

119745

POLİ(2-HİDROKSİETİLMETAKRİLAT-co-
METAKRİLOAMİDOHİSTİDİN) MİKROKÜRELERE
Cu(II) ŞELASYONU
VE SİTOKROM-c ADSORPSİYONU

Sibel EMİR DİLTEMİZ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2002



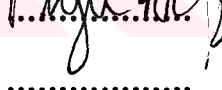
T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

119745

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen "01 10 08 nolu" proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sibel EMİR DİLTEMİZ'in 'Poli(2-Hidroksietilmetakrilat-co-metakrilo amidohistidin) Mikrokürelere Cu(II) Şelasyonu ve Sitokrom-c Adsorpsiyonu' başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 17-07-2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr. Rıdvan SAY	
Üye	:Prof.Dr. Adil DENİZLİ	
Üye	:Yard.Doç.Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	:
Üye	:

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
24.07.2002 tarih ve ..25/1.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Osman ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

POLİ(2-HİDROKSİETİLMETAKRİLAT-co-METAKRİLOAMİDOHİSTİDİN) MİKROKÜRELERE Cu(II) ŞELASYONU VE SİTOKROM-c ADSORPSİYONU

Sibel EMİR DİLTEMİZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Rıdvan SAY
2002, 61 sayfa

Bu çalışmada, Poli(2-Hidroksietil metakrilat-co-metakriloamidohistidin) [p(HEMA-co-MAH)] metal-şelat afinite sorbentlerinin geliştirilmesi ve bunların sitokrom-c adsorpsiyonunda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmanın birinci aşamasında, sitokrom-c spesifik metal şelat afinite sorbenti için p(HEMA-co-MAH) mikroküreler hazırlanmıştır. Sentezlenen polimerin karakterizasyonu elementel analiz, ¹H-NMR ve FTIR çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, poli(HEMA-co-MAH) polimerik mikrokürelerle Cu(II) iyonları şelat formda bağlanmış ve bu bağlanmaya ortam pH'ı ve Cu(II) başlangıç konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise histidin/Cu(II) takılı polimerik mikrokürelere sulu çözeltilerden sitokrom-c adsorpsiyonuna etki eden parametreler olarak Cu(II) başlangıç derişimi, sitokrom-c başlangıç derişimi ve ortam pH'ının etkileri çalışılmıştır. Son bölümde polimerik mikrokürelere adsorplanan sitokrom-c moleküllerinin desorpsiyonu ve mikrokürelerin tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sitokrom-c, Metal Şelat Afinite Kromatografisi, Protein-Metal Etkileşimi, Proteinler

ABSTRACT**Master of Science Thesis****Cu(II) CHELATION AND CYTOCHROME-c ADSORPTION TO
POLY(2-HYDROXYETHYLMETHACRYLATE-co-
METHACRYLAMIDOHISTIDINE) MICROBEADS****Sibel EMİR DİLTEMİZ****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof. Rıdvan SAY****2002, 61 pages**

In this study, development of poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylamidohistidine) [p(HEMA-co-MAH)] metal-chelate affinity sorbents and its usefulness for cytochrome-c adsorption were researched. In the first step, p(HEMA-co-MAH) microbeads were prepared for cytochrome-c specific metal chelate affinity sorbent. The characterization of synthesized polymer was evaluated by elemental analysis, ¹H-NMR and FTIR. Then, Cu(II) ions were loaded to p(HEMA-co-MAH) microbeads and the effect of pH and Cu(II) initiation concentration on loading of Cu(II) were investigated. In the third stage, the conditions like Cu(II) initiation concentration, cytochrome-c initiation concentration, buffer type, pH and ionic strength for the adsorption of cytochrome-c from aqueous solution were studied. Finally, desorption of adsorbed cytochrome-c on polymeric microbeads and reusability of microbeads were investigated.

Keywords: Cytochrome-c, Metal Chelate Affinity Chromatography, Protein-Metal Interaction, Proteins.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezin her aşamasında büyük ilgi ve anlayış göstererek beni destekleyen ve yol gösterici niteliğiyle her zaman bana ışık tutan değerli hocam Sayın Doç.Dr. Rıdvan SAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam süresince bölüm imkanlarını kullanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. D.Lale ZOR'a ve bu çalışmanın yapılabilmesi için maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu yönetimine teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkür ederim.

Deneyleri yaptığım Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde görevli değerli arkadaşlarım Araş.Gör. Yasemin ÇİMEN ve Araş.Gör. Ayça ATILIR'a, özellikle de eşim S.Fehmi DİLTEMİZE'e deneylerimin yapımı ve tez yazım aşamalarındaki yardımları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoafinite Teknolojisi.....	3
1.1.1. Biyoafinite Kromatografisi	3
1.1.2. Metal Şelat Afinite Kromatografisi.....	4
1.1.3. Serbest Çözeltide ve İmmobilize Formdaki Protein-Metal Etkileşimleri.....	8
1.1.4. İMAK’de Peptit ve Protein Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Mekanizmaları.....	8
1.1.4.1. pH Etkisi.....	9
1.1.4.2. Tuz Etkisi	10
1.1.4.3. Yarışmalı Ajanlar.....	12
1.1.5. Protein Saflaştırmasında İMAK Uygulamaları	12
1.1.6. İMAK’nin Bazı Avantajları.....	14
1.1.6.1. Denatürasyon ve Renatürasyon Durumunda İMAK Kullanımı	14
1.1.7. İMAK’nin Bazı Dezavantajları	14
1.1.7.1. Kolon İçinde Olması Muhtemel Redoks Tepkimeleri .	14
1.1.7.2. Metal Toksisitesi	15
1.2. Proteinler	16
1.2.1. Proteinlerin Denatürasyonu ve Renatürasyonu	20
1.2.2. Proteinlerin Sınıflandırılması	21
1.2.2.1. Sitokrom-c.....	22

1.3. Polimerler.....	25
1.3.1. Polimer Tanımı.....	25
1.3.2. Polimerlerin Sentezi.....	25
1.3.2.1. Zincir Polimerizasyonu.....	25
1.3.2.2. Kondenzasyon Polimerizasyonu.....	26
1.3.3. Polimerizasyon İşlemleri.....	26
1.3.3.1. Yığın Polimerizasyonu.....	27
1.3.3.2. Çözelti Polimerizasyonu.....	27
1.3.3.3. Süspansiyon Polimerizasyonu.....	27
1.3.3.4. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1. Materyal.....	29
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
2.2. Yöntem.....	30
2.2.1. Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması.....	30
2.2.1.1. pHEMA Mikrokürelerin Sentezi.....	30
2.2.1.2. 2-Metakrilamidohistidinin Sentezi.....	30
2.2.1.3. p(HEMA-co-MAH) Mikrokürelerin Hazırlanması.....	31
2.2.2. p(HEMA-co-MAH) Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	32
2.2.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü.....	32
2.2.2.2. Şişme Testi.....	32
2.2.2.3. Yüzey Morfolojisi.....	33
2.2.2.4. Elementel Analiz.....	33
2.2.2.5. FTIR Analizi.....	33
2.2.2.6. NMR Analizi.....	33
2.2.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	34
2.2.3.1. Polimerik Mikrokürelere Cu(II) Adsorpsiyonu.....	34
2.2.3.2. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom-c Adsorpsiyonu.....	34
2.2.3.3. Desorpsiyon Ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	35

3. BULGULAR	36
3.1. Polimerik Mikrokürelere Karakterizasyonu	36
3.1.1. Yüzey Alanı Ölçümü	36
3.1.2. Şişme Testi.....	36
3.1.3. Yüzey Morfolojisi	37
3.1.4. Elementel Analiz.....	40
3.1.5. FTIR Analizi.....	41
3.1.6. ¹ H-NMR Analizi.....	42
3.2. Polimerik Mikrokürelere Cu(II) Adsorpsiyonu	44
3.2.1. Cu(II) Başlangıç Derişiminin Etkisi	44
3.2.2. Cu(II) Adsorpsiyonuna pH Etkisi	45
3.3. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltilerden Sitokrom-c Adsorpsiyonu	46
3.3.1. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna Cu(II) Başlangıç Derişiminin Etkisi	46
3.3.2. Sitokrom-c Başlangıç Derişiminin Etkisi	46
3.3.3. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna pH Etkisi	47
3.3.4. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna Tampon Etkisi	48
3.3.5. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna İyonik Şiddet Etkisi.....	49
3.4. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sitokrom-c Desorpsiyon Çalışmaları	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	55
EKLER	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi	3
1.2. İDA metal-protein kompleksi	5
1.3. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının şematik gösterimi.....	7
1.4. Aminoasitlerin genel yapısı.....	16
1.5. Alfa-heliks yapısı.....	18
1.6. Beta tabakalı yapı.....	19
1.7. Sitokrom-c’de heme grubu demir atomunun methionin sülfür ve histidin azot atomuna bağlanması	22
1.8. Sitokrom-c yapısı	23
2.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi	31
3.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin SEM fotoğrafları.....	38
3.2. pHEMA mikrokürelerin optik fotoğrafı	39
3.3. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin molekül formülü.....	41
3.4. MAH monomerinin FTIR spektrumu.....	41
3.5. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumu.....	42
3.6. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	43
3.7. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O değişim).....	43
3.8. Polimerik mikrokürelere adsorplanan Cu(II) miktarının Cu(II) başlangıç derişimi ile değişimi.....	44
3.9. Polimerik mikrokürelere adsorplanan Cu(II) miktarının pH ile değişimi	45
3.10. Sitokrom-c adsorpsiyonuna Cu(II) başlangıç derişiminin etkisi	46
3.11. Sitokrom-c adsorpsiyonuna sitokrom-c başlangıç derişiminin etkisi.....	47
3.12. Sitokrom-c adsorpsiyonuna sodyum-fosfat tamponunda pH’ın etkisi	48
3.13. Sitokrom-c adsorpsiyonuna tampon etkisi	49
3.14. Sitokrom-c adsorpsiyonuna iyonik kuvvetin etkisi	50
3.15. Polimerik mikrokürelerin tekrar kullanılabilirlikleri.....	51
4.1. p(HEMA-co-MAH) mikroküreler ile sitokrom-c molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. 20 Amino asitin üç ve tek harfli adlandırılması.....	17
1.2. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması.....	21
1.3. Histidin-metal etkileşim özellikleri	24
1.4. Tuna balığı, at ve maya sitokrom-c'lerinin amino asit dizilimleri	25
2.1. 50-63 µm. Boyutunda ve % 65 şişme oranına sahip p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin hazırlanması için polimerizasyon şartları.....	32
3.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin elementel analiz verileri.....	40



