örneğin protein derişimi kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır.

3.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Örneklerin SDS-PAGE analizleri için Laemmli (1970) tarafından bildirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. SDS-PAGE için çizelge 3.1'deki alt jel bileşimi ve çizelge 3.2'deki üst jel bileşimi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için alt jelin bileşimi.

Alt Jel (% 15)	Hacim (µL)
Bis-akrilamid çözeltisi (% 30)	2500
Jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	1250
Saf su	1200
SDS (% 10)	50
Amonyum persülfat (% 10)	50
TEMED (Hazır Çözelti)	3

Karışım iyice karıştırılır ve daha önce hazırlanmış iki cam arasına doldurulur. Yukarıdan 2,5 cm boşluk bırakılır. Oksijenle reaksiyonunun engellenmesi için su eklenir ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için bekletilir.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE için üst jelin bileşimi.

Üst Jel	Hacim (µL)
Bis-akrilamid çözeltisi (%30)	250
Jel tamponu (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	400
Saf su	800
SDS (% 10)	16
Amonyum persülfat (% 10)	25
TEMED (Hazır Çözelti)	1

Oksijenle tepkimeyi engelleyen su çıkarılır. Üst jel için hazırlanan karışım eklenir. İstenilen sayıda kuyucuğa uygun tarak takılır. Polimerizasyon işlemi için en az 20 dakika beklenir. Yürütücü tampon olarak 25mM Tris-Cl pH 8,3, 192 mM glisin, % 0,1 SDS'den oluşan çözelti kulanılır. Elde edilen örneklere 200 mM TrisCl pH 6,8, 400 mM DTT, % 8 SDS, % 0,4 bromfenol mavisi, % 35 gliserol'den oluşan çözelti 4:1 oranında eklenir, vortekslenir ve 95°C'de 10 dakika inkübe edilir. Hazırlanan örnekler kuyucuklara enjekte edilir. Güç kaynağı 25mA'e ayarlanır ve örnekler 1 saat süresince yürütülür. Elektroforez işlemi sonunda jeller comassie brillant blue ile boyanır veya Western Blot analizinde kullanılır.

3.2.3. Western-Blot Analizi

PVDF membran kağıtları kesilerek hazırlanır. Membran kağıdının hidrofobik özelliğini azaltmak için metanol içerisinde 15 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika transfer çözeltisinde bekletilir. Elektrotransfer cihazının anot kısmından başlamak koşuluyla sırasıyla; iki filtre kağıdı, membran, jel ve iki filtre kağıdı konularak membranın cm^2'sinden 2mA'lik akım geçecek şekilde akım uygulanır ve başlangıç voltajı 100-120V arasında olmalıdır. Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran bir gece hazırlanan bloklama çözeltisi (TBST(50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl,, % 0,1 Tween-20) içerisinde% 5'lik süt (100 mL için 5 g süt tozu + 95 g TBST)) içerisinde bekletilir. Gün aşımından sonra çözelti ortamdan uzaklaştırılır ve birincil (üretilen monoklonal antikorlar) antikor membrana eklenir. Oda sıcaklığında 1 saat süren inkübasyon işleminden sonra TBST çözeltisi ile membran 3 kere beşer dakikalık sürelerle yıkanır. Daha sonra membran uygun oranda (1/20) TBST çözeltisi ile seyreltilmiş ikincil antikor(alkalin fosfat ile konjuge edilmiş anti-fare IgG serumu) eklenir ve bir saat inkübe edilir. Membran tekrar aynı şekilde yıkanır. 30 mL belirleme (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) çözeltisi eklenir ve 10 dakika inkübe edildikten sonra karanlık odada taze hazırlanan kromojenik substrat (30 mL belirleme çözeltisi, 150 μL NBT (4-nitroblue tetrazolium, konsantrasyonu %70 DMF içerisinde 100 mg/mL), 100 μL BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate, konsantrasyonu %100 DMF

içerisinde 50 mg/mL)) eklenir. 5 dakika içerisinde sonuç elde edilir ve su ile yıkanılarak reaksiyon durdurulur. Membran kağıt havlu üzerinde kurutulur.

3.2.4. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

50mM Bikarbonat Çözeltisi, pH 9,6

15 mM $NaHCO_3$

35 mM Na_2CO_3

PBS-T çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline - Tween), pH 7,2

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na_2HPO_4

2 mM KH_2PO_4

%0,05 Tween

Bloke edici çözelti: 1% BSA ve PBS-T

Substrat: 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin, hidrojen peroksit ve stabilizatörler içeren hazır çözelti (TMB Complate).

Durdurucu çözelti: 1M H_2SO_4

Antikorlar:

Birincil antikorlar: bloke edici çözelti içerisinde 1-4 µg/mL, supernatant ise çözülmeden kullanılmıştır.

İkincil antikorlar: HRP ile konjuge edilmiş Anti Mouse IgG (Sigma) bloke edici çözelti içerisinde 0,5-2 µg/mL oranında kullanılmıştır.

Mikroplaka 200 µL saf su ile yıkanır. Ters çevrilerek suyun tamamının uzaklaştırıldığından emin olunur. Antijen BiC çözeltisi içerisinde 5 µL/mL oranında seyreltilir. Karıştırıcıda iyice karıştırlarak 4 °C'de bir gece inkübe edilir. 96 kuyucuk yıkama çözeltisi 200 µL eklenerek 4 kere yıkanır. Kağıt havlu üzerine ters çevirilerek sıvının uzaklaştırılması sağlanır. Fakat mikroplakanın tamamen kurumasına izin verilmemelidir. Mikroplaka kuyucuk başına 150 µl bloke edici çözelti ile bloklanır. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Bu işlemden sonra microplate tekrar yıkanır. Birincil antikor 100 µL/kuyucuk oranında

kuyucuklara eklenir. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Microplate yıkanır ve ikincil antikor eklenir. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Microplate tekrar yıkanır ve 100 µL TMB substratı eklenir. 37 °C'de karıştırıcı içerisinde 10 dakika inkübe edilir. Eklenen substrat ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlık ortamda uygulanmalıdır. Daha sonra yıkanmadan 50 µL durdurucu çözelti eklenir ve 450 nm dalga boyunda 30 dakika içerisinde absorbans ölçümü yapılır.

3.2.5. AHP1 Proteininin Saflaştırılması:

Sonikasyon Çözeltisi:

20 mM Tris, pH 7,9
300 mM NaCl
% 10 gliserol
3,5 mM merkaptoetanol
20 mM imidazol
% 0,1 TritonX100

Afiniti Kromatografisi için A Tamponu:

50 mM Tris, pH 7,9
300 mM NaCl
% 10 gliserol
3,5 mM merkaptoetanol
20 mM imidazol

Afinitie Kromatografisi için B Tamponu:

50 mM Tris, pH 7,9
300 mM NaCl
% 10 gliserol
3,5 mM merkaptoethanol
500 mM imidazol

Saflaştırma işlemine başlanmadan önce bakteriyel lizat hazırlandı. Bunun için 1 L bakteri kültüründen elde edilen pellet 20 mL sonikasyon çözeltisi içerisinde 4

C'de süspanse edildi. Hücreler ultrasonikatörde 40 W güç altında 1'er dakika olmak üzere 7 kere ultransonikasyona maruz bırakıldı. Daha sonra 4 C sıcaklıkta 40 dakika 47500 g'de santrifüj edildi.

Saflaştırma işlemi afinite kromatografisi uygulanarak tek basamakta tamamlandı. Matriks olarak Ni Sepharose High Performance kullanıldı. Matriks ilk önce 50 mM $NiSO_4$ çözeltisi ile dolduruldu. Önce ddH_2O ile daha sonra ise A tamponu ile yıkandı. Bakteriyel lizat kolona yüklenmeden önce 0,2 µm gözenek büyüklüğündeki mikrofiltreden geçirilip daha sonra kolona yüklendi. Yükleme işleminden sonra kolon A ve B tamponları ile yıkandı. Daha yüksek molaritede imidazol içeren B tamponunun kullanılmasıyla protein kolondan alındı.

3.2.6. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması:

Ön Yıkama Çözeltisi

20 mM Sodyum fosfat, pH 7,0

Elüsyon Çözeltisi

Glisin-HCl, pH 2,7

Nötralizasyon Çözeltisi

1M Tris-Cl, pH9,0

Monoklonal antikorların hazırlanması Masarykova Veterinerlik Fakültesi ile iş birliği içerisinde tamamlanmıştır. Aşılama, füzyon ve klonlama işlemleri veterinerlik fakültesi tarafından tamamlanmıştır. Bu işlemler için hibridoma teknolojisi kullanılmıştır. Antikorların seçimi, saflaştırılması ve immunoanalizi ise merkez laboratuarlarımızda tamamlanmıştır. Saflaştırılacak hibridomaların seçimi ELISA ve Western Blot teknikleri uygulanarak yapılmıştır.

ELISA ve Western Blot teknikleri uygulanarak seçilen hibridomalar kültür ortamında yeterince geliştikten sonra saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Supernatantların hacmi 60-100 mL arasındadır. Supernatantlar kromatografik kolona yüklenmeden önce 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip mikrofiltrelerden geçirilmiştir. Saflaştırma kolonu olarak protein G immobilize edilmiş matriks kullanılmıştır. Kolon 20 mM sodyum fosfat çözeltisi ile yıkanmıştır. Böylece IgG

antikorlarının, protein G'ye bağlanabilecekleri nötr ortam sağlanmıştır. Süpernatantların kolona girişi için 200 µL/dakika hızı seçilmiştir. Daha sonra tekrar 20 mM sodyum fosfat çözeltisi ile yıkanır. Böylece Protein G'ye bağlanmayan proteinler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra Glisin – HCl pH 2,7 çözeltisi kullanılarak antikorlar kolondan ayrılmıştır. Nötralizasyon için 1 M Tris – Cl ph 9,0 çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra antikorlar membran içeren antikor derişimini arttırmak için elüat ayırma tüplerinde santrifüj edilmiştir. Daha sonra konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenmiştir.

3.2.7. Epitop Haritalandırılması

Tripsin 0,05 µg/µl;

Çöktürme: 3 saat 35 °C; Seyreltme: 1:50 protein.

Enzimler için tampon:

25mM Amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) pH = 7,5

IP tamponu (1L için):

50 ml 1 M Tris 7.4,

62.5 ml 4 M NaCl,

5 ml Triton X-100,

1 ml 1 M DTT,

100 ml gliserol

1 L'ye tamamlayacak kadar ddH_2O

Elüsyon Çözeltisi

Glisin-HCl, pH 2,7

50 µL'lik tripsin ile çöktürme reaksiyonu için 25 µL tripsin 22 µL tampon kullanılır. Bir gece 50 °C altında inkübasyon işlemi uygulanır. 5 µL alınır ve MS işleminde kontrol işlemi için saklanır. 0,5 µL 10 mM'lık leupeptin eklenir ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 100 µg antikor eklenir ve 400 µL PBS ile çözülür. 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 100 µL protein A/G gel slurry eklenir ve bir gece 4 °C sıcaklıkta 20 rpm dönme hızında inkübe edilir. Immunoprecipitation işlemi için

A/G protein (Pierce) protokolü uygulanır. IP tamponu hazırlanır. Yıkama işlemi için Glisin tamponu (düşük pH, MS analizi sırasında girişmde bulunabileceğinin hatırlanması gereklidir) kullanılır. İki aşamada yıkama işlemi gerçekleştirilir. Yıkama işlemi için toplamda maksimum 30 µL tampon kullanılabilir.

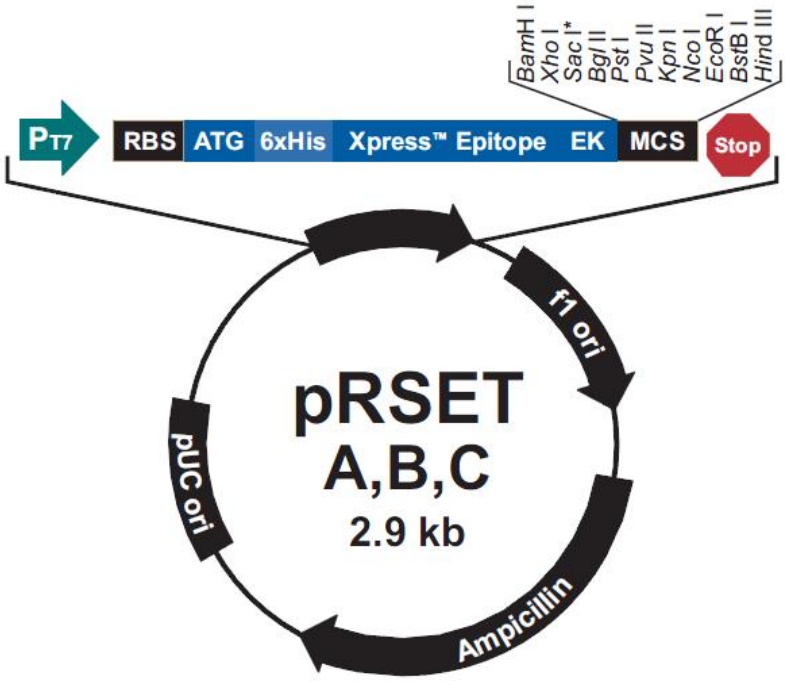
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Antijenin Saflaştırılması

4.1.1. Ekspresyon İşleminin Optimize Edilmesi

Rekombinant DNA'ların hazırlanması RNDr. Eliška Nejedlá tarafından tamamlanmıştır. *E. coli* hücresinden protein ekspresyonu metotları ile protein saflaştırma metotlarının optimizasyonu Mgr. Radka Dopitová tarafından geliştirilmiştir.

Şekil 4.1'de ekspresyon işleminde kullanılan vektör görülmektedir. Vektör RBS (ribozom bağlama alanı), ATG (iniciation codon), 6xHis (6 histidin için sekans kodlayıcı) ve Xpress epitop içerir. Faj T7'dan gelen gen 10 transkripti stabilize eder. Bu multiklonal alandan önce enterokinazın bulunur. His tag vektörden kesilmek istenildiğinde kullanılır.

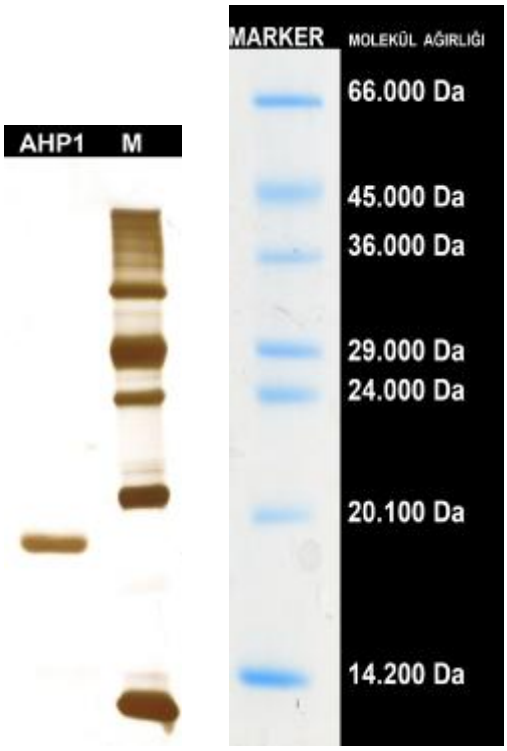


Şekil 4.1. Ekspresyon işleminde kullanılarn vektör.

AHP proteini üzerine biyokimyasal çalışmada ilk basamak AHP1 içeren rekombinant DNA üretimidir. Temel olarak amaç saflaştırmanın ve analiz işlemlerinin daha kolay yapılabilmesini sağlamaktır. Yapıdaki N-terminali üzerine oligohistidin-tag tutturularak üretilmiştir. cDNA'dan elde edttiğimiz sekanslar PRSET vektörüne eklenir bu durumda tüm 6 histidini de içeren vektör elde edilmiş olur. T7 promoter'ının kontrolü altında füzyon proteinin kodlanması ile (His)6-AHP1 rekombinant yapısı elde edilir.

4.1.2. Saflaştırma

Resim 4.1'de saflaştırma işlemi sonucu elde edilen AHP1 proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir. AHP1 ile ifade edilen sütunda bulunan bant AHP1 proteinine aittir. AHP1 proteininin molekül ağırlığı UniProt data bankından alınan bilgiye göre 17,615 Da'dur. Analiz sonucunda AHP1 proteininin tek bir bant halinde görülmesi proteininin yüksek saflıkta olduğunun göstergesidir. Saflaştırma işlemi sonrası tüm deneylerde, antijen olarak analizi yapılan şekil 4.1'deki protein kullanılmıştır.



Resim 4.1. Saflaştırma sonucu elde edilen AHP1 antijenine ait SDS-PAGE görüntüsü.

4.2.Antikorların Seçimi

4.2.2. Aşılama

Aşılama aşamasında her iki fare de 1/10/08 tarihinde ve 21 gün sonra 22/10/08 tarihinde 4'er kere aşılandı. 35 gün sonra 6/11/08 tarihinde farelerden biri öldürüldü ve dalak hücreleri homojenize edildi ve miyelom hücreleri ile füzyona uğratıldı. Birinci fareye uygulanan füzyon işlemi başarısız sonuçlandı. Bu yüzden ocak ayında ikinci fare ile aşılama işlemine tekrar başlandı. 14/1/09 tarihinde fare ikinci defa aşılama yapıldı ve yapılan testler sonucunda aşılama işleminin başarılı olduğu gözlendi. 19/1/09 tarihinde ikinci fare 4 kere daha aşılama yapıldı. Bu işlemden sonra füzyon işlemi uygulandı. Monoklonal antikorların üretimi ikinci aşılama sonucu elde edilen miyelom hücrelerinin füzyonundan sonra gerçekleşmiştir. (Aşılama ve füzyon aşamaları Masarykova Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi tarafından tamamlanmıştır.)

4.2.3. Hibridomaların Füzyonu

İlk aşılamadan 35 gün sonra ratlardan biri öldürüldü ve dalak hücreleri homojenize edildi. Daha sonra miyelom hücreleri ile HAT içeren ortamda füzyona uğratıldı. Bu ortamda füzyon girmeyen miyelom hücreleri ölür.

Amaç HAT dirençli yaşama süresi sınırlı fakat antikor üretebilen dalak hücrelerinin, HAT dirençsiz yaşama süresi sınırsız fakat antikor üretemeyen hücreler ile füzyonunu gerçekleştirerek, yaşam süresi sınırsız ve antikor üretebilen yeni hibritleşmiş hücreler elde etmektir. Fakat ilk füzyon sonucunda test edilen süpernatantlardan pozitif sonuç elde edilemedi. Bu yüzden ikinci fareye tekrar aşılama yapıldı ve füzyona uğratıldı. Elde edilen süpernatantların test edilmesi sonucunda ikinci fareden elde edilen dalak hücrelerinin füzyonunun başarılı olduğu gözlendi. Üretilen monoklonal antikorlar ikinci füzyon sonucu elde edilen hücrelerden elde edilmiştir.

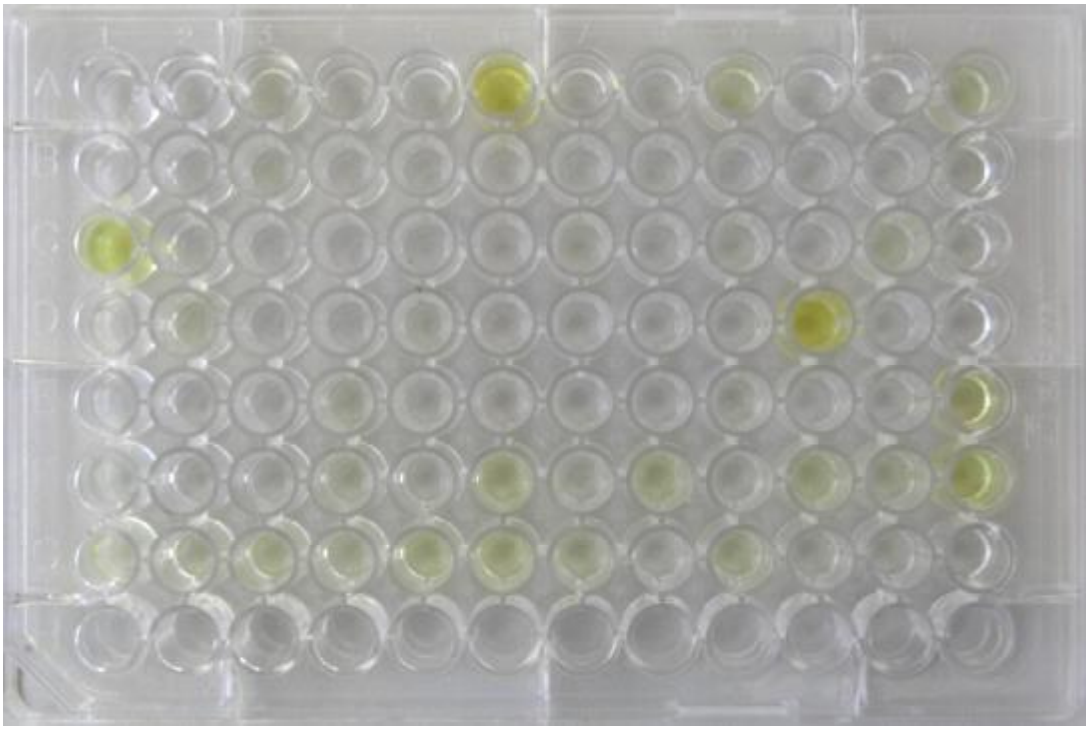
4.2.4. Monoklonal Antikorların Seçimi

Süpernatantların seçimi için 1500 süpernatant ELISA yöntemi ile test edildi. ELISA yöntemi ile 264 pozitif sonuç elde edildi ve bu pozitif sonuçlar arasından en spesifik ve en verimli olanlarını ayırabilmek için Western Blot yöntemi uygulandı. Bu yöntem doğal formdaki antikorlar arasından hangisinin monospesifik karakterde, hangisinin polispesifik karakterde olduğunun analizini sağladı. Sonuçta monoklonal antikorların karakteri hakkında detaylı bilgi elde edildi.

4.2.4.1. ELISA Yöntemi

Seçim aşamasında uygulanan ilk yöntem ELISA'dır. ELISA ile AHP1 proteinine karşı hangi süpernatantın ne ölçüde etki ettiği araştırıldı. Elde edilen sonuçlar ışığında aynı süpernatantın AHP1 dışında hangi proteinlere karşı etkili olduğu ise Western Blot yöntemi kullanılarak incelendi.

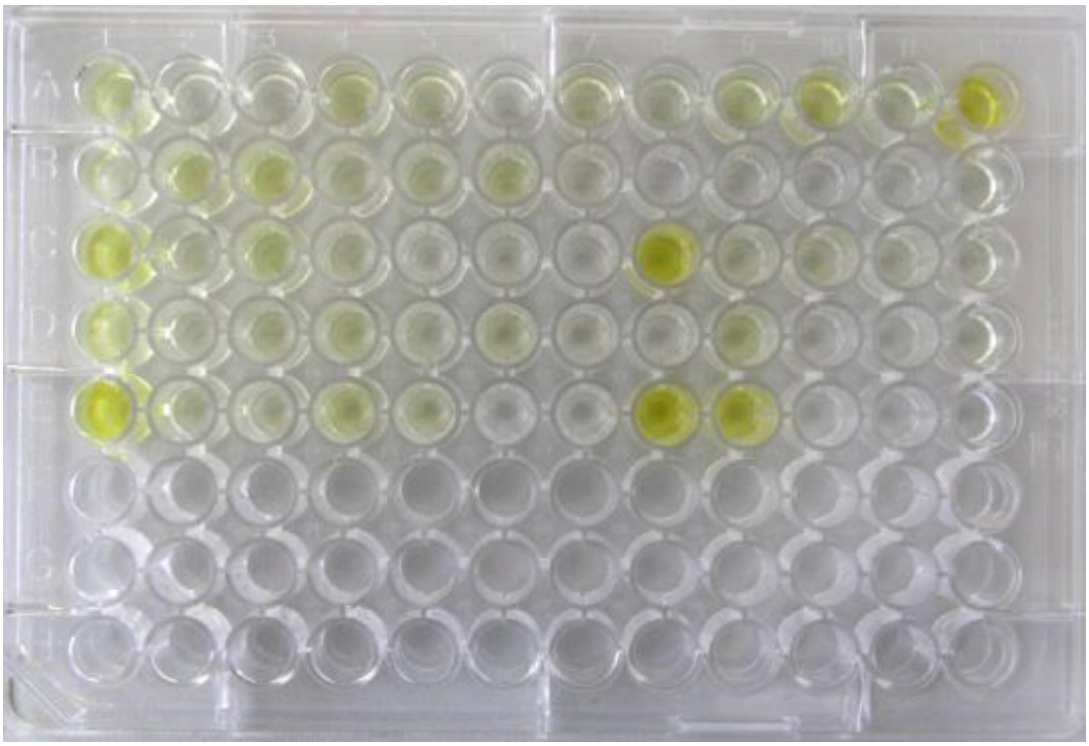
Resim 4.2 ve resim 4.3'teki 96 kucuklu mikroplakalar süpernatantların AHP1 antijenine karşı etkinliğini ölçmek için uygulanan ELISA yönteminin sonuçlarını göstermektedir. 96 kuyucuklu mikroplakalar 450nm'deki absorbans değerlerinin yanı sıra görsel olarak da değerlendirilmiştir. Sarı renkli kuyucuklar pozitif sonuçları yani denenmiş olan süpernatanttaki proteinin antijene bağlandığını işaret eder. Sarı rengin koyuluğunun absorbansın bir ölçüsü olduğunu ve koyulukla absorbans değerinin doğru orantılı olarak arttığını söyleyebiliriz. Kesin bir sonuç elde etmek için 96 kuyucuklu mikroplakanın absorbans değeri mikroplaka okuyucuda ölçüldü. Elde edilen sonuçlar en iyi süpernatantın seçimi için bize ön fikir edinmemizi sağladı. Absorbans değeri en yüksek olan süpernatantlar seçilerek Western Blot tekniği uygulandı.



Resim 4.2. Süpernatantların AHP1 antijenine karşı etkinliklerinin ölçüldüğü 1 numaralı 96 kuyucuklu mikroplaka.