1.GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknoloji, biyokimya, tıp ve eczacılık alanındaki gelişmeler özellikle genetik mühendisliğinde sağlanan ilerlemeler, biyomoleküllerin (enzimler, proteinler, hormonlar, nükleik asitler, vb) sentetik ortamlarda büyük kapasitelerle endüstriyel üretimini gündeme getirmiştir. Modern biyoteknolojik yöntemlerle üretilen veya biyolojik çevrelerinden (kan, vücut sıvısı, vb) ayrılarak elde edilen biyomoleküllerin çoğu saflıkla ilgili alanlarda kullanıldığından ürünlerin yeterli saflıkta olması gerekir. Bu da doğal olarak araştırmacıların ve endüstrinin biyomoleküllerin ayrılma ve saflaştırılma yöntemleriyle daha yoğun bir şekilde ilgilenmelerine yol açmıştır. Biyomoleküllerin saflaştırılmasında ürün saflığının yanısıra üzerinde durulması gereken en önemli husus şüphesiz ürünün biyolojik aktivitesini uygulanan işlemlerle kaybetmemesidir. Ürünün çok saf olması biyolojik aktivitesinin korunması zorunluluklarına ilave olarak biyomolekülün kompleks bir ortamdan ayrılması biyomolekül saflaştırılmasında kullanılacak yöntemleri, koşulları kısıtlamaktadır.

Kromatografik yöntemler, protein ve diğer biyomoleküllerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Scopes 1982). Zengin adsorban çeşitliliği ve bir çok proteini ayırma imkanı gibi popüler oluşuna ve geniş kullanımına imkan tanıyan pek çok sebep vardır. Jel filtrasyonu, iyon değişimi ve hidroksiapatit kromatografi 1950'li ve 60'lı yıllarda rutin olarak kullanılan ilk kromatografik tekniklerdir. Bu metodlar büyük miktarlarda proteinlerin saflaştırılmasını mümkün hale getirmiş, sonuç olarak bu dönemde protein saflaştırılması üzerine araştırmalar büyük oranda gelişmiştir. CNBr aktivasyon tekniğinin ortaya çıkışından sonra biyospesifik afinite kromatografisi hızla gelişmiştir. Bu afinite matriksleri proteinlerin olağanüstü spesifik biyolojik fonksiyonlarını tanıma avantajlarını izolasyon amaçlı kullanmışlardır. Biyospesifik afinite kromatografisinin geliştirildiği ilk yıllarda diğer yöntemlerin devre dışı kalacağı düşünülmüştür (Chaiken 1983). Ancak, bu yöntemin proses ölçeğinde geniş kullanımını engelleyen ilk etapta görülmeyen bazı problemler ortaya çıkmıştır. Bu problemler arasında biyolojik ligandların pahalılığı, biyolojik

kararlılık ve immobilize ligandın aktivite eksikliği, ligand sızıntısı ve düşük bağlanma kapasitesi sayılabilir. Bu problemlere cevap olarak bazı araştırmacılar nükleotid ve immobilize koenzim bazı grup spesifik adsorbanların geliştirilmesine çalışmışlardır. Bunun bir sonucu olarak, sentetik ligand taşıyan adsorbanlara duyulan ilgi, biyospesifik afinite özelliğinden daha ziyade pratik olmaları gerekçesiyle artmıştır.

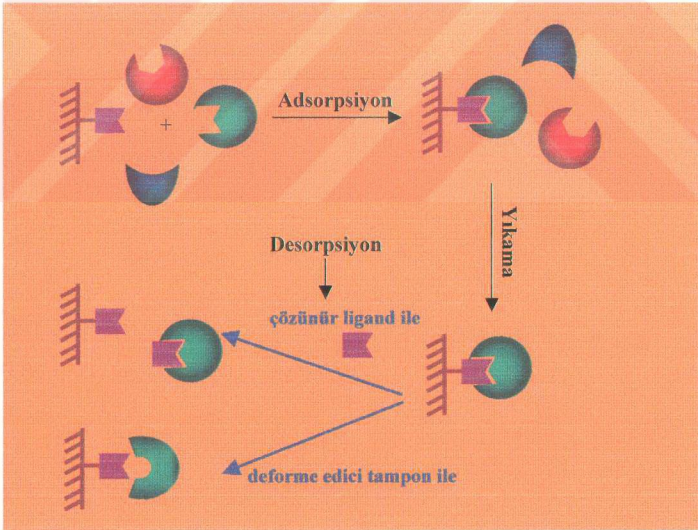
Günümüzde endüstriyel veya laboratuvar boyutlarındaki saflaştırma tekniklerinde, birden fazla ayırma prosesinin ardarda kullanıldığı not edilmelidir. Biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için, birçok durumda en spesifik yöntem şüphesiz biyoafinite kromatografisidir (Gribnan 1982). Bu yaklaşımda genellikle spesifik biyolojik tanıma yeteneğine sahip ligandların takılı olduğu biyosorbentler kullanılır. Ligandların yüksek maliyeti nedeni ile biyoafinite tekniğinin, özellikle endüstriyel boyutta tek başına uygulanması ekonomik değildir. Bu nedenle daha ucuz fakat aynı zamanda spesifitesi yüksek ayırma tekniklerinin geliştirilmesi için yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen metal-şelat afinite kromatografisinde klasik biyoafinite kromatografisine alternatif olarak biyoligandların yerine oldukça kararlı ligandlar (iminodiasetikasit, EDTA, vb) ve bunlara şelat formda takılmış metal iyonları kullanılmaktadır. Metal-şelat afinite kromatografisinde temel ayırma özelliği proteinlerin özellikle geçiş metal iyonlarına olan yüksek ilgisidir. Çok sayıda geçiş metal iyonu (özellikle nikel, çinko ve bakır) histidin, sistein ve triptofan gibi protein zincirindeki aminoasitlere bağlanabilirler. Histidin, sistein ve triptofan gibi aminoasitlerin metal iyonları ile şelat etkileşimi ilk kez Porath tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra bu alanda çok sayıda çalışma gerçekleştirilerek değişik biyomoleküllerin saflaştırılması başarılmıştır. Bu yöntemin en önemli avantajı ligandların ucuz ve kararlı olmalarıdır.

1.1. BİYOAFİNİTE TEKNOLOJİSİ

1.1.1. Biyoafinite Kromatografisi

Biyoafinite kromatografisi, biyomoleküllerin (enzimler, proteinler, hormonlar, nükleik asitler vb.) ayrılması, saflaştırılması ve tanımlanmaları için oldukça etkili bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde spesifik tanımayı sağlayan ligand, bir destek materyaline (genellikle membran ya da küre formundaki polimerik materyale) immobilize edilir. Ligand olarak; enzimler, koenzimler, kofaktörler, antitadiler, aminoasitler, oligopeptidler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel moleküller kullanılabilir (Chase 1988 ve Denizli 1995). Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.1’de verilmiştir.



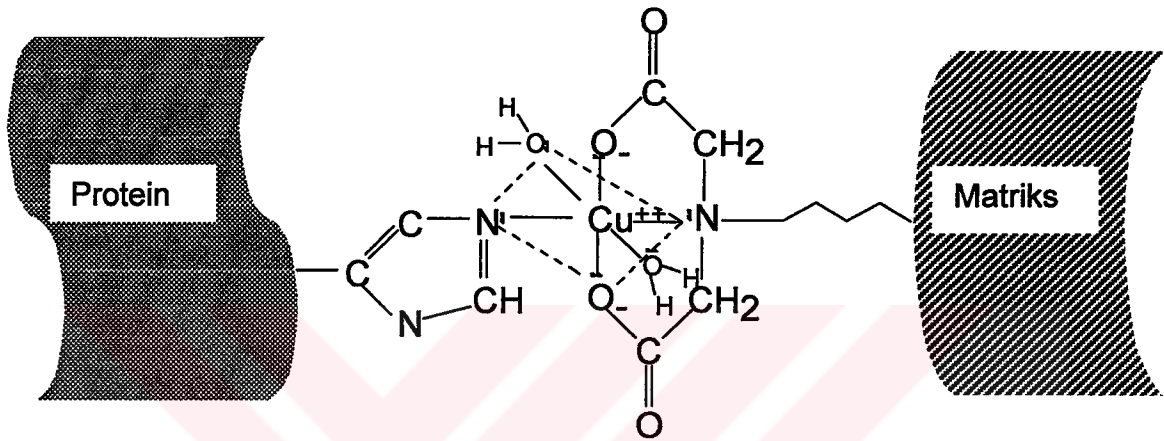
Şekil 1.1. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi

Ayrılacak olan biyomoleküllü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan biyomolekül ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık değişimi veya üre, guanidin gibi ayrıştırıcı ajanlar ile) veya ligandın çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu, iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliği ve etkinliğini oluşturan en temel etmendir (Scopes 1982; Scouten 1981; Gribnan 1982; Chaiken 1983 ve Sundaram 1978).

1.1.2. Metal Şelat Afinite Kromatografisi

Bir çok protein ve peptidin ağır metal iyonlarına afinitesi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Immobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK)'nın başlangıcı, Helfferich' in küçük moleküllerin "ligand değişim kromatografisi" ni öne sürdüğü 1961'e kadar uzanabilmektedir. Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından etraflıca gözden geçirilmiştir (Davankov ve ark. 1977). Makromoleküller için bir afinite ligand olan iminodiasetatın kullanımı, Porath ve arkadaşları tarafından 1975'den sonra geliştirildi. Daha sonra Porath, ligand değişimini de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin bütün şekillerini kapsayan "immobilize metal iyon afinitesi" terimini ortaya koydu (Porath 1975 ve 1983). Porath, bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak, saflaştırılabildiğini gözlemledi. Katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanımı, protein-metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltır. Bu kısıtlama, proteinlerin zengin saflaştırılması ve ayrılmasına olanak sağladığı gibi, denaturasyonu azaltabilir ve aktivitesini devam ettirebilir.