Çizelge 4.1. 1 numaralı 96 kuyucuklu mikroplakanın, mikroplaka okuyucusundan elde edilen absorbans değerlerini gösteren çizelge.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,106	0,1138	0,2617	0,2345	0,1568	0,7986	0,1909	0,1974	0,348	0,1262	0,1807	0,371
0,1558	0,1143	0,2493	0,2151	0,1891	0,2173	0,157	0,1817	0,1318	0,1334	0,1981	0,255
0,6575	0,1825	0,1162	0,0868	0,1453	0,1681	0,2424	0,1937	0,2282	0,1686	0,3191	0,2578
0,2165	0,2747	0,1715	0,1578	0,2401	0,1402	0,15	0,187	0,1023	0,943	0,1316	0,179
0,1639	0,1596	0,1427	0,2591	0,1802	0,2056	0,1742	0,1645	0,2392	0,1525	0,2186	0,5302
0,2186	0,1911	0,1989	0,2686	0,2056	0,3647	0,282	0,3646	0,2182	0,3935	0,3406	0,4607
0,2863	0,2835	0,3399	0,3094	0,3815	0,4216	0,3278	0,2237	0,3709	0,2534	0,26	0,2658
0,0517	0,0499	0,0483	0,0484	0,0516	0,0719	0,0481	0,0482	0,0524	0,0484	0,0485	0,0518



Resim 4.3. Süpernatantların AHP1 antijenine karşı etkinliklerinin ölçüldüğü 2 numaralı 96 kuyucuklu mikroplaka.

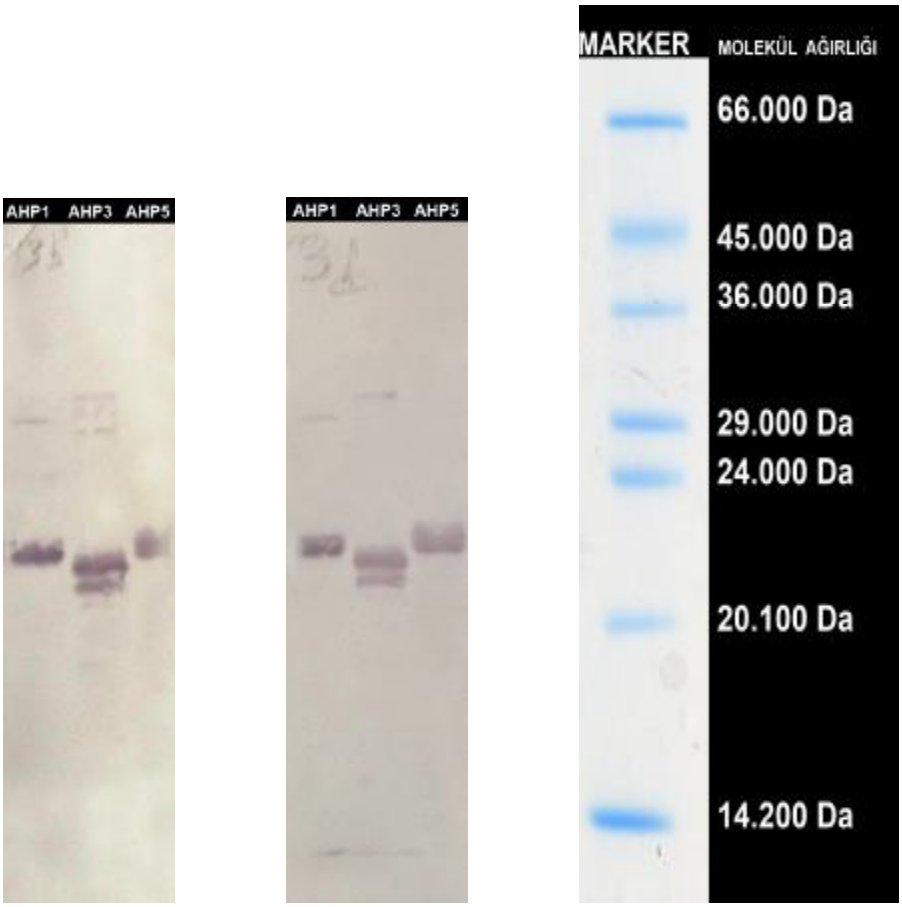
Çizelge 4.2. 2 numaralı 96 kuyucuklu mikroplakanın, mikroplaka okuyucusundan elde edilen absorbans değerlerini gösteren tablo.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,4415	0,1963	0,2164	0,3772	0,2879	0,1938	0,3077	0,2784	0,3329	0,5022	0,269	1,0354
0,2951	0,3936	0,4291	0,2863	0,2944	0,3358	0,2528	0,1453	0,1903	0,152	0,1711	0,2523
0,6441	0,2478	0,358	0,2705	0,2039	0,2028	0,1918	0,886	0,2784	0,2944	0,2616	0,2748
0,3794	0,2257	0,2945	0,3153	0,2445	0,3103	0,2121	0,188	0,3487	0,2	0,2193	0,2738
0,8192	0,2423	0,2613	0,3744	0,2902	0,1122	0,1749	0,9601	0,7981	0,0439	0,0412	0,0441
0,056	0,0497	0,0526	0,0504	0,0506	0,0504	0,0499	0,0523	0,0498	0,0488	0,0538	0,0553
0,0515	0,0535	0,05	0,0533	0,0485	0,0486	0,0567	0,0484	0,0503	0,0503	0,0492	0,0506
0,0491	0,0493	0,0488	0,0484	0,0508	0,0506	0,0481	0,052	0,0547	0,0495	0,0527	0,0502

4.2.4.2. Western Blot Tekniği

4.2.4.2.(1). Polispesifik Karakterdeki Süpernatantlar

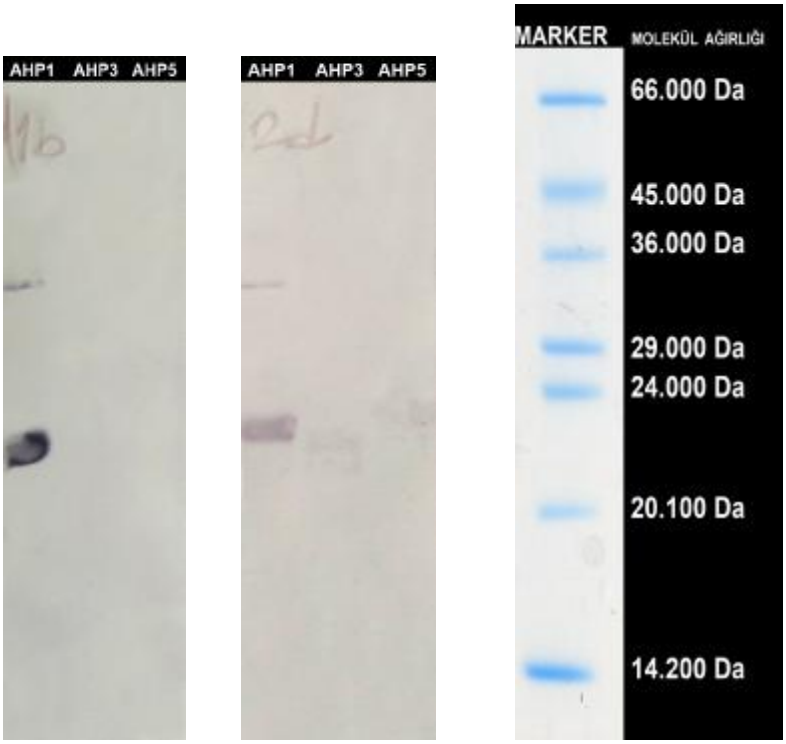
Resim 4.4'teki membranlar sırasıyla AHP1, AHP3 ve AHP5 antijenleri ile kodlanmıştır. Bu işlem %15'lik SDS PAGE jele proteinlerin yüklenmesi ile sağlanır. Bir saat kadar süren elektroliz işlemi sonrasında jel blot edilerek proteinlerin membrana geçmesi sağlanır. Membranların bir gece %5'lik süt: TBST çözeltisinde bekletilmesiyle daha fazla sayıda proteinin membrana bağlanması sağlanır. Daha sonra istediğimiz süpernatantı birden fazla protein üzerinde aynı anda deneme imkanı bulabiliriz. Bu sayede süpernatantta bulunan proteinin monospesifik, polispesifik veya doğal (native) karakterli olduğunu belirleyebiliriz. Şekilde süpernatantın her üç AHP proteini ile de etkileştiği ve eşit oranda kalın ve koyu bantlar oluşturduğu gözleniyor. Bu süpernatantta bulunan antikorun polispesifik karakterde olduğunu gösterir.



Resim 4.4. Polispesifik karakterli süpernatantlara örnek.

4.2.4.2.(2). Monospesifik Karakterdeki Süpernatantlar

Resim 4.5'teki membranlar sırasıyla AHP1, AHP3 ve AHP5 antijenleri ile kodlanmıştır. Bu işlem %15'lik SDS PAGE jele proteinlerin yüklenmesi ile sağlanır. Bir saat kadar süren elektroliz işlemi sonrasında jel blot edilerek proteinlerin membrana geçmesi sağlanır. Membranların bir gece %5'lik süt: TBST çözeltisinde bekletilmesiyle daha fazla sayıda proteinin membrana bağlanması sağlanır. Daha sonra ELISA işlemi sonucunda seçilen süpernatantlar farklı AHP'ler üzerinde denendi. Böylece süpernatantlardaki proteinler birden fazla AHP üzerinde aynı anda denendi. Bu sayede süpernatantta bulunan proteinin monospesifik, polispesifik veya native karakterli olduğunu belirleyebiliriz. Birinci şekildeki membranlar polispesifik karakterdeki proteinlerin varlığını gösterir. Şekilde süpernatantın her üç AHP proteinine de etkileştiği bant oluşumundan anlaşılabilir. Diğer taraftan ikinci şekildeki monospesifik karakterde protein içeren süpernatantların sadece AHP1 antijeni ile etkileştiği belirlenmiştir. AHP1 proteininin varlığını gösteren kalın bandın üzerindeki bant AHP proteinin dimerinin oluşturduğu banttır.



Resim 4.5. Monospesifik karakterli süpernatantlara örnek.

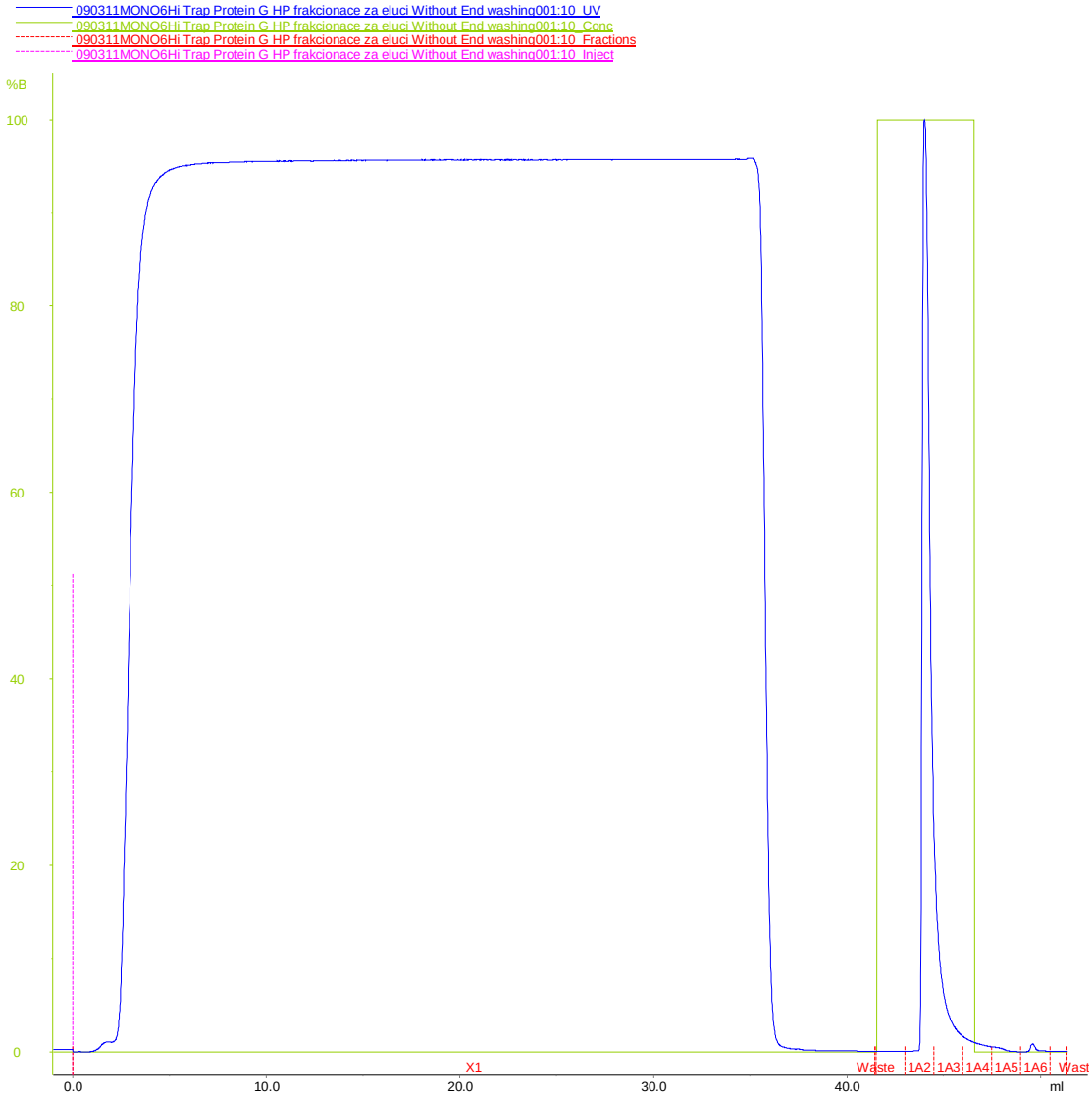
Western Blot tekniği süpernatantların native formdaki proteinlere (proteinlerin 95^{o}C sıcaklığa kadar ısıtılarak denaturasyona uğratılması sonucu elde edilen denature proteinler) karşı etkinliklerini test etmemize olanak sağladı. Bu doğrultuda süpernatantlardan bazılarının ELISA sonucunun pozitif olmasına rağmen Western Blot testi sonucunun negatif olduğu gözlendi. Bunun nedeni test edilen süpernatantın native formdaki proteine karşı etkin olmayışıdır.