Metal afinite ile protein adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistenin tiyol ve histidin imidazol grubu gibi ortaya çıkan elektron verici amino asit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanısıra elektrostatik, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimlerini de içermektedir.



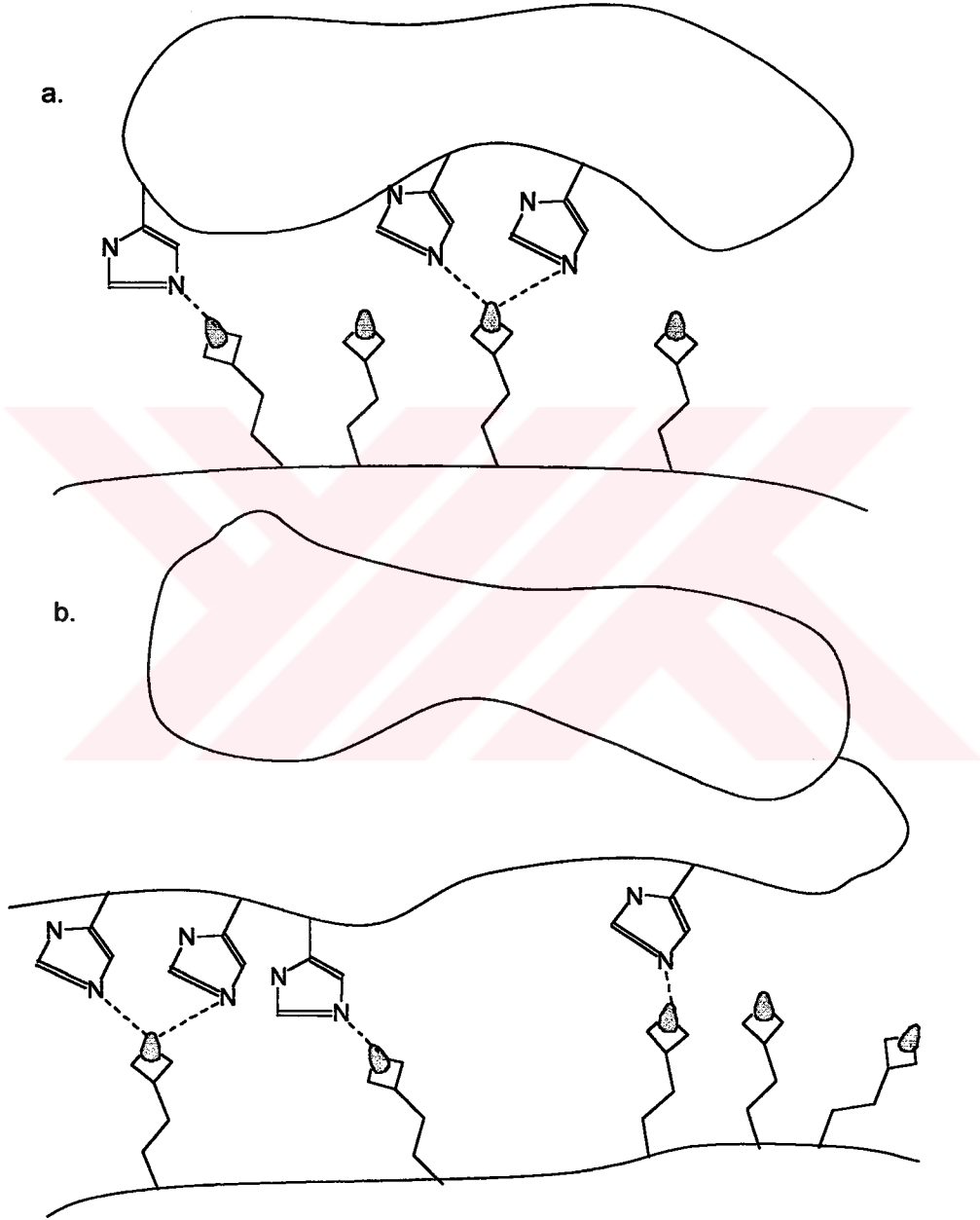
Şekil 1.2. İDA Metal-Protein Kompleksi. İmmobilize bir Cu⁺⁺ iyonuna bağlı bir proteinin histidin kalıntısının şematik gösterimi. Metal, katı bir desteğe bağlı İDA ile şelat oluşturuyor.

İMAK' de proteinlerin adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupları ile immobilize bir metal iyonu arasındaki koordinasyon oluşumuna dayanır. Şekil 1.2. Afinite desteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir. Çoğunlukla kullanılan metaller, Lewis asitleri olarak düşünülebilen ve elektron çifti kabul eden Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(II), gibi geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelat oluşturucu bileşiklerde bulunan (N, S, O) gibi elektron verici gruplar, ortamda bulunan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak, iki dişli, üç dişli vb olabilen metal şelatları oluşturarak, metal iyonları ile koordinasyon bağı yapabilirler. Geride kalan metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından işgal edilir. Daha sonra proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilir. Bazı amino asitler, özellikle yan zincirlerindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glu, His, Arg, Lys, Asp, Tyr, Cys ve Met gibi çoğu kalıntıların bağlanmaya katılabilmesine rağmen, İMAK' de

proteinin gerçekte alıkonması histidil kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Trp, Phe ve Tyr gibi aromatik yan zincire sahip amino asitlerde, eğer dışarı uzanabilen histidil kalıntılara yakın iseler onlarda bağlanmaya katkıda bulunabilir (Porath 1988; Arnold 1991 ve Sulkowski 1989).

İMAK desteklerine protein adsorpsiyonu, histidin kalıntılarındaki imidazol azotunun, nötral veya hafif bazik ortamlarda protone olmadığı pH'larda gerçekleşir. Genellikle relativ olarak spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri indirgemek için 0.1-1.0 M NaCl ihtiva eden yüksek iyonik şiddetli tamponlar kullanılır. Hedef proteinin elusyyonu ortamın protonlanması, ligand değişimi veya EDTA gibi güçlü bir şelat oluşturucuyla metal iyonunun uzaklaştırılması yöntemleri ile yapılır. Hedef protein elusyyonu için düşürülen pH gradientleri veya düşük pH'lı elusyon tamponları kullanılır. Düşük pH'ya hassas proteinler için nötral pH civarında imidazol ile ligand değişimi daha uygundur. Bu durumda imidazolun protonlanarak meydana getirdiği pH düşmesinden sakınmak için İMAK kolonları kromatografik ayırmalarda önce imidazol ile doyurulur ve dengeye getirilir (Sulkowski 1996 a,b). EDTA gibi güçlü şelat oluşturucu ajanların kullanılması da bağlı proteinlerin elusyonunu sağlar; fakat bu durumda sorbentin bağlama etkisi tahrip edildiği için, bir dahaki ayırmadan önce matriks tekrar şelat oluşturucu iyon ile yüklenmelidir.

Afinite kromatografisinde, geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında, İMAK pek çok avantaja sahiptir (Porath 1983). Farklı metal iyonları, şelat oluşturucu ligand üzerine immobilize edilebilir ve daha güçlü şelat yapan başka bir ajan ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Metal bağlama özellik kaybını minimum düzeyde tutmak için, şelat oluşturucu jel sabitleştirilmelidir. Özel ayırma metotları, uygun metal seçimi ile çalışılabilir ve protein ile ligand arasında farklı adsorpsiyon özellikleri, şelat oluşturucu liganda farklı metal iyonlarının immobilize edilmesiyle başarılabılır. Çoğu durumda proteinler, İMAK kolonlarından elue edildikten sonra bile hala aktivitelerine sahiptirler (Porath 1983). Bir çözelti aynı zamanda, içinde metal iyonları olmayan bir İMAK kolonundan geçirildiğinde çözelti, içindeki metal iyonlarının uzaklaştırılmasıyla sterilize edilebilir. Bu basamak, bakterilerce ihtiyaç duyulan metal besinlerinin uzaklaştırılmasıyla bakteriyel kontaminasyon riskini önler.



Şekil 1.3. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi.
a. Protein yüzeyindeki histidin grupları ile metal-şelat etkileşimi
b. Proteinin C veya N terminaline ilave edilen His-etiketi ile metal-şelat etkileşimi

1.1.3. Serbest Çözeltide ve İmmobilize Formdaki Protein-Metal Etkileşimleri

Serbest çözeltideki protein-metal iyonu etkileşimlerinde göz önünde bulundurulacak olan birkaç faktör vardır (Williams 1971). Karboksil, imidazol ve sülfidril gibi yan zincir grupları, terminal amino ve karboksil gruplarına metal iyonu bağlamada daha etkindir. Ligand grupları üzerindeki yükler, metal iyonu ile bağlanma afinitesine etki eder. Metal iyonları için bağlanma sabitleri pH'nın düşmesiyle azalır, çünkü: $-NH_2$, $-S^-$ ve $-COO^-$ gibi ligandlara bağlanmak için protonlar, metal iyonlarıyla yarışmaya başlarlar. Protonlanmış amino grupları üzerindeki pozitif yük, pozitif yüklü metal iyonlarını uzaklaştırır, ayrıca karboksilat ve sülfür gruplarının protonlanması, metal iyonlarına olan çekici gücü yok eder.

Çözeltideki doğal bir proteinin üçüncül yapısı, protein üzerindeki fonksiyonel ligandların bir metal iyonuna yaklaşmasını engeller. Proteinler pek çok ligand gruplarına sahip olmasına rağmen, ancak bir veya iki metal iyonu onlara bağlanabilir. Bazen bir metal iyonu sadece bir grup tarafından tutulabilir. Belirli proteinlerde aktif merkez olarak isimlendirilen bazı ligand grupları, bir metal iyonu ile yapılan şelat oluşturmada düzenleyici rol oynar. Diğer proteinlerde ligand vericiler, o kadar iyi düzenlenmeyebilir ve metal iyonu iki farklı grup arasında tutunabilir. Bir metal iyonuna elektronlarını verebilen herhangi bir grup, bunu bir proteine de yapabilir; bundan dolayı, metal iyonlarıyla proteinler arasındaki yarışma çok önemlidir. Sonuç olarak, immobilize bir metale protein bağlanması pH ve iyonik şiddete bağlıdır.

1.1.4. İMAK'da Peptit ve Proteinlerin Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Mekanizmaları

Afinite kromatografisinde, proteinlerin ayrılması nicel olarak, proteinlerin sıvı afinite ekstraksiyonuna benzer şekilde, çeşitli katkıların toplamı olarak tanımlanabilir:

$$\ln K = \ln K_{\text{elektrostatik}} + \ln K_{\text{hidrofilik}} + \ln K_{\text{konformasyon}} + \ln K_{\text{ligand}} \quad (1.1)$$

Burada indisler, elektrostatik, hidrofilik/hidrofobik yüzey etkileşimleri ve protein ligand etkileşimleriyle oluşan konformasyon değişimlerini gösterir.

Spesifik metal iyon-protein koordinasyon kompleksleri oluşumunda, elektrostatik, hidrofobik ve yük-transfer etkilerinin yanında, metal-iyon protein etkileşimleri de etkin olabilir. Proteinlerin bağlanması, bu elektronca zengin amino asitlerin, metal komplekslerindeki zayıf koordine olmuş su ile yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Metal, bu amino asitlere elektron verebilir veya bunlardan elektron alabilir. Bir protein, sabit bir matriks ile şelat oluşturmuş bir metalle etkileştirildiğinde, koordinasyon bağları ve çok noktalı bağlanma yapabilir. Bu bağlanma, yüksek tuz derişimlerinde seçimlidir. Çünkü yüksek iyonik güç, elektrostatik etkileşimlerin olasılığını azaltır (Smith ve ark. 1988).

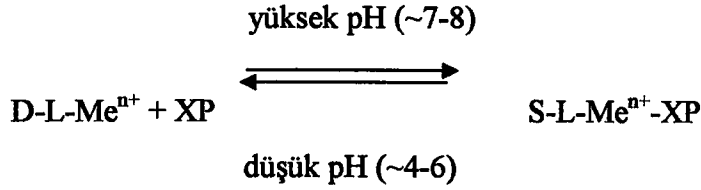
Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri, protonlama, iyonik şiddet değişimi, ligand değişimi veya şelat oluşumunu engelleyerek gerçekleştirilebilir. Protonlama, elusyon için yaygın bir prosedürdür. Protein yüzeyindeki elektron verici grubun protonlanması, koordinasyonu tersine çevirerek proteinin ayrılmasını sağlar.

Bakır, çinko, kobalt veya nikel gibi sınır Lewis asitleri kullanıldığında, adsorpsiyon, yüksek tuz derişiminde gerçekleşir. Adsorpsiyon kapasitesi ve seçimliliği tampondaki tuz derişimi arttıkça artar. Tuz derişimini azaltmak, bazı proteinler için desorpsiyona neden olabilir. Elektrolitlerin tutunma üzerindeki etkisi, metal iyonlarının solvate olmuş su moleküllerine ilgisiyle bağlantılıdır. Metal iyonlarıyla su molekülleri arasındaki çekim gücünün, tuz tarafından zayıflatılması, adsorpsiyon prosesini kolaylaştırır. İyonik şiddet arttıkça adsorpsiyon seçiciliği arttığına göre, proteinlerin kısmi ve seçimli elusyonu, eluentteki tuz derişimini azaltarak gerçekleştirilebilmelidir.

1.1.4.1. pH Etkisi

Adsorpsiyon/desorpsiyon basamağı bütün afinite kromatografisi proseslerinin kalbidir. Proteinlerin İMAK jeline adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupların, protonlarını kısmen kaybettikleri bir pH' da

gerçekleşir. Protein adsorpsiyonu genellikle zayıf bazik bir pH' da yapılır. Spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak için, pH tamponuna bir tuz katılır. Fosfat ve asetat tamponları yaygın olarak kullanılır. “Reaksiyon” şöyle gösterilebilir:



Burada D desteği, L ligandı, Me^{n+} immobilize metal iyonu ve X, P proteininin aktif yan gurubunu sembolize eder.

pH, alıkonma ve elusyon proseslerinde karmaşık bir rol oynar, çünkü: Tampon bileşenlerinin nükleofilik davranışını, çözücülerin elektron alıcı-verici özelliklerini ve metallerin kararlılığını etkiler. Histidin veya sistein seçiciliğinin pH 6-8 aralığında yüksek olmasından dolayı, bu grupları taşıyan proteinlerin adsorpsiyonu bu pH aralığında gerçekleşir. Bazik bir pH değerinde, amino gruplarıyla koordinasyon gerçekleşir; böylece adsorpsiyon daha etkin fakat daha az seçimli olur.

1.1.4.2. Tuz Etkisi

Proteinlerin yüksek pH (7 veya 8) ve yüksek tuz derişiminde koordine veya kovalent bağlanmaya dayalı adsorpsiyonunun karakteristikleri İMAK'yi iyon değişim kromatografisinden farklı kılar. İMAK bazı yönlerden hidrofobik etkileşim kromatografisine benzer, çünkü, sınır metalleriyle protein adsorpsiyonu, ortama tuz katılmasıyla artar. El-Rassi ve Horvath proteinlerin çıplak ve metal bağlı IDA-silika kolonlarındaki tutunma davranışını çeşitli amonyum sülfat derişimlerinde, 25 mM fosfat tamponu kullanarak izokratik elusyon ile incelemiştir. Veriler, biyopolimerlerin elektrostatik ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde tutunma verilerini çözümlmek için kullanılan aşağıdaki ifadeye uymuştur.

$$\log k' = A + B \log m + C m \quad (1.2)$$

Burada k' tutunma (retention) faktörü, m tuz molalitesi ve a da sistemin karakteristik bir parametresidir. B ve C ise, sırasıyla, elektrostatik ve hidrofobik parametrelerdir.

Verilerin denklem (1.2) ye uyması İMAK' deki hidrofobik ve elektrostatik faktörlerin etkileşmesi hakkında fikir vericidir.

Tutunma, elektron verici amino asitin, sabit faza bağlı metalle yakın temasa geçmesi durumunda gerçekleşir. Bu teması sağlamak için protein hareketli fazın dışına zorlanır; bunun için, kendisi metalle kompleks oluşturmayan kozmotropik tuzlar kullanılır. Pek çok araştırmacı, yüksek kozmotropik tuz derişiminde, çıplak İDA kolonlarında protein alıkonmasının, spesifik olmayan etkileşimlerin (kısmen hidrofobik etkileşmeler) rolünü gösterdiğini gözlemiştir (Sulkowski 1985). Tuzlar, proteinleri sulu çözeltilerinden çöktürme yeteneklerine göre bir lyotropic veya Hofmeister serisi şeklinde düzenlenebilir (Porath ve ark.1986 ve 1989):

fosfatlar < sülfatlar < asetatlar, florürler < klorürler < bromürler, perklorürler, nitratlar < tiyosiyanürler



sodyum < magnezyum < kalsiyum, baryum < manganez, nikel

Hidrofobik etkileşmeler, yalnızca proteinin kararlılığına katkıda bulunmaz, aynı zamanda kromatografik matriks yüzeyine adsorpsiyonu destekler. Kozmotropik tuz-destekli adsorpsiyon; proteinin, çözeltilerinden matriks yüzeyine doğru hareket ettirilmeye zorlanmasıyla meydana gelir. İMAK de, sıvı faz çok

doğru hareket ettirilmeye zorlanmasıyla meydana gelir. İMAK de, sıvı faz çok hidrofilik tuzlarla yüklendiğinde, immobilize metal iyonları ile kaplanmış hidrofobik özellikli polimerik veya silika matrikslerine yakın bölgeler, proteinlerce zenginleşir. Eğer tutturulmuş ligandlar yeterince esnek ise, o zaman bunlar protein molekülünde bulunan çatlak ve yarıklara girebilirler. Sonuç olarak kısa düzeyli çekici kuvvetler etkili olur. Adsorpsiyon, proteinin elektron verici amino asit gruplarının, metalin koordinasyon küresinin dış tarafına yaklaşmasıyla oluşur. Bu oluşum yük transferini ve metalin bağ kuvvetlerinin etkinlik kazanmasını sağlar.

1.1.4.3. Yarışmalı Ajanlar

Seçici desorpsiyon yapmanın diğer yaygın bir metodu, protein üzerindeki adsorpsiyon bölgelerine, immobilize edilmiş metalden daha yüksek afiniteye sahip bazı maddeleri, yürütücü faza ilave etmek veya adsorpsiyon bölgelerine proteinler ile yarışmalı bir şekilde bağlanan maddeler kullanmaktır. Nötral pH ve düşük konsantrasyonlarda (50mM) imidozol veya histidin içeren seçici gradientin kullanılması, bağlanmış proteinlerle yerinden çıkarmak için etkin bir metottur.

İmmobilize proteinlerin elusyonundaki son çare, immobilize şelat oluşturmuş metal komplekslerini düşük pH larda bozmak yada histidin eklemek veya EDTA gibi güçlü bir şelatlayıcı ajan eklemektir. Şelatlar oluşturmuş metalin ortama salınması proteinleri elue eder, fakat kolon substratının etkinliğini tahrip eder ve eluentdeki proteini denature edebilir.

1.1.5. Protein Saflaştırılmasında İMAK Uygulamaları

İMAK genetik olarak düzenlenmiş proteinlerin saflaştırılmasında etkindir. Smith ve arkadaşları, rekombinant peptit zinciri sonunda bulunacak olan ve bağlanma için immobilize metal iyonu tercih edecek olan spesifik metal şelatlı peptit kabulü temeline dayanan şelatlı peptid-immobilize metal iyonu afinite kromatografisi geliştirmişlerdir (ŞP-İMAK) (Smith 1988). Rekombinant peptitlerin Co^{2+} , Ni^{2+} ve Cu^{2+} yüklü İDA-İMAK kolonlarına karşı yüksek afinite

gösterdiklerini saptamışlardır. Şelat oluşturu peptit, ilgili proteini şelat oluşturu peptidi içeren, birbirinin içine dağılmış bir proteinin, NH₂ terminal ucuna klonlanabilir. Daha sonra şelat oluşturu peptit, ayırma teknikleri kullanılarak ortandan uzaklaştırılabilir. Bu çalışmanın önemi, tercih edilen bağlanma bölgesinin, saflaştırmayı kolaylaştırmak için birbirinin içinde bulunan bir protein ile birleşebilirliğini gösterebilmektir. Bir peptit olan insülinin ön maddesi, bu teknik kullanılarak saflaştırılmaktadır. Bu ön madde, diğer histidin kalıntılarını da içerir fakat, onlar peptitin primer yapısı içindeki konumları dolayısıyla, immobilize metale bağlanmada küçük bir paya sahiptirler.