Sonuç olarak 06/02/2009 tarihinde C7 (34. sıradaki süpernatant, monospesifik karakterli), B4 (38. sıradaki süpernatant, monospesifik karakterli), G1 (41 numaralı süpernatant, polispesifik karakterli), 2.plakadan A12 (44 numaralı süpernatant, polispesifik karakterli) ve 2. plakadan E1 (45 numaralı süpernatant, polispesifik karakterli) süpernatantlar seçildi. Daha sonra seçilen süpernatantlar klonlandı. Klonlar arasından 2, 6, 7, 13 ve 14 numaralı hibridomalar seçildi. Daha sonra bu hibridomaların saflaştırılması aşamasına geçildi.

4.3. Antikorların Saflaştırılması

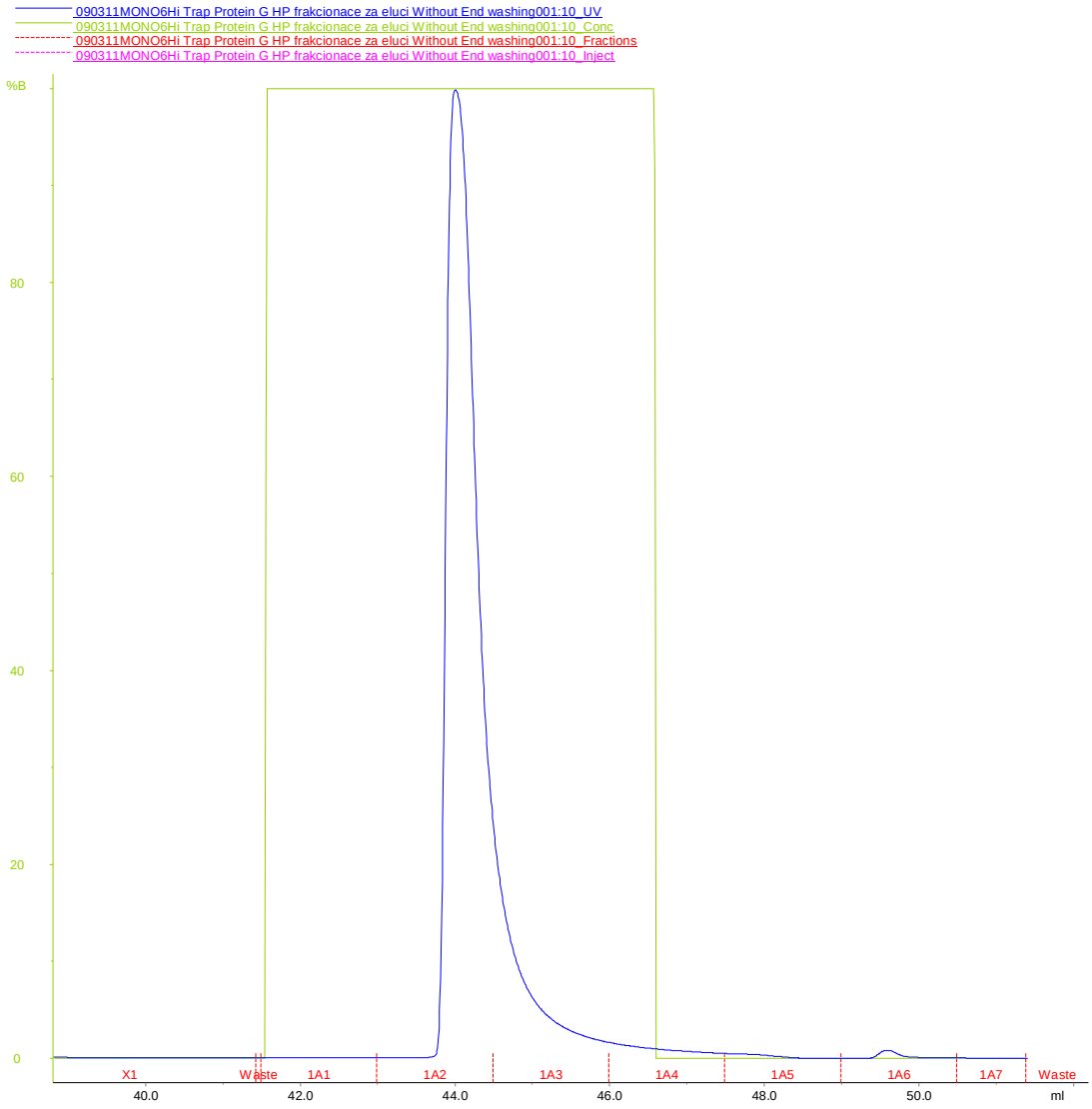
-82 ^{o}C'de tutulan saflaştırılacak pelletler buz içerisinde yavaş yavaş çözüldü. 1 litrelik kültürden elde edilen her bir pelletin üzerine 30 mL ekstraksiyon tamponu (20 mM Tris pH: 7,9, 300 mM NaCl, %10 gliserol, 3,5 mM merkaptoetanol, %0,1 TritonX-100, 20mM imidazol) eklendi ve pelletler homojenizatörde homojenize edildi. Homojenize edilmiş süspansiyon sonikasyona uğratıldı. Süspansiyon santrifüj edildi ve filtre edilerek süpernatant alındı. Elde edilen süpernatant kromotografik kolona yüklendi. Saflaştırma işleminde kullanılan yöntem afinite kromotografisidir. HPLC işlemi sonucu elde edilen fraksiyonlar konsantre edildi ve protein konsantrasyonları Bradford Yöntemi ile ölçüldü. SDS-PAGE işlemi ile ise saflık kontrolü yapıldı.

Şekil 4.2'deki grafik HPLC işlemi sonucunda iyon değiştirme ile saflaştırılan 6 numaralı monospesifik antikora aittir. Grafikte de görüldüğü üzere waste noktasına kadar protein elde edilmemiştir. 40 mL sonrasında protein eldesi başlamış ve farklı protein oranlarında olmak üzere fraksiyonlar deney tüplerine alınmıştır.



Şekil 4.2. 6 numaralı monospesifik antikorun saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen zamana bağlı protein miktarını gösteren grafik. (03/02/2009 tarihinde F5 olarak etiketlenmiş süpernatanttan seçilmiştir.)

Şekil 4.3'te HPLC işlemi sonucunda iyon değiştirme ile saflaştırılan 6 numaralı monospesifik antikora ait grafikten alıntıdır. Grafik; zamana karşı kolondan geçen protein miktarını gösterir. Diğer proteinlerin saflaştırma işlemi sonucunda da benzer grafikler elde edilmiştir. A1 fraksiyonuna kadar dedektörden protein geçişi gerçekleşmemiştir. Proteinin dedektörden geçişinden sonraki ikinci fraksiyonda (A2 fraksiyonu) protein miktarının maksimum düzeyde olduğunu görüyoruz.



Şekil 4.3. 6 numaralı monospesifik antikorun saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen zamana bağlı protein miktarını gösteren grafiğinin büyütülmüş hali. (03/02/2009 tarihinde F5 olarak etiketlenmiş süpernatanttan seçilmiştir.)

Deney sonucunda elde edilen fraksiyonlardan A2, A3 ve A4 fraksiyonları seçilerek önce ELISA yöntemiyle daha sonra Bradford Protein Measurement yöntemiyle absorbanslar ölçülmüştür. ELISA testi sonucunda elde edilen absorbans değerleri çizelge 4.3 ve çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. ELISA testi sonucunda monospesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri.

Monospesifik	Süpernatant	Fraksiyon1	Fraksiyon2	Fraksiyon3	Eluat
2	0,384	0,408	0,42	0,058	0,058
6	0,499	0,552	0,554	0,18	0,064
7	0,351	0,232	0,24	0,049	0,058

Çizelge 4.4. ELISA testi sonucunda polispesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri.

Polispesifik	Süpernatant	Fraksiyon1	Fraksiyon2	Eluat
13	1,736	1,889	2,319	0,122
14	2,326	2,428	1,314	0,252

Çizelge 4.3 ve 4.4 her bir fraksiyonun ayrı ölçülmüş absorbans değerlerini göstermektedir. Faksiyonlar 1:1000 oranında seyreltilerek ölçüm işlemi yapılmıştır. Sonuçta saflaştırma işleminin başarıyla gerçekleştiği ve eluatta çok az miktarda protein kaldığı görülmektedir. Bu durumda saflaştırma işleminin tekrarlanmasına veya ek bir saflaştırma işlemine gerek görülmemiştir.

Bradford yöntemi ile 595 nm'de yapılan ölçümde her bir fraksiyonun konsantrasyonu hesaplanmıştır(Şekil 4.5 ve şekil 4.6). Fraksiyonlardan alınan 2 µL'lik örneklere, 798µL H_2O ve 200µL Bradford çözeltisi eklendi.

Çizelge 4.5. Bradford yöntemi sonucunda monospesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri.

Monospesifik	Fraksiyon1	Fraksiyon2	Fraksiyon3
2	0,156	0,239	0,118
6	0,125	0,153	0,128
7	0,134	0,146	0,117

Çizelge 4.6. Bradford yöntemi sonucunda polispesifik antikorların saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlarına ait absorbans değerleri.

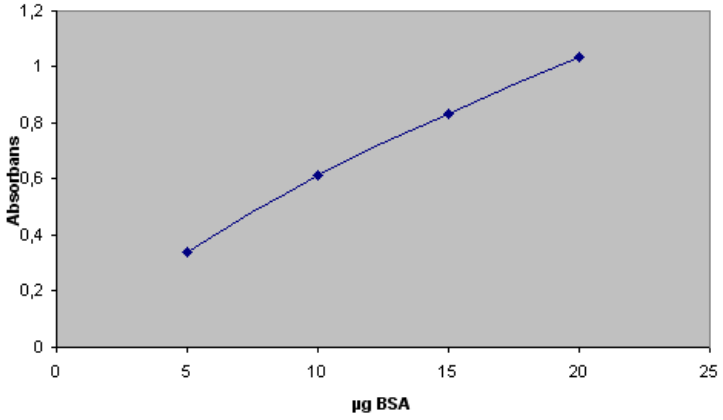
Polispesifik	Fraksiyon1	Fraksiyon2
13	0,068	0,095
14	0,138	0,204

Çizelge 4.5 ve çizelge 4.6'daki absorbans değerlerinden faydalanarak protein konsantrasyonları hesaplanmıştır ve çizelge 4.7'deki sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4.7'de görülen grafik BSA kullanılarak çizilen standart eğrisine aittir.

Çizelge 4.7. Bradford yöntemi sonu elde edilen değerlerden yola çıkılarak konsantrasyonların hesaplanmasını gösteren tablo.

Standart eğrisi (y = kx + d):

µg BSA	Absorbans (595 nm)
5	0,337
10	0,613
15	0,834
20	1,034

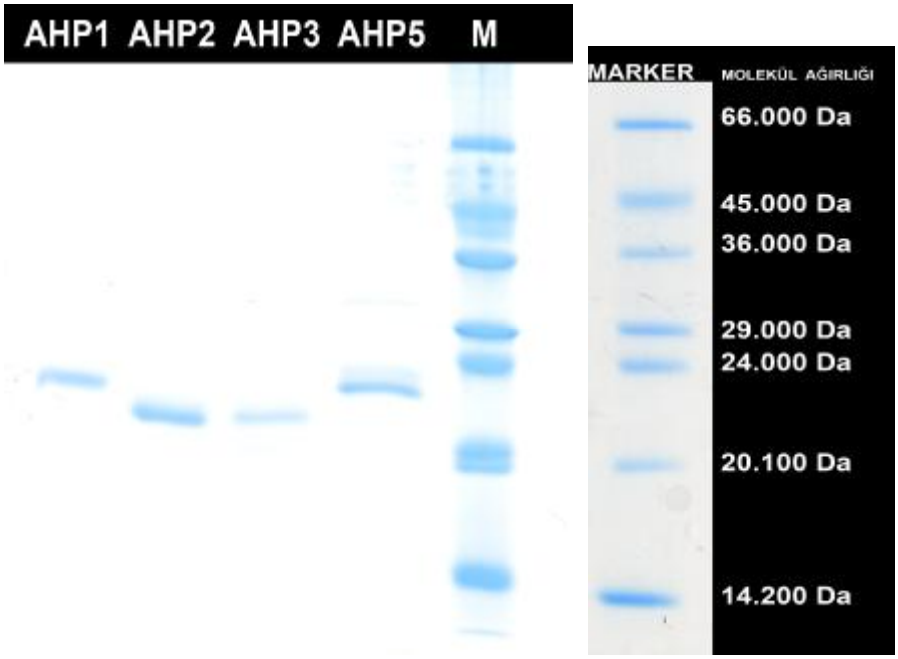


Örnekler	Absorbans (595 nm)	Hacim (µl)	[P] (mg/ml)
Mono7 A2	0,134	2	0,69
Mono7 A3	0,146	2	0,81
Mono7 A4	0,117	2	0,53
Mono6 B2	0,125	2	0,6
Mono6 B3	0,153	2	0,88
Mono6 B4	0,128	2	0,63
Mono2 C2	0,156	2	0,91
Mono2 C3	0,239	2	1,72
Mono2 C3	0,118	2	0,54
Poli13 A2	0,068	2	0,05
Poli13 A3	0,095	2	0,31
Poli14 B2	0,138	2	0,73
Poli14 B3	0,204	2	1,37

4.4. Antikorların Karakterizasyonu

4.4.1. Özgüllük

Resim 4.6'da özgüllük değerlendirmesi yapılmadan önce sırasıyla AHP1, AHP2, AHP3 ve AHP5 proteinlerinin commasive blue boyaması sonucu elde edilen görüntü sunulmuştur. Amaç protein varlığından emin olmak ve aynı konsantrasyonda proteinler üzerinde antikorların denenmesini sağlamak için konsantrasyonun optimize edilmesi. Bantların renginin hemen aynı koyulukta olması bize proteinlerin konsantrasyonlarının birbirine yakın olduğunu gösterir.