Histidin aminoasiti modifiye proteinler ile, metal iyonu arasındaki bağlanmanın azalması, İMAK' daki protein bağlanmasında histidinin önemli rolünü gösteriyor. Bu sonuçlar, protein ile metal arasındaki etkileşimde, histidinin baskın bir rol oynadığına dair Porath' ın yaptığı ilk gözlemleri desteklemektedir. Al-Mashiki ve arkadaşlarında, peynir suyundan gelen immunoglobulin ve laktoferrinin ayrılmasında benzer şekilde modifiye edilmiş histidin guruplarını İMAK' a uyguladılar. Histidinin, immobilize metal için önemli bir bağlanma bölgesi olarak bulunmasına rağmen, DEP-Ig' nin küçük bir miktarının kolona adsorbe olduğu bulundu. Bu sonuç, immobilize metal ile diğer aminoasitlerin (büyük olasılıkla sistein) etkileşimi ileri sürmektedir.

İMAK adsorbentlerinin protein adsorplama kapasiteleri genellikle, küçük iyon adsorplama kapasitelerinden oldukça küçüktür. Bu durumun, adsorpsiyon merkezleri ile, proteinler arasındaki sterik etkilerden kaynaklandığı görülmektedir. Hutchens ve arkadaşlarının sonuçları, bazı ligandların, proteinlerin büyüklüğünden dolayı kullanılamaz olabileceğini göstermektedir (Porath 1990). Wong, en yüksek yükleme oranında, her bir lizozim, miyogloblin ve kimotripsinojen moleküllerinin sırasıyla 5, 9 ve 11 İMAK merkezini kapladığını bulmuştur (Wong 1990).

1.1.6. İMAK' ın Bazı Avantajları

1.1.6.1. Denatürasyon ve Renatürasyon Durumunda İMAK Kullanımı

Bugün pekçok rekombinant proteinler, E. Coli de genetik olarak üretilen heterolog genlerin hücre içi ekspresyonu ile üretilir. Hücre içinde toplanan rekombinant proteinler sık sık hatalı katlanmış proteinlerin çözünmez agregatları formunda depolanırlar. Saf, biyolojik olarak aktif proteinlerin üretimi, klasik olarak diyaliz veya dilüsyon gibi küçük etkinliği olan teknikleri birleştiren denatürasyon ve renatürasyon işlemlerini içermektedir. İMAK guanidin-HCl veya denatüre edici üre konsantrasyonları varlığında histidin işaretli proteinleri etkili olarak ayırabilme avantajına sahiptir. İlaveten ardarda gelen histidinler ile afinite oluşturma, tek İMAK basamağında etkin bir saflaştırma ve renatürasyonu mümkün kılar. Gata-1 protein (Apezteguia 1994), *Mycobacterium tuberculosis* antijenleri (Collangeli 1998) ve iki farklı membran proteini denatüre edici şartlar altında saflaştırılan histidin işaretli proteinlere örneklerdir. Bu proteinler halen katı desteğe bağlıyken katropik ajan konsantrasyonu düşürülmesiyle, biyolojik olarak aktif formu olan renatüre formlarında İMAK kolonlarından elue edilmişlerdir.

1.1.7. İMAK' ın Bazı Dezavantajları

1.1.7.1. Kolon içinde olması muhtemel redoks tepkimeleri

Özellikle His, Lys, Cys, Pro, Arg ve Met gibi amino asitler, çeşitli proteinlere zarar verebilen yüksek oranda reaktif radikal moleküller üreten metal-katalizli oksidasyon reaksiyonlarına karşı hassastırlar (Krishnamurty 1995). Dikkat edilmelidir ki, Cu(II) iyonları gibi metal şelatlar, proteinlerin belirli bölgelerinin ayrılmasında kullanılabilir. Proteinlerin temel yapılarının bozulması ve amino asit yan zincirlerinin tahribi çok da sürpriz değildir ve kromatografi süresince provoke edilir. Böyle bir durumda, Zn(II) gibi daha az aktif bir metal

iyonunun, Cu(II) gibi yüksek redoks-aktif bir iyon ile yer değiştirmesi protein tahribatını önleyebilir veya en azından minimize edebilir (Krishnamurty 1995). Rutin İMAK ayırmalarının çoğu, örnek veya tamponda çözünen oksijenden dolayı aerobik ortamda yani hafifçe oksidatif şartlarda yürütülür. İMAK kolonunda metal katalizli reaksiyonlar veya reaktif oksijen türevinin proteinler üzerindeki potansiyel tahribatı bugüne kadar yeterince çalışılmamıştır. Hidrojen peroksit, askorbat veya özellikle bu kombinasyonun ikisi birlikte elüsyon tamponuna ilave edildiği zaman, Cu(II) –İDA kolonlarında protein aktivitesinde önemli bir kayıp gözlemlendi (Krishnamurty 1995). Bu olay, Fenton reaksiyonu, $(Mn^{+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Mn^{(n+1)+})$ ile üretilen hidroksil radikalleri reaksiyonlarına atfedildi. Kısa model peptidler ile yapılan deneyler, histidinin bu tür reaksiyon tipleri ile çabucak etkileştiğini göstermiştir (Khosravi 1998). Bundan dolayı, gerçek İMAK kolonlarında oksidatif radikallerin oluşturduğu bir potansiyel zarar mevcuttur. Özellikle hidroperoksi bileşikler ile kontamine olan Tween 80 veya Triton X-100 gibi çoğunlukla kullanılan deterjanlar ile yapılan elüyonlarda, protein tahrip olur. Düşük kolon temas süresi ve süper akış matrikslerinin kullanılması böyle durumlarda tercih edilir. İMAK denatüre edici şartlarda kullanıldığında, virüs ile enfekte edilen bir hayvan hücresi içindeki virüs partiküllerini çözmek için kullanılan tamponlara ve aynı zamanda disülfid bağlı agregatların oluşumunu önlemek için kromatografi süresince genellikle β -mercaptoethanol (β -ME) veya dithiotreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanlar ilave edilir (Leo ve ark. 1996).

1.1.7.2. Metal Toksisitesi

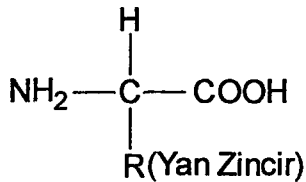
Her İMAK kolonunda metal iyonları sızması, elüsyonun tarzına ve şelatlayıcı ajanın türüne bağlı olarak meydana gelir. Ni-NTA veya TALON gibi dört dişli şelatlayıcı ajanlar, üç dişli lere nazaran daha üstündür. Ni-NTA sızması 1 ppm gibi çok küçük bir değerdedir. Bunun yanında Ni-NTA agarozu kullanma, His6-işaretli restrüksiyon endonükleaz Eco-RV 'ın 1 molü başına 2 mol Ni(II) kontaminasyonunu göstermektedir (Ball ve ark. 2000).

Ni(II) bileşiklerinin kanserojen olduğu düşünülmektedir. Bu etki henüz kesinleşmemesine rağmen, bazı moleküler modeller Ni(II)'nin, hücre çekirdeğindeki histonlar ile etkileştiğini ve DNA tahribatına neden olduğunu ileri sürmektedir. İnsan H4 histonlarının N-terminal bölgesini taklit eden sentetik oligopeptitlerin analizi, histidinin bir metal bağlayıcı bölge olarak hareket ettiğini teyit etmekte ve bir ihtimal bunun da Ni(II) toksisitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. (Zoroddu ve ark. 2000).

1.2. PROTEİNLER

Proteinler bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerin de en bol bulunan organik bileşikleridir. Bütün biyolojik olaylarda hayati görevleri vardır. Fonksiyonu ve biyolojik aktivitesi ne olursa olsun bütün proteinler 20 standart amino asitten meydana gelmiştir (Voet 1999). Amino asitlerin gerçek bir biyolojik aktivitesi olmamasına rağmen polipeptit zincirlerine yapı taşı olarak girdikten sonra oluşturdukları proteinlerin bir kısmı enzim aktivitesine, bir kısmı hormon aktivitesine, bir kısmı antikor aktivitesine, diğer bir kısmı ise yapısal fonksiyon görmek üzere özelleşmiştir. Bu kadar çeşitli ödevler gören proteinleri birbirinden ayıran yapıdaki amino asit dizilimindeki farktır.

Proteinler, Çizelge 1.1.'de verilen 20 amino asitin farklı sıralanması ve bir zincir üzerinde, kondensasyon polimerizasyonu ile birleşmesiyle oluşurlar. Bir amino asit molekülü aynı karbon atomuna bağlı amino (NH₂), karboksil (COOH), alkil (R) grubu ve H atomundan ibaret olup, genel yapısı Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.



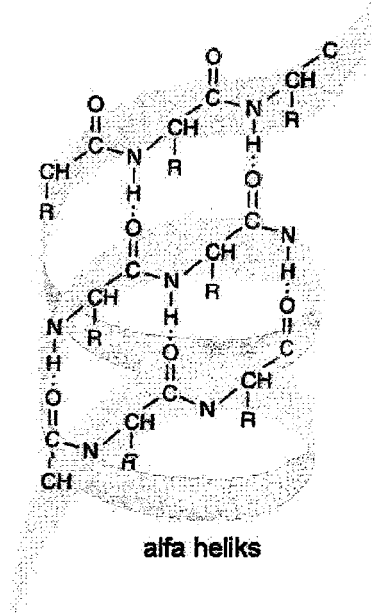
Şekil 1.4. Amino asitlerin genel yapısı

Proteinleri oluşturmak üzere amino asit molekülleri birinin amino grubuyla (-NH₂) diğerinin karboksil grubu (-COOH) arasında bir molekül su çıkışı ile yürüyen kovalent bağ kurulmasıyla birleşir. Oluşan bağ peptit bağı olarak tanımlandığından protein molekülleri polipeptit zincirler olarak da anılır.

Amino asitler peptid bağlarıyla birleşip, bir ucunda serbest -NH₂ ve diğer ucunda serbest -COOH grubu olan bir polipeptid zinciri oluşur ve bu zincir yapısı içinde disülfid çapraz bağlanmaları da bulunur. Yüzlerce amino asidin oluşturduğu protein molekülünün sulu çözelti içinde uzunca tek bir zincir halinde kalması mümkün değildir. Amino asitlerin yan grupları ve polipeptid zinciri omurgası üzerindeki polar bölgeler arasında bir takım etkileşmelerin olacağı muhakkaktır. Pauling ve Corey bir çok polipeptid konformasyonunu, moleküler modellerini yaparak değerlendirdiler. 1951'de bu çalışmalarına dayanarak iki tip periyodik polipeptid omurga yapısı ileri sürdüler: α -heliks ve β tabakalı yapı. α -heliks, çubuğumsu bir yapıdır. Sıkıca sarılmış polipeptid omurgası çubuğun iç kısmını teşkil ederken, R grupları da bir sarmal düzeninde dışarıya doğru uzanırlar. α -heliks, zincir omurgası üzerindeki NH ve CO grupları arasında oluşan hidrojen bağları ile stabilize edilirler. Her bir amino asidin -CO grubu, sıralanışta kendisinden 4 kalıntı sonra gelen amino asidin NH grubuna hidrojen bağıyla bağlanır.

Çizelge 1.1. 20 amino asitin üç ve tek harfli adlandırılması

AMİNO ASİT	ÜÇ HARFLİ KISALTMA	TEK HARFLİ KISALTMA
Alanin	Ala	A
Arjinin	Arg	R
Asparajin	Asn	N
Aspartik asit	Asp	D
Sistein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamik asit	Glu	E
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
İzolözin	Ile	I
Lösin	Leu	L
Lisin	Lys	K
Methionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

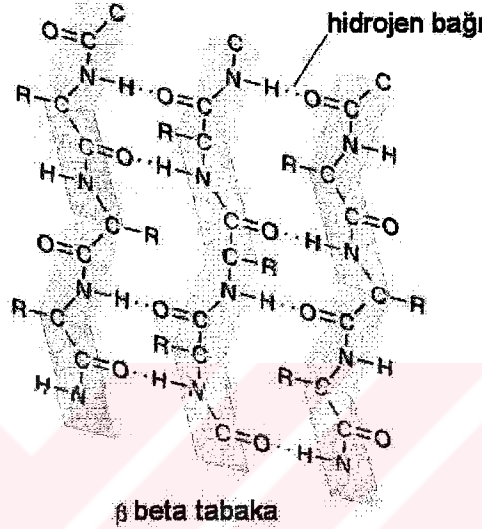


Şekil 1.5. Alfa-heliks yapı

Bu şekilde protein omurgasında bulunan bütün CO ve NH grupları hidrojen bağları oluşturabilir. Eğer sarılmayı yukarıya doğru düşünürsek, birbirini takip eden amino asitler arasında $1,5 \text{ \AA}$ luk bir mesafe, 100° lik bir dönüş gözlenir. Sarmalın bir dönüşü 3,6 adet amino aside karşılık geldiğine göre ($360/100=3,6$), aynı zamanda bir dönüşün yüksekliği $5,4 \text{ \AA}$ ($1,5 \times 3,6$) olarak bulunur. Sarmal sağ el veya sol el yönünde olabilirse de bütün bilinen proteinlerde α -heliks sağ el yönündedir (Keha 2000).

Aynı yılda Pauling ve Corey, proteinlerde ikinci bir yapısal periyodik motif keşfettiler ve ona da β tabakalı yapı adı verdiler (β harfi α -heliksten sonra ikinci yapı olarak bulunduğu için kullanılmıştır). β tabakalı yapı, α -sarmalının çubuk yapısının aksine tabaka halindedir. β tabakalı yapıda polipeptid zinciri α -sarmalda olduğu gibi sıkı sarılmış halde değil, tamamen uzamış yapıdadır. Birbirine komşu amino asitler arasındaki eksenel mesafe $3,5 \text{ \AA}$ 'dur. (α -sarmalda $1,5 \text{ \AA}$ idi). Bir diğer fark da β tabakalı yapının farklı poli peptid zincirlerindeki NH ve CO grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla stabilize edilmesidir. α -

sarmalda ise hidrojen bağları aynı zincir üzerindeki peptid grupları arasındadır (Keha 2000).



Şekil 1.6. Beta tabakalı yapı

Üçüncü tip periyodik motif de kollagen sarmalıdır. Bu yapı deri, kemik ve eklemlerin başlıca proteini olan kollagen'in yüksek gerilme gücünü sağlayan özelliğini verir. Bu yapıda üç polipeptid zinciri birbiri üzerine sarılmıştır. Her bir zincirin sarmal motifi α -sarmalden tamamen farklıdır. Bu yapıyı stabilize eden hidrojen bağları, zincirlerin birisinin üzerindeki glisin NH gruplarıyla bir diğer zincir üzerindeki amino asitlerin CO grupları arasında teşekkül eder.

Proteinler, biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli olan üç boyutlu şekillerini dört basamakta kazanırlar. Bu dört basamak primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılar olarak isimlendirilirler. Bunlar belirli bir yapıdan daha çok yapılanma çeşidini ve safhasını ifade eder.

Primer yapı, basitçe bir proteindeki amino asitlerin sıralanışıdır ve proteinin omurgasını oluşturur. Bu yapı DNA'daki baz dizilişini tarafından

şifrelenir ve proteinin üç boyutlu aktif konformasyonunu belirleyen en önemli husustur.

Sekonder yapı lineer dizilişte birbirine yakın amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşimler sonucu meydana gelir. Bu etkileşimlerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliكتedir. Mesela α -heliks, β -tabakalı yapı ve kollagen sarmalı bu yapıya dahildir. Bir protein zincirinin bazı bölgelerinin maruz kaldığı bu yapılanmayı hidrojen bağları oluştururken, amino asitlerinin R gruplarından kaynaklanan etkileşimler de bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağını belirler.

Tersiyer yapı, lineer dizilişte birbirinden uzak noktadaki amino asitler arasındaki sterik etkileşimlerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar sonucu, lineer dizilişte birbirlerinden uzakta olan amino asit yan zincirleri bir araya gelir ve proteinin aktif bölgesini de oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz. Disülfid bağı bu yapıyı daha kararlı hale getirir.

Kuaterner yapıya ise, birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşimlerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur.

1.2.1. Proteinlerin Denatürasyonu ve Renatürasyonu

Proteinin üçüncül yapısı, çevrenin etkisi (sıcaklık, çeşitli ajanlar, yabancı yüzeyle temas vb.) ile tersinir veya tersinmez olarak değişebilir. Bu değişiklik "denatürasyon" olarak adlandırılır. Üçüncül yapıyı oluşturan bazı ikincil bağların kırılması sonucu tersinir değişimler gözlenir. Bu tür değişimde protein fonksiyonunu kaybeder fakat çevrenin etkisi ortadan kalkınca yeniden orijinal üç boyutlu yapıya döner (renatürasyon) ve fonksiyon göstermeye başlar. Çevrenin etkisi şiddetli ise polipeptid zinciri ikincil düzenini kaybederek katlanmamış duruma ulaşır. Örneğin yumurtanın pişirilmesinde albüminin denatürasyon ile katı hale geçmesinde olduğu gibi, bu tür değişim tersinmezdir. Ancak bazı proteinlerin (enzimlerin) bu durumdan renatürasyon ile orijinal hallerine dönebildikleri belirlenmiştir. İki veya daha fazla polipeptid zincirinin yine çok spesifik bir düzen içinde bir araya geldikleri durumlarda söz konusudur. Eğer protein dördüncül

yapıya sahipse, denatürasyon sonucu protein alt birimleri birbirlerinden ayrılır ve kватerner yapı bozulur. Denatürasyon eğer ılımlı koşullarda gerçekleşmiş ise renatürasyon ile fonksiyonlarını geri kazanabilir. Örneğin, hemoglobin tuz çözeltisi ile etkileştirilirse molekül iki ayrı alt birime ayrılır (denatürasyon). Diyaliz ile tuz ortamdan çekildiğinde ise iki alt birim bir araya gelir ve protein tekrar fonksiyonel hale gelir (renatürasyon) (Gözükara 1990).

1.2.2. Proteinlerin Sınıflandırılması

Proteinler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalardan biri yapılarına göre sınıflandırmadır (Çizelge 1.2.). Yapılarına göre proteinler iki grup altında incelenir:

1. Basit Proteinler: Yapıları yalnızca proteinlerden oluşmuştur.
2. Konjuge Proteinler: Başka moleküllerle kompleks yapmış proteinlerdir.

Çizelge 1.2. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması.

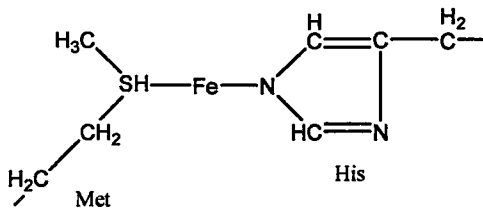
Protein	Yapısal Bileşenleri ve Özellikleri	Örnek
Basit Proteinler		
Albuminler	Suda çözünür	Serum albumin
Globulinler	Suda çözünmez, HCl'de çözünür	Serum globulini
Konjuge Proteinler		
Nükleoproteinler	Nükleik asitlerle kompleks yapmış proteinler	kromozomlar
Glikoproteinler	Karbohidratlarla kompleks yapmış proteinler	Mukopolisakaritler
Lipoproteinler	Lipidlerle ester yapmış proteinler	Serum Lipoprotein
Fosfoproteinler	Fosfatlarla ester yapmış proteinler	Kazein
Kromoproteinler	Fe-porfirin ile kompleks yapmış proteinler	Sitokrom-c
Metalloproteinler	Fe, Cu ve Zn ile kompleks yapmış proteinler	Transferin Seruloplazmin

1.2.2.1. Sitokrom-c

Mitokondri solunum zinciri bir çok değişik tip sitokrom içerir. Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup, hemoglobinin heme halkasına benzer şekilde porfirin halkasına bağlı demir atomu içerir. Sitokromlardaki demir atomları Fe^{+3} ,yı Fe^{+2} ,ye geri dönüşümlü olarak değiştirebilen tek elektron taşıyıcılarıdır. Sitokrom-c, mitokondriden kolayca ayrılabilen küçük bir proteindir. Diğer sitokromlar a, a₃, c₁ ve b ise mitokondrinin iç zarına yerleşmiştir.