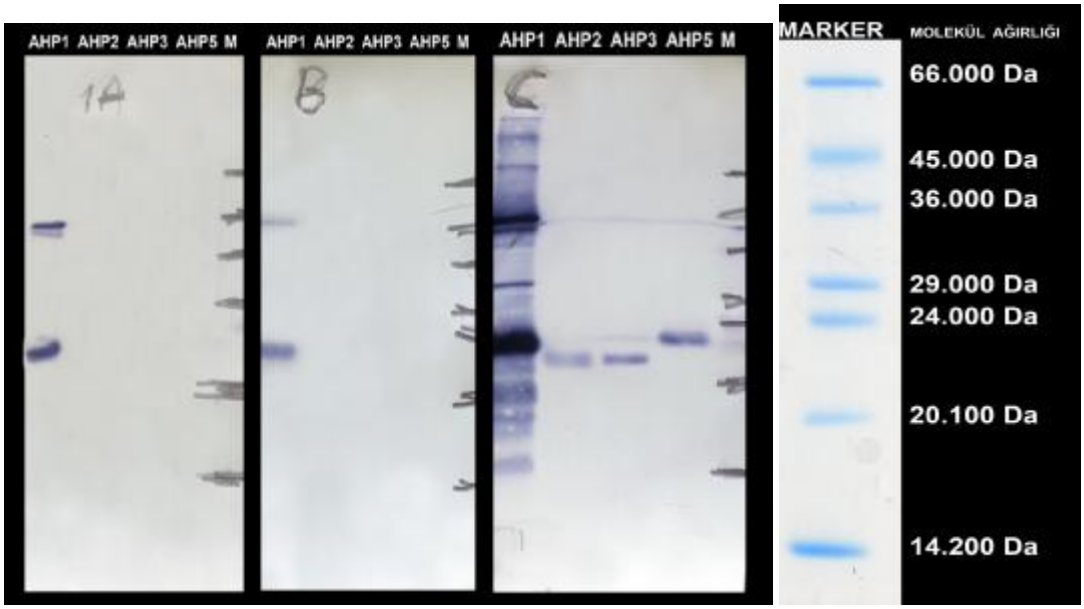


Resim 4.6. Karakterizasyon işleminde kullanılan AHP proteinlerinin commasive blue ile boyanması sonucu elde edilen görüntü.

Monospesifik ve polispesifik antikorlar AHP1, AHP2, AHP3 ve AHP5'e karşı denendi. Ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

4.4.1.1. Monospesifik Karakterli Antikorlar

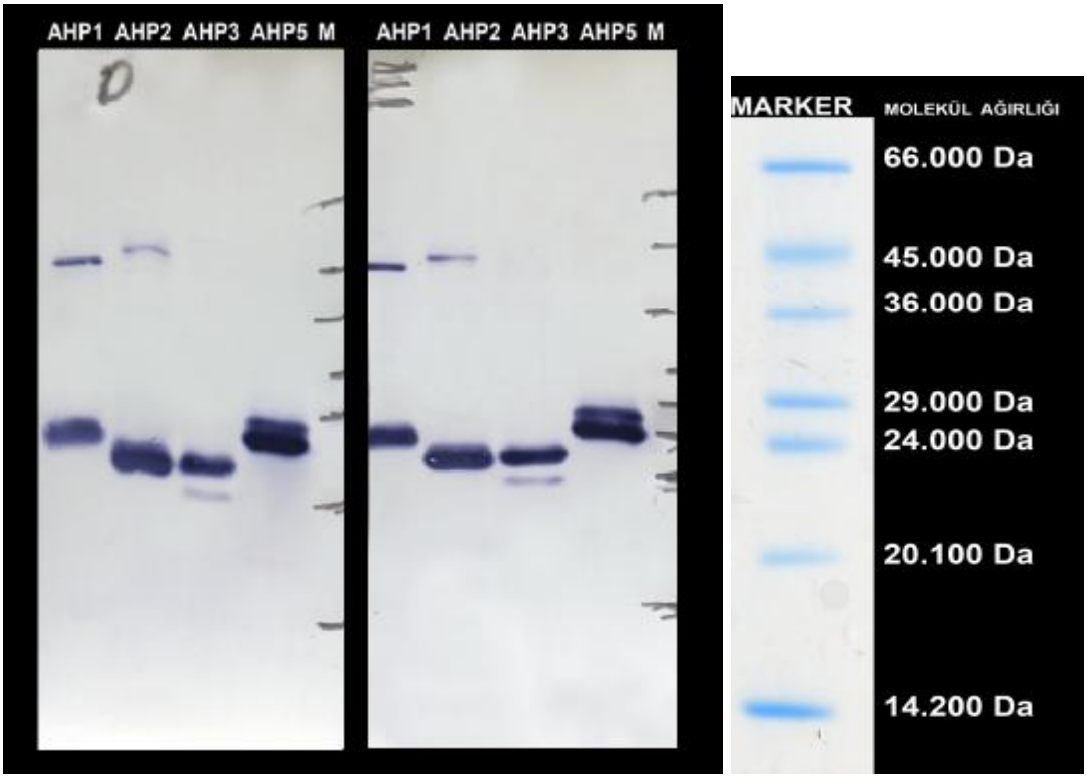
Resim 4.7'de membranlarda AHP1 proteininin yürütüldüğü bölümdeki bantlardan yukarıda kalan bant, AHP1 proteininin dimerine aittir. 2 ve 6 numaralı antikorlar sadece AHP1 proteinine karşı etki gösterirken 7 numaralı antikorun AHP1 proteinine karşı yüksek derecede etki göstermesine karşın çok belirgin ve şiddetli olmamasına rağmen diğer proteinlerle de bant oluşturduğu gözlendi. Bu yüzden 7 numaralı antikorun monospesifik karakterde olduğunu söyleyebiliriz.



Resim 4.7. A) 2 numaralı antikor, B) 6 numaralı antikor, C) 7 numaralı antikor.

4.4.1.2. Polispesifik Karakterli Antikorlar

Resim 4.8'de 13 ve 14 numaralı monoklonal antikorların AHP proteinlerine karşı denenmesi sonucu elde edilen membranlar görülmektedir. 13 ve 14 numaralı monoklonal antikorların hemen aynı karakterde olduğu gözlenmiştir. Antikorlar sırasıyla AHP1, AHP2, AHP3 ve AHP5 proteinlerine karşı denenmiştir. Antikorların tüm proteinlere karşı etkili olmasından ötürü her iki antikorun da polispesifik karakterde olduğunu söyleyebiliriz.

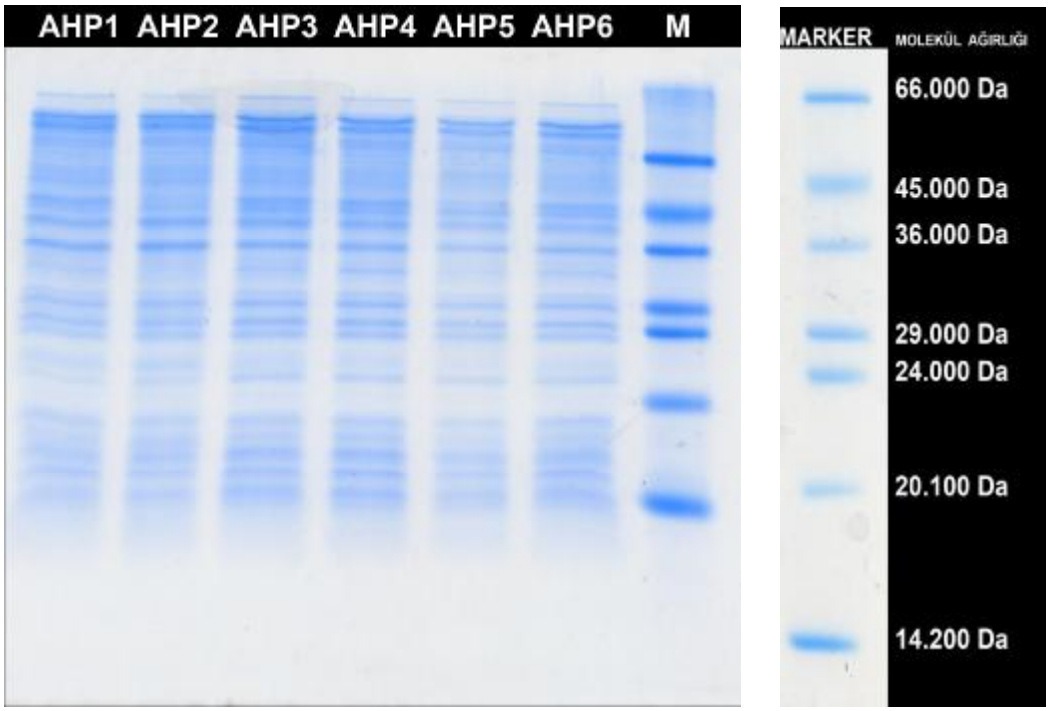


Resim 4.8. D) 13 numaralı antikor, E) 14 numaralı antikor.

4.4.2. Kaba Özütler Üzerinde Deneme

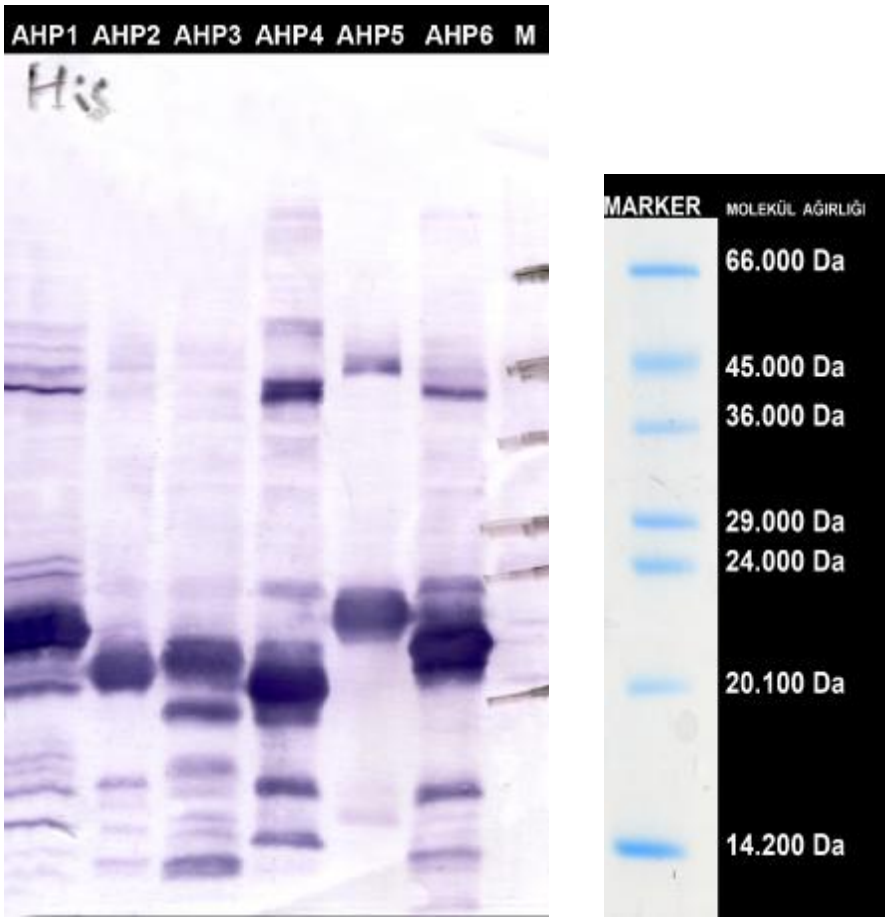
Bu kez monoklonal antikorlar, rekombinant DNA teknolojisi sayesinde üretilen histidin tutturulmuş AHP proteinlerini içeren bakteriyel stoklardan hazırlanan kaba özütlere karşı denenmiştir.

Resim 4.9'da sırasıyla AHP1, AHP2, AHP3, AHP4, AHP5, AHP6 proteinlerini içeren kaba özütlere ve marker'a ait comassive blue ile boyanmış jel verilmiştir.



Resim 4.9. Bakteri stoklarından hazırlanan kaba özütlerin commasive blue ile boyanması sonucu elde edilen jel.

Resim 4.10'da da görüldüğü gibi elde edilen kaba özütler ilk önce His-tag (Mouse monoclonal 6XHis tag®) monoklonal antikoru kullanılarak denendi. His-tag, 6 AHP proteinine karşı yanıt verebilen monoklonal antikordur ve hazır kit olarak satın alınıp kullanılmıştır. Bu kontrol hazırlanan kaba özütlerde AHP proteinlerinin bulunduğunun kanıtıdır. Resim 4.10'da görüldüğü üzere kaba özütler AHP proteinlerini içermektedir. Bu kontrol aynı zamanda protein derişiminin optimizasyonu açısından da önemlidir. AHP proteinlerini gösteren bantların aynı koyulukta olması bize protein derişimlerinin birbirine yakın olduğunu gösterir.