Sitokrom-c mitokondri iç zarından kolaylıkla izole edilebilen tek elektron taşıyıcı proteindir ve suda çözünebilmesi saflaştırılması ile kristalizasyonunu kolaylaştırır. Bu sebeple sitokrom-c yapısı diğer elektron taşıyıcı proteinlerden çok daha iyi bilinmektedir.

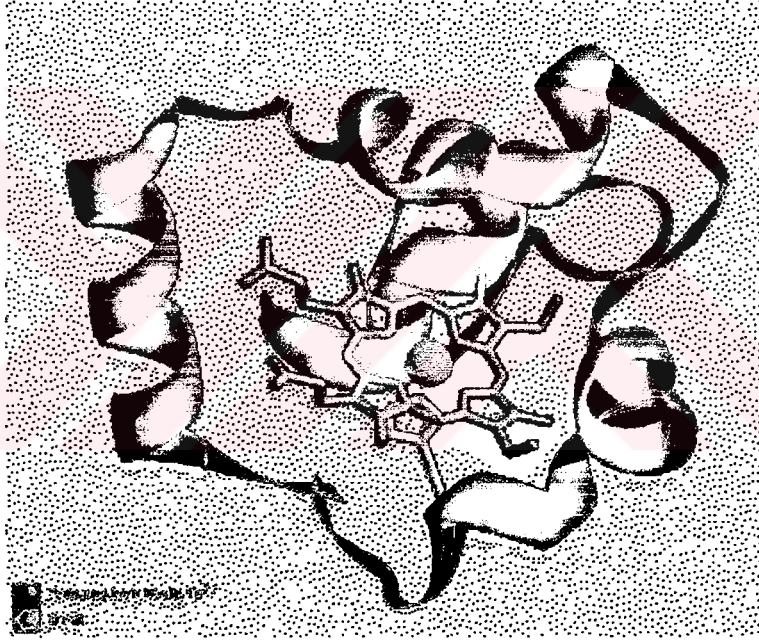
Sitokrom-c yarıçapı yaklaşık olarak 34 Å olan kabaca küresel bir proteindir. Sitokrom-c yapısı içindeki heme grubu hidrofobik yan zincirler tarafından sıkıca sarılmıştır. Heme grubu içindeki demir atomu methionin amino asidindeki sülfür atomuna ve histidin amino asidindeki azot atomuna bağlıdır.



Şekil 1.7. Sitokrom-c'de heme grubu demir atomunun methionin sülfür ve histidin azot atomuna bağlanması

Heme grubunun çevresindeki bu hidrofobik karakter sitokrom-c'nin indirgenme potansiyelini aynı heme grubunun sulu çözelti içindeki indirgenme potansiyelinden daha pozitif yapar. Yani sitokrom-c molekülündeki demir atomunun dielektrik sabiti daha düşüktür ve enerji açısından sitokrom-c molekülünden elektron uzaklaştırmak sulu ortamdaki heme grubundan elektron uzaklaştırmaktan daha zordur.

Sitokrom-c molekülü çok az α -sarmal yapıya sahiptir ve β -tabakalı yapı içermez. Esas olarak polipeptit zincir heme grubu etrafında katlanmıştır. Sitokrom-c molekülünün 1 ve 47'ci konumları arasındaki kalıntılar heme grubunun histidin ile bağ yaptığı kısımda iken 48 ve 91'ci konumları arasındaki kalıntılar methionin ile bağ yaptığı kısımda yer alır. 92 ile 104'üncü konumlar arasındaki kalıntılar ise heme grubunun arkasında histidin ile bağ yaptığı kısımda bulunur.



Şekil 1.8. Sitokrom-c yapısı

Sitokrom-c daha öncede değinildiği gibi elektron transferinde rol alan bir proteindir ve sitokrom redüktaz kompleksinden sitokrom oksidaz'a elektron taşır. Sitokrom-c bu elektron transferini üzerindeki yüklü kalıntılar sayesinde gerçekleştirir. Sitokrom-c yüzeyi pozitif yüklü gruplara sahiptir ve sitokrom redüktaz ve oksidazın ise negatif yüklü gruplara sahiptir. Böylece elektrostatik etkileşimler sayesinde sitokrom-c elektron transferini gerçekleştirir.

IMAK ile protein saflaştırılmasında ana nokta, metal-protein bağlarının değişik proteinlerle farklılık göstermesidir. Bu sebeple bir protein karışımından belirli bir proteinin saflaştırılabilmesi için proteinin enaz bir tane farklı gruba sahip olması gerekir. Çizelge 1.3.'de farklı sayıda histidin artığına sahip proteinlerin farklı metallere etkileşimleri verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi yapısında tek histidin içeren bir protein sadece Cu(II) metaline afinite gösterirken, histidin sayısı arttığında Ni(II), Zn(II) ve Co(II) metallere de afinite göstermektedir. Çizelgede (+) bağ yapabilme özelliğini (-) ise bağ yapamama özelliğini göstermektedir.

Çizelge 1.3. Histidin-Metal Etkileşim Özellikleri

HİSTİDİN	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)	Co(II)
-	-	-	-	-
-His-	+	-	-	-
-His-X _n -His- n>3	+	+	-	-
-His-X _n -His- n=2,3	+	+	+	+
-His-His-	+	+	+	+

Bir diğer önemli nokta ise şelatlayıcı grup ile bağ yapacak amino asidin, protein yüzeyinde yer almasıdır. Çizelge 1.4.'de tuna balığı, at ve maya'ya ait sitokrom-c proteinlerinin aminoasit dizilimleri verilmiştir. Tuna balığı, at ve maya sitokrom-c'leri farklı konumlarda ve farklı sayıda histidin içermektedir. Fakat görüldüğü gibi tuna balığında koordinasyona katılabilecek yüzey histidini bulunmazken, at'a ait sitokrom-c'de 33 numaralı konumda bir adet, maya'da ise 33 ve 39 numaralı konumda iki adet yüzey histidini bulunmaktadır. Diğer histidinler protein yüzeyinde yer almadığı için koordinasyon yapamaz .

Çizelge 1.4. Tuna balığı, at ve maya sitokrom-c'lerinin amino asit dizilimleri

	10	20	30	40
Tuna balığı	GDVAKGKKT GQAEQSYTD IFAGI KKKGE	VQKCAQCHTV ANKSKGIVWN RQDLVAYLKS	ENGGKHKVGP ENTLMEYLEN ATS	NLWGLFGRKT PKKYIPGKTM
At	GDVEKGGKIF GQAPGFTYTD IFAGIKKKTE	VQKCAQCHTV ANKNKGITWK REDLIAYLKK	EKGGKHKVGP EETLMEYLEN ATNE	NLHGLFGRKT PKKYIPGKTM
Maya	GSAKKGATLF GQAEQSYTD AFGGLKKEKD	KTRCLQCHTV ANIKKNVLWD RNDLITYLLKK	EKGGPHKVP ENNMSEYLTN ACE	NLHGIFGRHS PKKYIPGKTM

1.3. POLİMERLER

1.3.1. Polimer Tanımı

Polimerler en basit tanımıyla, çok sayıda aynı ve farklı atomların kimyasal bağları, az veya çok düzenli bir biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli, başka bir deyişle yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Polimerler doğal veya sentetik olabilir. Sentetik polimerler genellikle, çok sayıda tekrarlanan 'mer' ya da 'monomer' denilen basit birimlerden oluşur. Polimer zinciri üzerinde dizili atomların hepsi aynı türden ise bu polimer 'homozincir', farklı atomlar ise 'heterozincir' polimerler olarak adlandırılırlar.

1.3.2. Polimer Sentezi

Polimerlerin sentezi; zincir ve kondenzasyon polimerizasyonu olmak üzere başlıca iki grupta incelenebilir. Bu iki yöntem aşağıda önemli özellikleri ile kısaca verilmiştir.

1.3.2.1. Zincir Polimerizasyonu

Bu yöntemde monomerler doğrudan birbirlerine katılarak makromolekül zinciri oluşturur. Bu türde, genellikle doymamış bağlar içeren etilen, stiren, vinil

klorür vb. dien veya vinil monomerlerinin polimerizasyonu söz konusudur. Zincir polimerizasyonu serbest radikaller, iyonlar (katyon veya anyon) veya koordinasyon kompleks sistemler üzerinden yürüyebilir. Zincir polimerizasyon yönteminin en önemli özelliği, polimer zincirinin çok kısa sürede (0.1 saniye gibi) yüksek molekül ağırlığına (10^5 - 10^7 gibi) ulaşmasıdır. Reaksiyonun başlamasından çok kısa bir süre sonra dahi, ortamda çok az fakat çok yüksek molekül ağırlıklı polimer ve çok sayıda monomer vardır. Zamanın ilerlemesiyle monomer polimer dönüşümü artar, ancak oluşan polimer zincirlerinin boyu değişmez.

1.3.2.2. Kondenzasyon Polimerizasyonu

Benzer veya farklı yapıdaki fonksiyonel monomerlerden küçük bir molekül çıkışı ile elde edilirler. "OH", "COOH", "NH₂" vb. gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tane taşıyan monomerler esterleşme, amitleşme vb. reaksiyonlarla genellikle H₂O, NH₃, CO₂, N₂ vb. küçük moleküller çıkararak kondenzasyon polimerlerini oluştururlar.

Kondenzasyon polimerizasyonu basamaklı polimerizasyon olarak da adlandırılır. Çünkü bu tür polimerizasyonda, önce monomerler birleşir ve dimerler oluşur, monomerler dimerle birleşir trimerler oluşur ve böylece adım adım oluşan zincirin boyu uzar. Bu özellik kondenzasyon ve zincir polimerizasyonları arasındaki en önemli farktır. Bu türde, her uzunluktaki polimer zinciri, reaksiyon süresince, aynı olasılıkta boyunu uzatarak büyür. Polimerizasyonun başlatılmasından bir süre sonra örneğin; ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 10.000'e ulaşınca, ortamdaki monomerlerin tamamına yakın bir bölümü reaksiyona girmiştir. Ancak polimerizasyonun sonuna doğru polimer zinciri son boylarına ulaşılabilir.