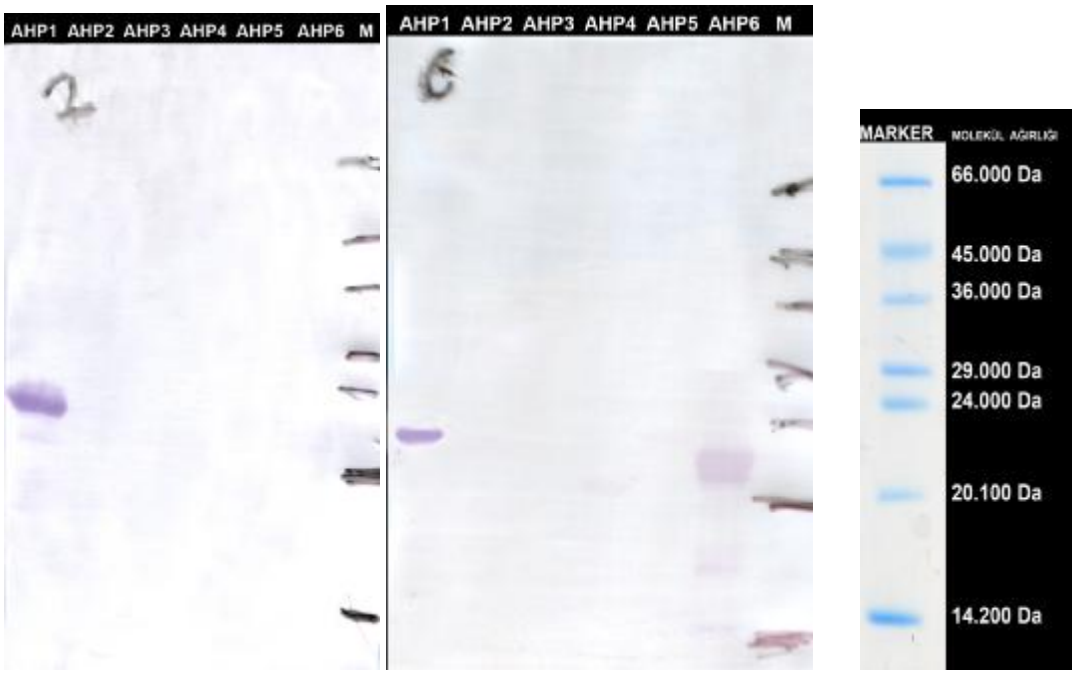
Resim 4.10. His-tag ile yapılan kontrol sonucu.

Tüm AHP proteinlerinin özütlerde bulunduğundan emin olduktan sonra antikorların kaba özütler üzerinde denenmesine başlanmıştır. Antikorları kaba özütlere karşı denemek için AHP1, AHP2, AHP3, AHP4, AHP5 ve AHP6 proteinlerini içeren kaba özütler sırasıyla jele yüklenmiştir. Western Blot yöntemiyle jeldeki kaba özütler membranlara aktarılarak sonuçlar elde edilmiştir.

4.4.2.1. Monospesifik Karakterli Antikorlar

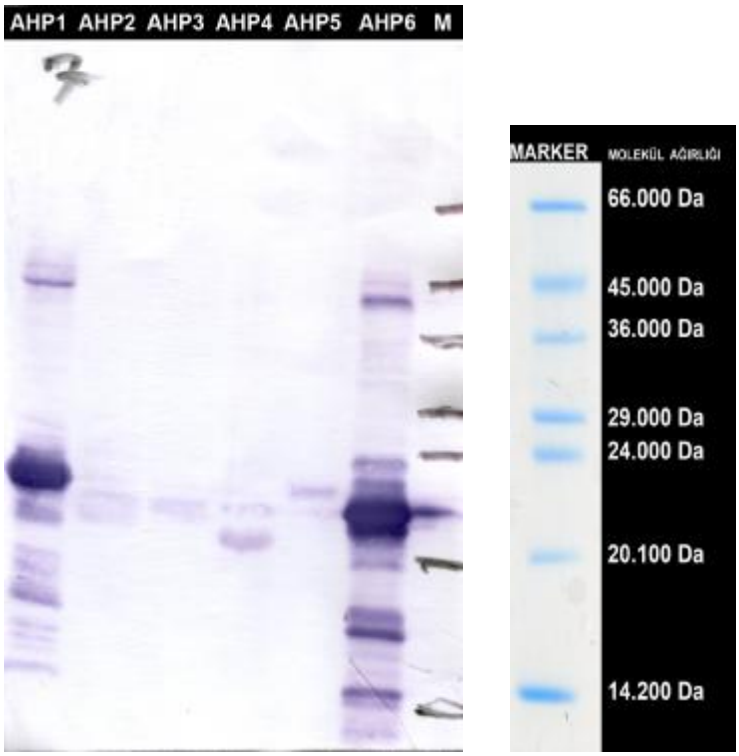
Resim 4.11'deki membranlarda sadece AHP1 proteini içeren kaba özütün bulunduğu sütunda tek bir bant gözlendiğinden, 2 ve 6 numaralı antikorların monospesifik karakterde olduğu belirlenmiştir. 6 numaralı antikorun AHP6 ile de

bant oluşturduğu gözlenmiştir. Fakat bu bant, AHP1 ile oluşan banda oranla hemen hemen yok sayılabileceğinden 6 numaralı antikorun karakterini etkilememektedir.



Resim 4.11. Monospesifik karakterdeki 2 ve 6 numaralı antikorlar.

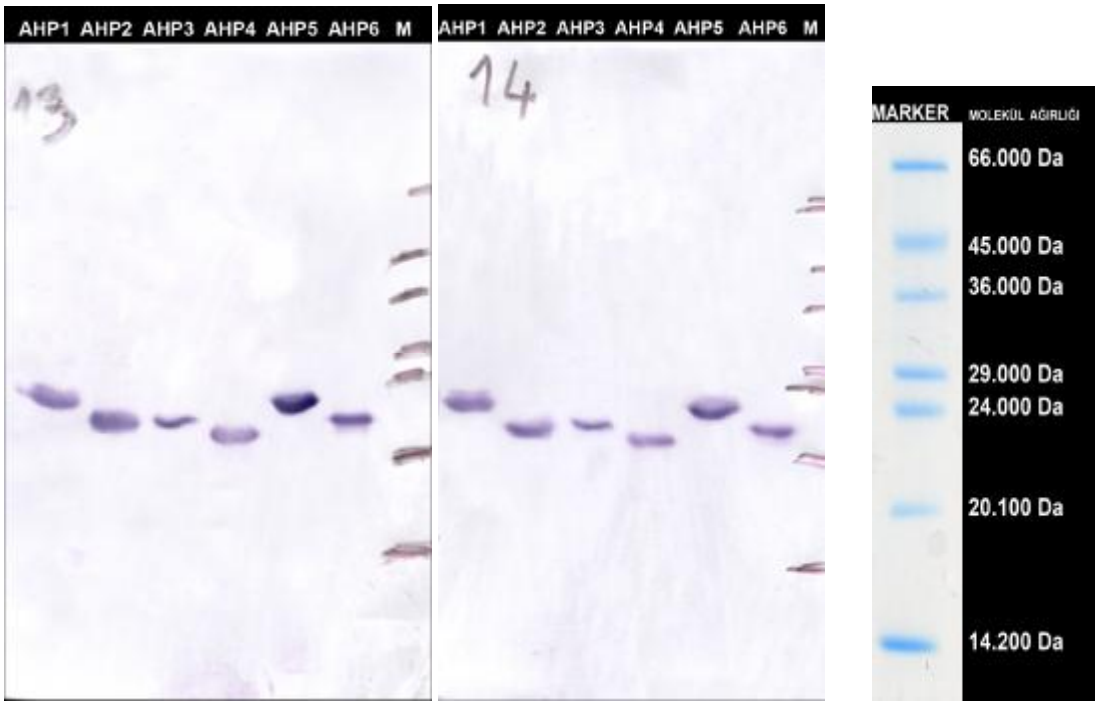
Resim 4.12'de kaba özütlere karşı denenen 7 numaralı antikorun AHP1 ve AHP6 ile bant oluşturduğu görülüyor. Çok kuvvetli olan bu bantlar 7 numaralı antikorun AHP1 ve AHP6 proteinlerine karşı seçici olduğunun göstergesidir. Her iki AHP proteini içeren kaba özütle de bant oluşturmasına karşın 7 numaralı antikor monospesifik karakterli ve AHP6 proteini ile kros reaksiyon veren antikor olarak tanımlanmıştır.



Resim 4.12. Monospesifik karakterli 7 numaralı antikor.

4.4.2.2. Polispesifik Karakterli Antikorlar

Resim 4.13'teki membranlarda 13 numaralı ve 14 numaralı antikorların tüm AHP içeren kaba özütlerin her biriyle, hemen aynı şiddette bant oluşturduğu görülmektedir. Bu durumda 13 ve 14 numaralı monoklonal antikorların polispesifik karakterde olduklarını söyleyebiliriz.



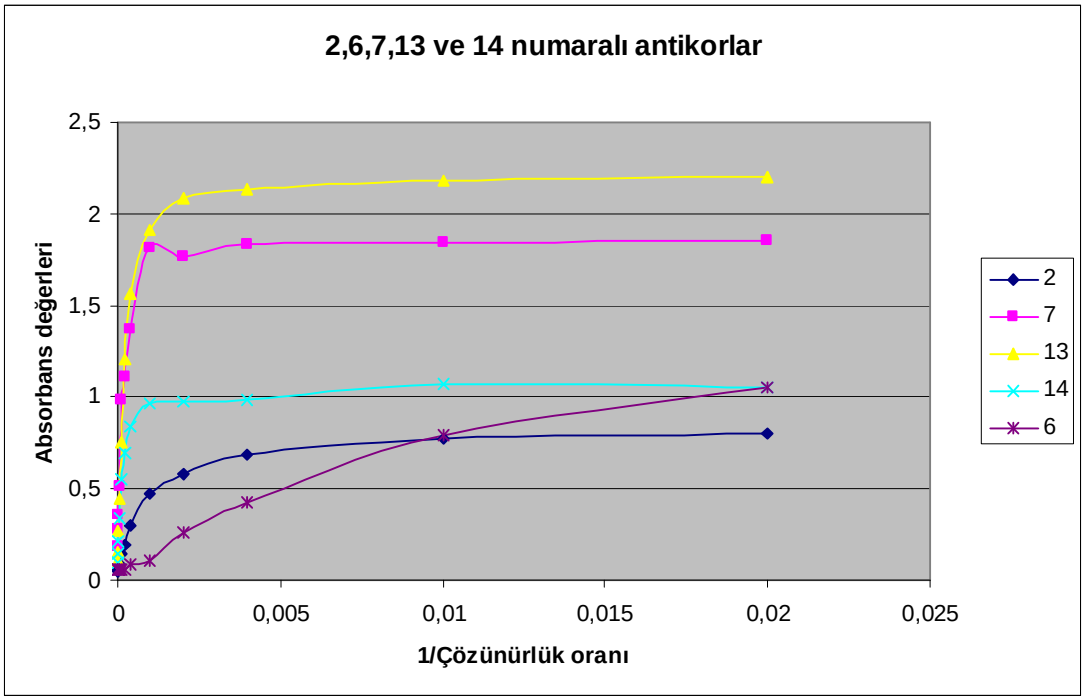
Resim 4.13. Polispesifik karakterli 13 numaralı ve 14 numaralı antikorlar.

4.4.2. Hassasiyet

Antikorların hassasiyetlerini test etmek için her bir antikor için farklı seyreltme oranlarında çözeltiler hazırlandı. Daha sonra 96 kuyucuklu mikroplakaya yüklendi. Çizelge 4.8'de değişik seyreltme oranlarına karşılık elde edilen absorbans değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. 2,6,7,13 ve 14 numaralı antikorların seyreltme oranlarına karşılık elde edilen absorbans değerleri.

Seyreltme oranı	1/Seyreltme oranı	2 numaralı antikor için Absorbans değerleri	6 numaralı antikor için Absorbans değerleri	7 numaralı antikor için Absorbans değerleri	13 numaralı antikor için Absorbans değerleri	14 numaralı antikor için Absorbans değerleri
1:50	0,02	0,798	1,05	1,8505	2,205	1,0535
1:100	0,01	0,77	0,795	1,8425	2,183	1,0685
1:250	0,004	0,684	0,4255	1,8315	2,134	0,9835
1:500	0,002	0,583	0,265	1,762	2,087	0,9735
1:1000	0,001	0,469	0,104	1,8135	1,911	0,9685
1:2500	0,0004	0,297	0,083	1,3745	1,562	0,844
1:5000	0,0002	0,197	0,059	1,112	1,204	0,694
1:10000	0,0001	0,141	0,0535	0,989	0,755	0,555
1:25000	0,00004	0,083	0,0535	0,513	0,442	0,341
1:50000	0,00002	0,061	0,0535	0,3605	0,2655	0,213
1:100000	0,00001	0,051	0,056	0,279	0,1545	0,142
1:200000	0,000005	0,045	0,058	0,1825	0,105	0,092



Şekil 4.4. 2,6,7,13 ve 14 numaralı antikorların hassasiyetinin ölçümüne ait grafik. Antikora ait 1/seyreltme oranına karşılık absorbansın değişimini gösterir.

Değişik oranlarda seyreltilen antikorların en iyi oranda kullanılabilmesi için uygulanmıştır. Çözünürlük oranının absorbansa etki etmediği (absorbansın sabitlendiği) noktanın yarısı hesaplanır. Bu hesaplanan noktadaki seyreltme oranı ideal seyreltme oranıdır ve antikorun bu oranda seyreltilerek kullanılması en iyi sonucu verir. Bu durumda; 2 numaralı antikor için 1:500, 6 numaralı antikor için 1:50 (Absorbansın sabitlendiği nokta gözlenememiştir), 7 numaralı antikor için 1:2500, 13 numaralı antikor için 1:1000, 14 numaralı antikor için 1:2500 oranında seyreltmenin en iyi sonucu vereceği saptanmıştır.

4.4.3. İzotipleme

Bu aşamada saflaştırma öncesinde seçilmiş bütün süpernatantların AHP1 ile kodlanmış 96 kuyucuklu mikroplakada farklı ikincil antikorlara ilgisi araştırılmıştır. Alınan sonuçlar ışığında polispesifik karakterli olan 13/1 ve 14/1 numaralı süpernatantların IgG1 ikincil antikoruyla daha iyi etkileştiği, monospesifik karakterli diğer süpernatantların (2/2, 6/1 ve 7/1 numaralı) IgG2a ve IgG2b ikincil antikorları ile diğer ikincil antikorlara oranla daha yüksek oranda etkileştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. ELISA testi sonucunda elde edilen monoklonal antikorların değişik ikincil antikorlar ile denenmesi sonucu elde edilen absorbans değerleri.

Antijen	Örnek	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgGM	IgGA
AHP1	2/2	1,8528	2,5812	1,4469	1,5108	1,6197	1,6561
AHP1	6/1	1,881	1,919	2,7349	1,6535	1,866	1,6893
AHP1	7/1	1,4331	1,2413	2,3732	0,9895	1,2861	0,96
AHP1	13/1	2,8797	1,5196	1,2182	1,4446	1,327	1,0448
AHP1	14/1	2,6024	1,2017	0,8758	1,1547	1,2197	0,9184
AHP1	negatif	1,1846	0,3158	0,0406	0,0431	0,0408	0,0454

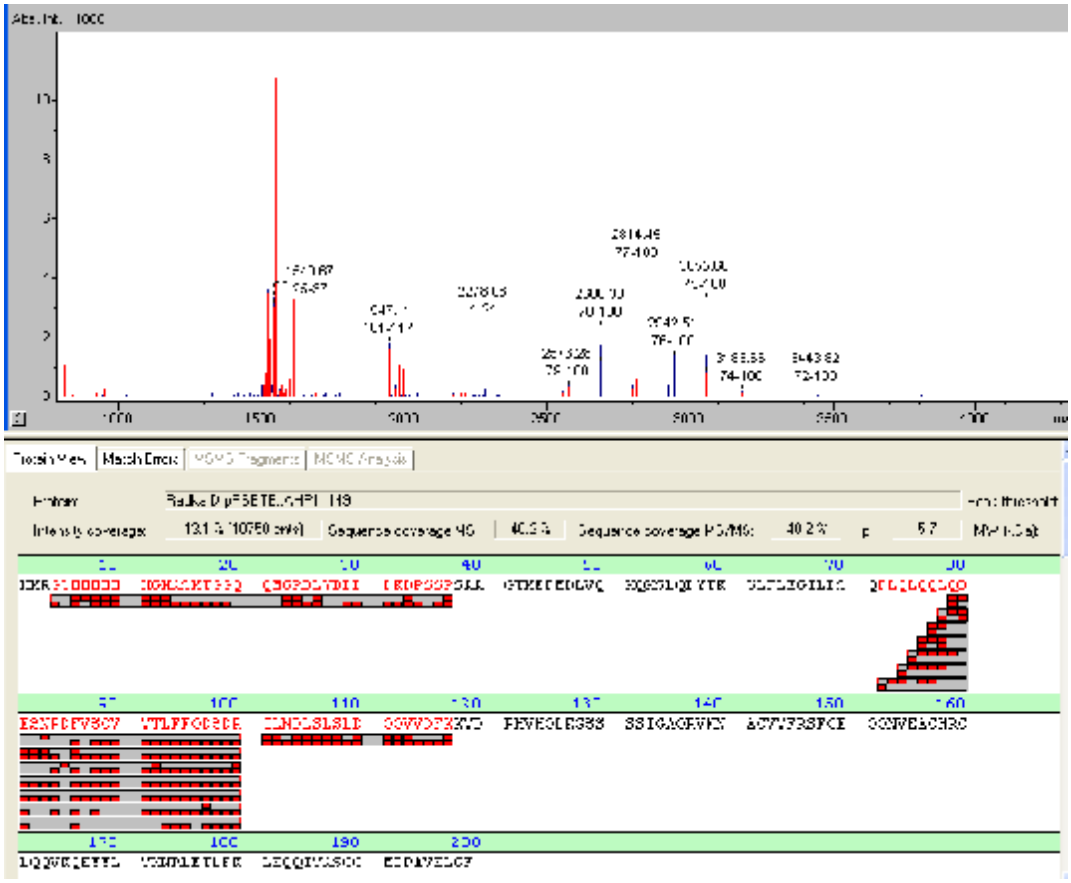
4.5. Epitop Haritalandırılması

Epitop bölgelerinin haritalanması moleküler yapının minimum derecede karakterizasyonu ve tanımlanması prosesidir. Basitçe bir antijen türüne spesifik bir antikorun bağlandığı yapısal bölgeye epitop denir. Bu yapısal bölge veya bölgelerin belirlenmesi işlemine epitop bölgelerinin haritalanması (Epitope mapping) denir.

HMRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRSAAGTMEFMDLVQKQKSLQDYTKSL
FLEGILDSQFLQLQQLQDESNPDFVSQVVTLFFQDSDRILNDLSLSLDQQ
VVDFKKVDPHVHQLKGSSSS
IGAQRVKNACVVFRSFCEQQNVEACHRCLQQVKQEYYLVKNRLETLFK
LEQQIVASGGMIPAVELGF

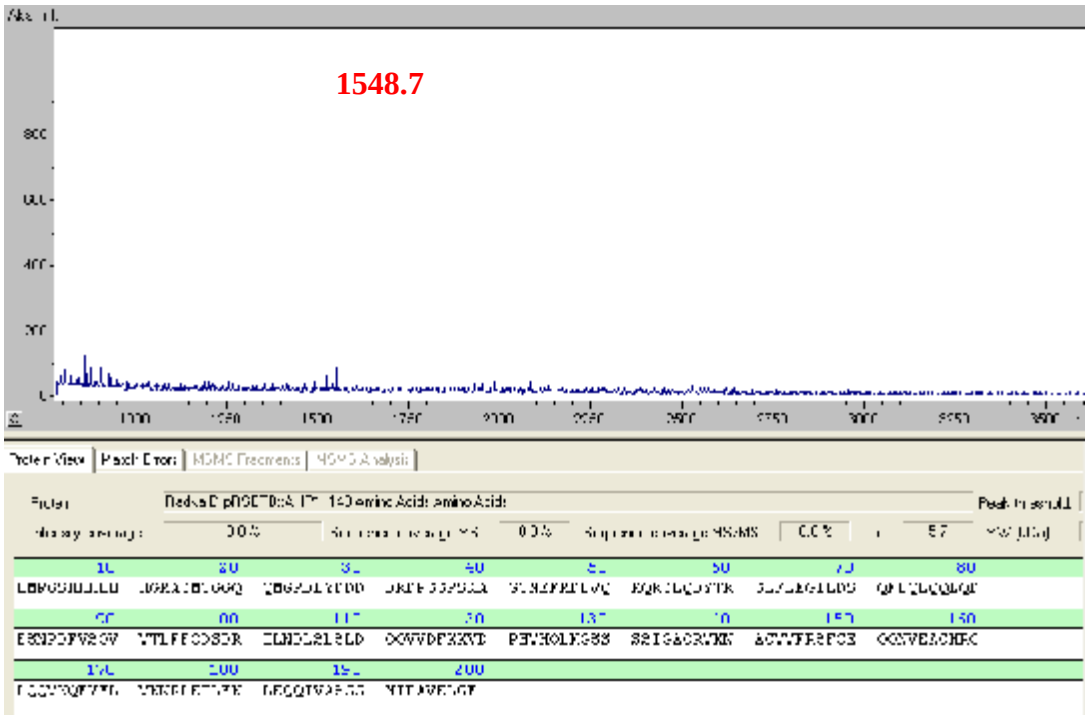
AHP1 proteininin tüm sekansı yukarıda verilmiştir. Aktif kısım altı çizilerek belirtilmiştir.

Şekil 4.5'te AHP1 proteinine ait MS/MS analizi sonucu verilmiştir. Grafik AHP1 proteininin tripsin ile hidrolizi sonucu elde edilen fragmentleri göstermektedir. Grafiğin altında kalan bölümde proteine ait aminoasit sekansının % 40,2'lik bölümü görülmektedir. Bu işlem hidroliz işleminin başarılı olup olmadığının belirlenmesi için uygulanmıştır.



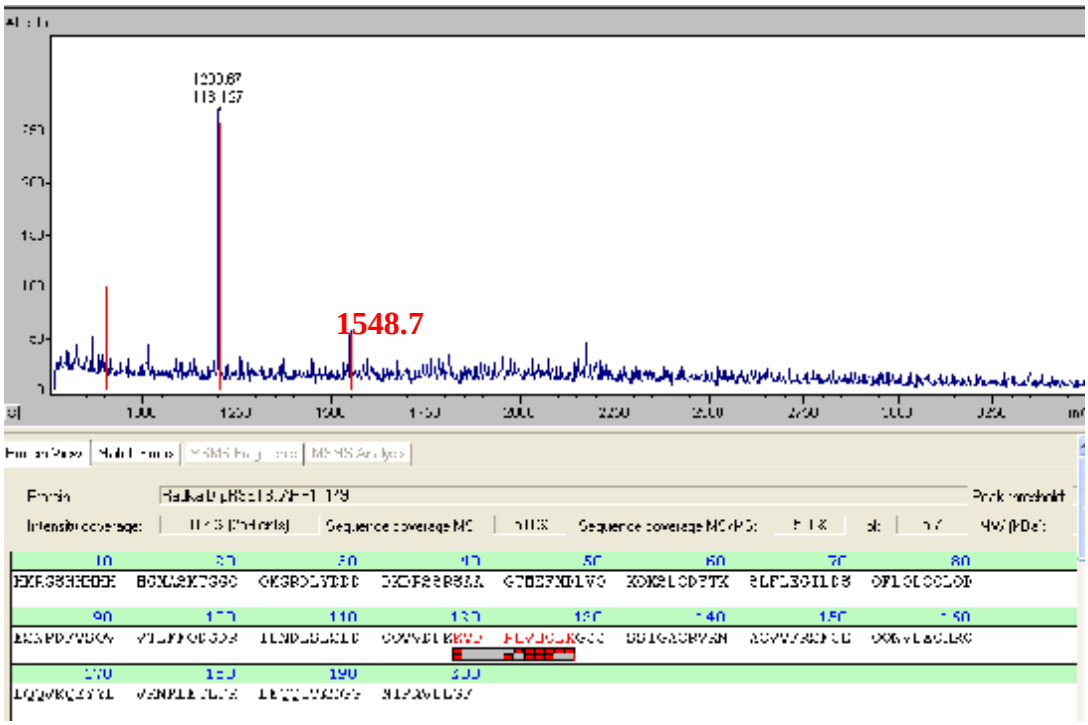
Şekil 4.5. Tripsin ile hidroliz edilmiş AHP1 proteinine ait fragmentleri gösteren grafik.

Şekil 4.6 hidroliz işleminin kontrolüne ait grafiktir. Kontrol işlemi için epitop haritalandırılmasındaki bütün AHP1 proteini üzerinde bağlanmanın gerçekleşeceği bir epitop yoktur. Bu ortamda hidroliz edilmiş örneğe bağlanabilecek başka bir proteinin olmadığını gösterir. Grafikte gördüğümüz 1548.7 kDa'daki pik ise plastik parçası veya başka bir kontaminasyondan kaynaklanmaktadır.



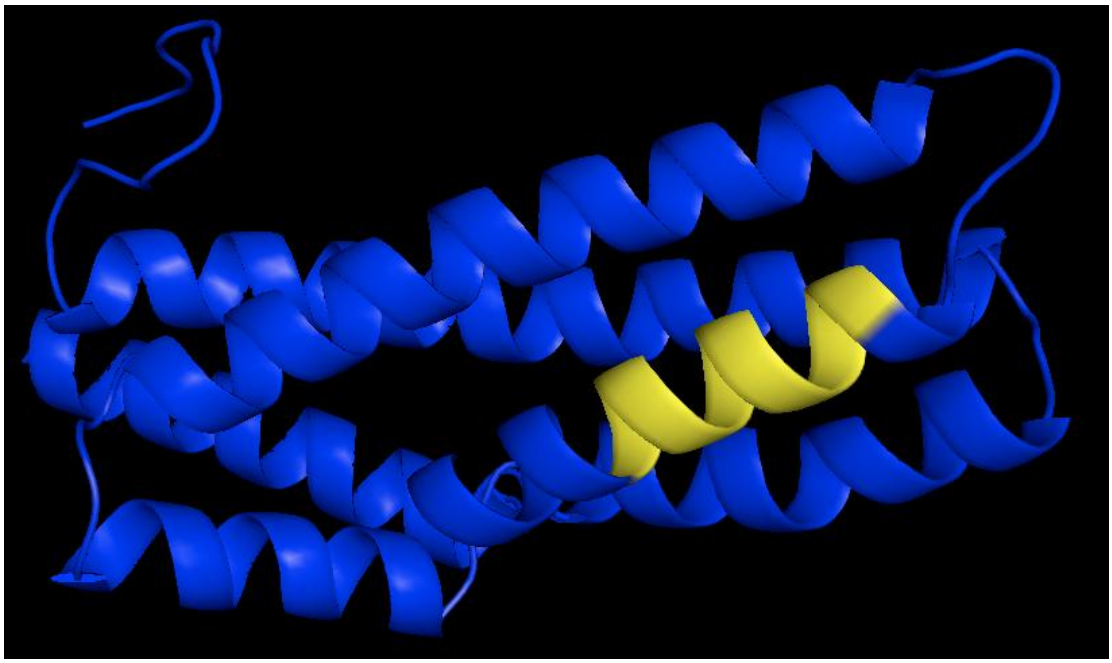
Şekil 4.6. Hidroliz işleminin kontrolüne ait grafik. Bu analiz kontrol amacıyla yapılmıştır. Epitop haritalanmasındaki bütün basamaklar uygulandı fakat antikor eklenilmedi.

Şekil 4.7'deki grafikte görülen 1200,67 kDa'daki pik epitopu gösterir. Protein sekansını gösteren bölümdeki kırmızı işaretli aminoasitler (118-127 arası) epitopu oluşturan aminoasitleri gösterir. Grafik şekil 4.6'daki kontrol amaçlı grafikle kıyaslandığında 1548,7 kDa'da elde edilen pikin kontaminasyonlardan kaynaklandığını görürülür.



Şekil 4.7. Tripsin ile çökeltilmiş AHP1 proteininin 2 numaralı antikor ile reaksiyonu sonucunda elde edilen epitop haritalanmasına ait grafik.

Resim 4.14'te AHP1 proteininine ait üç boyutlu yapı görülmektedir. Epitop haritalandırılması işlemi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak, PyMOL programı sayesinde, 2 numaralı antikorun bağlandığı KVDPHVHQLK epitopu sarı renkle renklendirilmiştir. İşaretlenen epitop proteinin 4. heliksinde bulunur.



Resim 4.14. AHP1 proteininin PyMOL programı kullanılarak çizilmiş üç boyutlu yapısı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

AHP1 antijeni ile aşılanmış farelerden alınan serumun kontrolünde aşılama işleminin başarılı olduğu saptanmıştır. Daha sonra fareden alınan ve HAT ortamına dayanıklı antikor üretebilen dalak hücreleri, yaşam süresi sınırsız miyelom hücreleri ile füzyona uğratılmıştır. Elde edilen hibritleşmiş hücreler uygun ortamda AHP1 antijenine cevap verebilecek şekilde büyütülmüştür. İlk füzyon sonucu elde edilen süpernatantlardan pozitif sonuç elde edilemezken ikinci füzyon sonucu elde edilen süpernatantlara uygulanan Western Blot ve ELISA testlerinden antikorların varlığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. İlk önce ELISA testi uygulanmıştır. ELISA testinden elde edilen sonuçlar ışığında seçilen süpernatantlara Western Blot testi uygulanmıştır. Western Blot testi ile bir veya daha fazla AHP antijenine karşı süpernatantlar test edilerek antikorların özgüllüklerini saptamak mümkün olmuştur. Elde edilen analiz sonuçları ile en verimli beş monoklonal antikor saflaştırılmıştır. Antikorların özgüllüğü AHP1,2,3,5 proteinlerine ve *Arabidopsis thaliana* bitkisinden alınan bakteri stoklarından hazırlanan kaba özütler üzerinde test edilmiştir. Bu sayede monoklonal antikorlar tüm AHP'lere karşı denenmiştir. Sonuçta 2 ve 6 numaralı antikorların sadece AHP1 antijenine karşı etkili olduğu, 13 ve 14 numaralı antikorların ise bütün AHP'lere karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Bu durumda 2 ve 6 numaralı antikorların monospesifik karakterde olduğu, 13 ve 14 numaralı antikorların ise polispesifik karakterde olduğu söylenebilir. 7 numaralı antikor ise AHP1 ve AHP6 ile yüksek derecede etkileşirken diğer antijenlerle membranlar üzerinde zayıf bantlar oluşturduğu gözlenmiştir. Daha sonra hassasiyet ölçümü yapılmıştır. Hassasiyet ölçümünde, antikorların her birinin optimum seyreltme oranının hesaplanması amaç edinilmiştir. Farklı seyreltme oranlarında denenen antikorlar için elde edilen grafikten yola çıkarak en iyi seyreltme oranlarının 2 numaralı antikor için 1:500, 6 numaralı antikor için 1:50 (Absorbansın sabitlendiği nokta gözlenememiştir), 7 numaralı antikor için 1:2500, 13 numaralı antikor için 1:1000, 14 numaralı antikor için 1:2500 olduğu hesaplanmıştır. Daha sonra epitop

haritalandırılması gerçekleştirilmiştir. Diğer antikorlarla çökeltme işlemi başarısız sonuçlandığından sadece 2 numaralı antikorun epitopu haritalandırılabilinmiştir. Antikorun epitopu, AHP1 proteininin tripsin ile hidroliz edilmesi sonucunda haritalandırılmıştır. AHP1 proteinine, 2 numaralı antikorun KVDPHVHQLK aminoasit dizisinden bağlandığı MS/MS analizi ile belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

Elde edilen monoklonal antikorlar *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki sitokinin sinyal iletiminin daha iyi anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılabilirler.

Tıp alanında hastalıkların teşhisi, tedavisi ve hatta pasif bağışıklık kazandırılması amacıyla kullanılabilirler.

KAYNAKLAR

RITTER, M. A., LADYMAN, H. M., 1995. Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Cambridge University Pres 345-351

SPRINGER, T.A., 1987. Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine, Plenum 118-119

GOLDSTEIN, G., SANDERS, M., 1983. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Clinical Immunology Newsletter 4(6):69-71

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity, Nature publishing group 256:495-497

IOIO, D. R., LINHARES, F. S., SABATINI, S., 2008. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation, Current opinion in plant biology 11:23-27

FERREIRA, F. J., KIEBER, J. J., 2005. Cytokinin signaling, Current opinion in plant biology 8:518-525

HEYL, A., WULFETANGE, K., PILS B., NIELSEN, N., RAOMANOV, G., SCHMÜLLING, T., 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor chase domain, Evol Biology 7:62

MAHÖNEN, A. P., HIGUCHI, M., TÖRMAKANGAS, K., MIYAWAKI, K, PISCHKE, M., SUSMAN, M. R., HELARIUTTA, Y. ve KAKIMOTO T., 2006. Cytokinins Regulate a Bidirectional Phosphorelay Network in Arabidopsis, Current Biology 16:1116-1122

KAKIMOTO, T., 1998. Cytokinin signaling, Current Opinion in Plant Biology 1:399-403

APPLEBY, J.L., PARKINSON, J.S., BOURRET, R.B., 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled, Cell 86:845-848.

GÜNEŞ, H., 1997. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri, Tübitak 283-292.

JENNIFER, P.C.,KIEBER, J.J., 2008. Cytokinin signaling: two components and more, Trends in Plant Science 13:85-92

BRAULT M., MALDINEY R., 1997. Mechanisms of cytokinin action, Plant Physiology and Biochemistry 37:403-412

ZHAO Y., 2008. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development, Current Opinion in Plant Biology 11:16-22

URAO T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., 2000. Two-component systems in plantsignal transduction, Trends Plant Science 5:67-74

YADEGARI R., DREWS G., 2004. Female gametophyte development, Plant Cell Advance Online Publication 16:133-141

MÜLER B., SHEEN, J., 2007. Arabidopsis cytokinin signaling pathway, Signal transduction knowledge environment 407:1-4

DORTAY, H., MEHMERT, N., BÜRKLE, L., SCHMÜLLING, T. ve HEYL, A., 2006. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*, Federation of European Bichemical Societies 273:4631-4644

FREYSDOTTIR, J., 2000. Production of monoclonal antibodies, Methods in molecular medicine, Humana Pres 40:267-279

HUTCHISSON, C.E., JIE, L., ARGUESO, C, GONZALEZ, M., LEE, E., LEWIS, M.W., MAXWELL, B.B., PERDUE, T.D., SCHALLER, G.E., ALONSO, J.M., ECKER, J.R. ve KIEBER, J.J., 2006. The Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling, The Plant Cell 18:3073-3087

HWANG, I., SHEEN, J., 2001. Two component circuity in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction, Nature 413:383-389

ZATLKOUAL, M., GEMROTOVA, M., DOLEZAL, K., HAVLICEK, L., SPICHEL, L., STRNAD, M., 2008. Novel potent inhibitors of *Arabidopsis thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase Bioorganic & Medicinal Chemistry 16(20):9268-9275

D'AGOSTINO, I. B., KIBER, J. J., 1999. Phosphorelay signal transduction: the emerning family of plant response regulators, Trends in Biochemical Sciences 24(11):452-456

YANG, J., WU, Q., WANG, H., PAN, K., LEI, H., HU, D., SHEN, Y., XIAO, Z., ZHENG, X., SUN, Y., 2007. Production and identification of high affinity monoclonal antibodies against pesticide carbofuran, Agricultural Sciences in China 6(9): 1082-1088

BREHIN, A. C., RUBRECHT, L., SANCHEZ, M. E. N., MARECHA, V., FRENGIEL, M. P., LAPALUD, P., LAUNE, D., SALL, A. A., DESPESS, P., 2008. Production and characterization of Mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein, Virology 1:185-195

MÜLER, B., SHEEN, J., 2007. Advances in cytokinin signaling, Science 318:68-69

PEETERS, K., WILDE, C. D., JJAEGERr, G. D., ANGENON, G., DEPICKER, A., 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants, Vaccine 19(17-19):2756-2761

BAULEIN, H., BOERJAN, W., NARGY, I., BASSÜMER, R., MONTAGN, M. V., INZE, D., WOBUS, U., 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis plants, Molecular and General Genetics MGG 225: 459-467

BAUM, T. J., HIATT, A., PARROT, W. A., PRATT, L. H., HUSSEY, R. S., 1996. Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody spesific to stylet secretions of the root-knot nematode, Molecular Plant-Microbe Interactions 9:382-387

SVHELLER, J., HENGELLER D., VIVIANI, A., CONRAD, U., 2004. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation, Biomedical and Life Sciences 13: 51-57

CONRAD, U., MANTEUFFEL, R., 2001. Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plants cells, Trends in Plant Science 6(9):399-402

FIREK, S., DRAPER, J., OWEN, M. R. L., GANDECHA, A., COCKBURN, B., WHITELAM, G. C., 1993. Secretion of functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures, Biomedical and Life Sciences 23: 861-870

RASKIN, I., RIBNICKY, D. M., KOMARNYTSKY, S., ILIC, N., POULEV, A., BORISJUK, N., BRINKER, A., MORENO<, D. A., RIPPEL, C., YAKOBY,

N., O'NEAL, J., CORNWELL, T., PASTOR, I., FRIDLENDER, B., 2002. Plants and human health in the twenty-first century, Trends in Biotechnology 20(12):522-531

MA, J. K. C., HEIN, M. B., 1995. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants, Trends in Biotechnology 13(12):522-527

EECKHOUT, D., FIERS, E., SINAERT, R., SNOECK, V., DEPICKER, A., JAEGER, G. D., 2000. Isolation and characterization of recombinant antibody fragments against CDC2a from *Arabidopsis Thaliana*, European Journal of Biochemistry 267(23):6775-6783

BRADFORD, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry 72:248-254.

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature 227: 680–685.

HWANG, I., CHEN, C., SHEEN, J., 2002. Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis, Plant Physiology 129:500–515

KAKIMOTO, T., 2003. Perception and Signal Transduction of Cytokinins, Annual Review of Plant Biology 54:605-627

DOBREV, P. I., KAMONEK, M., 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction, Journal of Chromatography A 950(1-2):21-29

CLARK, G. B., THOMPSON, G., ROUX, S. J., 2001. Signal transduction mechanisms in plants: An overview, Current Science 80:170-177

GÜLAÇTI, İ., BULUT, H., BOLAT, Y., 2005. Sığır Vebası Virüsünün Hemaglutinin Proteinine Karşı Monoklonal Antikorun Üretimi ve Karakterizasyonu, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 19(1):1-5

BUKOVSKY A., GUPTA, S. BANSAL, P., CHAKRAVARTY, S., CHAUDHARY, M., SVETLIKOVA, M., WHITE, R., COPAS, P., UPADHYAYA, N., VAN METER, S., 2007. Production of monoclonal antibodies against recombinant human zona pellucida glycoproteins: utility in immunolocalization of

respective zona proteins in ovarian follicles, Journal of Reproductive Immunology 78(2):102-114

TAMAKI, V. Ve MERCIER, H., 2007. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple, Journal of Plant Physiology 164(11):1543-1547

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı. 2007-2008 akademik yılında, Çek Cumhuriyeti'nin Brno kentindeki, Masarykova Üniversitesi'nde Socrates-Erasmus öğrenci değişim programı kapsamında yüksek lisans tez çalışmasını sürdürdü.