1.3.3. Polimerizasyon İşlemleri

Polimerizasyon işlemleri 4 ana grup altında incelenebilir.

- Yığın Polimerizasyonu
- Çözelti Polimerizasyonu

- Süspansiyon Polimerizasyonu
- Emülsiyon Polimerizasyonu

Bu dört yöntem ticari polimerlerin üretiminde kullanılmaktadır. Kondenzasyon polimerizasyonları genellikle yığın ve çözelti işlemleri ile gerçekleştirilir. İyonik ve koordinasyon kompleks polimerizasyonlar ise, başlatıcılar sulu ortamda etkilerini kaybettikleri için sadece yığın ve çözelti prosesleri ile üretilirler.

1.3.3.1. Yığın Polimerizasyonu

Monomerlerin doğrudan doğruya veya pek az katkı maddesi ile polimerizasyonuna dayanır. Kondenzasyon polimerizasyonuna uğratılan monomerler genellikle bu yöntemle polimerleştirilir. Yabancı maddelerin polimerizasyon ortamına girme olasılığı düşük olduğundan polimerik ürünün ayrılması kolaydır.

1.3.3.2. Çözelti Polimerizasyonu

Polimerizasyona uğrayan monomer, reaksiyonlara katılmayan bir çözücü içinde polimerleştirilirse yığın polimerizasyonunun bir çok sakıncası önlenmiş olur. Çözücü, polimerizasyon ortamını seyrelttiği için viskozite düşer, karıştırma kolaylaşır ve daha etkin bir ısı transferi sağlanmış olur.

1.3.3.3. Süspansiyon Polimerizasyonu

Bu işlemde monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı genellikle sudur. Başlatıcı monomer damlacıkları içinde çözülür. Ortam sürekli olarak karıştırılarak süspansiyonun devamlılığı sağlanır. Uygun bir sıcaklık programı ile monomer damlacıklarının küresel polimer partikülleri haline dönüşmesi sağlanır. Süspansiyon polimerizasyonu ile 10 µm'den 10 mm'ye kadar çok değişik boy aralığı ve dağılımında polimer

üretilebilmektedir. Her monomer damlacığı başlatıcı içerir ve ısıtılınca diğerlerinden bağımsız olarak polimerleşir. Reaksiyon hızı yığın polimerizasyonuna göre daha hızlıdır. Sonlanma ve zincir transferi yavaş olduğundan, daha büyük molekül ağırlıklarına ulaşılır. Yığın prosese göre en önemli avantajı, düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolünün mükemmel olmasıdır. Dahası dağıtma ortamı olarak kullanılan su ucuzdur ve yanma, patlama ve toksiklik gibi yan etkileri yoktur.

1.3.3.4. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu radikal zincir polimerizasyonları için önemli bir yöntem sağlar. Bunun için suda çözünmeyen bir monomerin önce emülsiyon halinde dağılması gerekir. Bu tür polimerizasyon süspansiyon polimerizasyonundan farklıdır, polimerizasyon mekanizması bütünüyle değişiktir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan histidin ve metakroilklorür Sigma (St. Louis, ABD) firmasından, sitokrom-c, 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve etilenglikolmetakrilat (EGDMA) Fluka A.G.(Buchs, İsviçre) firmasından sağlanarak kullanılmadan önce düşük basınç altında damıtıldı ve kullanılıncaya kadar 4°C'da muhafaza edildi. Benzoilperoksit (BPO) Fluka AG (İsviçre), poli (vinilalkol) Aldrich Chem. Co. (ABD) firmasından temin edildi. Kullanılan tamponlar; sodyum-fosfat tamponu Riedel-de Haen (Almanya), Hidroksimetil aminometan hidroklorid (Tris-HCl) tamponu Merck AG (Darmstadt, Almanya), morfolinoetan sülfonik asit (MES), morfolinopropan sülfonik asit (MOPS) ve hidroksietilpiperazinetan sülfonik asit (HEPES) Sigma (St. Louis, ABD) firmasından temin edildi. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan su; GLF, 2001-4 ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Lablonco 90005-02 C sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Taramalı Elektron Mikroskobu: Raster Electron Microscopy, Leitz-AMR-1000

Elementel Analiz: Leco, CHNS-932

FTIR Spektrometresi: FTIR 8000 Series

¹H-NMR Spektroskopisi: JEOL GX-400, 300 MHz

UV-Vis Spektrometresi: UV-2101 PC, UV-Vis Scanning

Atamik Absorpsiyon Spektroskopisi: AAS-5AE, Carl Zeiss Technology

2.2. Yöntem

2.2.1. Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması

2.2.1.1. pHEMA Mikrokürelerin Sentezi

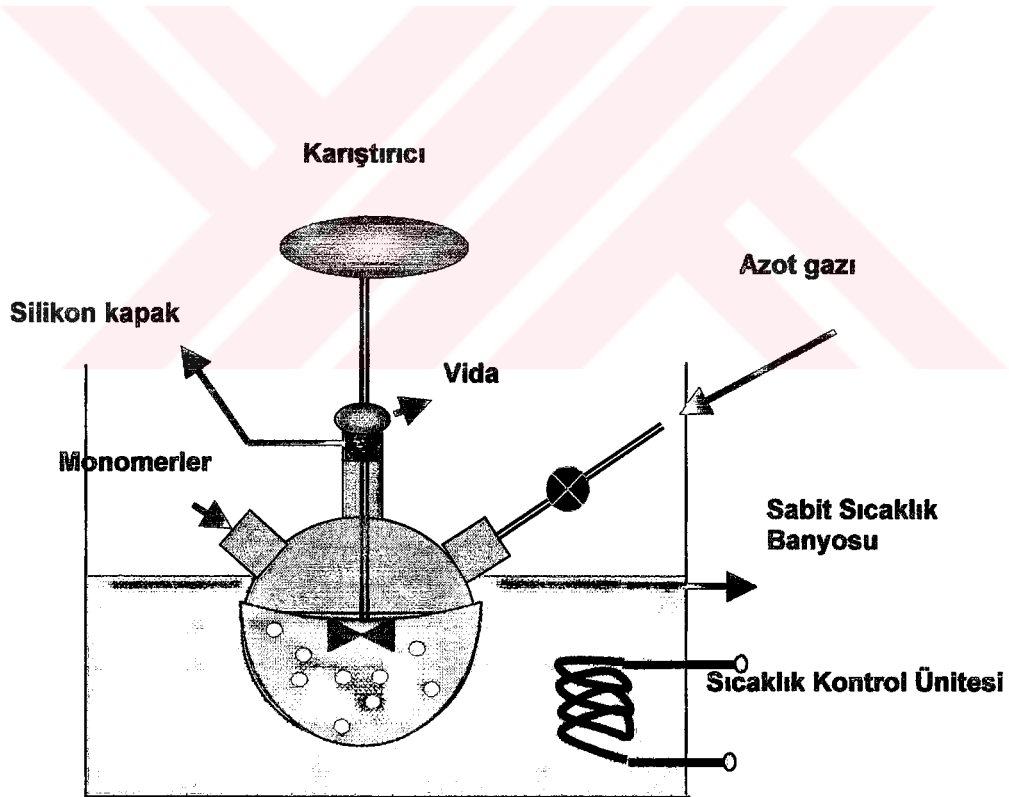
pHEMA adsorbanlar radikal süspansiyon tekniği (Denizli ve ark. 1995) ile üretilmiştir. Polimerizasyon, HEMA monomerin çözünürlüğünü azaltan magnezyum oksit içeren sulu dispersiyon ortamında gerçekleştirilmiştir. HEMA monomer fazı, EGDMA ve α - α azobisisobütironitril (AIBN) içeren dispersiyon ortamına (500 mL hacimli çift boyunlu balon içerisine) ilave edilmiştir. 100-150 μ m çap aralığındaki küresel adsorbanları üretmek için HEMA-EDGMA oranı, monomer faz/dispersiyon faz oranı, EGDMA ve AIBN miktarları ve karıştırma hızı, sırasıyla, 1:3 (v:v), 1:10 (v:v), 0.33 (mol EGDMA/mol HEMA), 0.0015 (mol AIBN/mol HEMA) ve 600 rpm değerinde tutulmuştur. Polimerizasyon 3 saat 70⁰C'da ve 1 saat 90⁰C'da sürdürülmüştür. Daha sonra adsorbanlar süzülerek polimerizasyon ortamından ayrılmıştır.

2.2.1.2. 2-Metakriloamidohistidin Monomerinin Sentezi

2-Metakriloamidohistidin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g histidin metilester ve 0.2 g hidrokinon 100 mL diklorometan içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0⁰C'a soğutulmuştur. Çözeltiye 12.74 g trietilamin ilave edilmiştir. 5.0 mL metakroilklorür yavaşça bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Bu çözelti azot atmosferi altında, magnetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, metakroilklorürün fazlası %10'luk NaOH ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım etanolde çözülmüştür.

2.2.1.3. p(HEMA-co-MAH) Mikrokürelerin Hazırlanması

Komonomerler; 2-hidroksimetakrilat (HEMA) ve metakriiloamidohistidin (MAH), başlatıcı benzoilperoksit (BPO) ve stabilizör poli(vinilalkol) kullanılarak, süspansiyon polimerizasyon tekniği ile polimerleştirilmiştir. Toluen, gözenek yapıcı EGDMA ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Çizelge 2.1'de 50-63 μm boy dağılımına sahip kopolimer mikrokürelerin polimerizasyon ortamını vermektedir. Polimerizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra, çözüntür bileşenler; polimerin su ve etanol ile yıkanmasıyla, polimerden uzaklaştırılmıştır. Şekil 2.1 polimerik mikrokürelerin hazırlanması sırasında kullanılan düzeneğin şematik gösterimidir.



Şekil 2.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi.

Çizelge 2.1. 50-63 µm. boyutunda ve %65 şişme oranına sahip p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerinin hazırlanması için polimerizasyon şartları.

Sulu Dispersiyon Fazı

- 50 ml. damıtık su
- 0.2 g PVAL

Organik Faz

- 5-75 mg MAH
- 4.0 mL HEMA
- 8.0 mL EGDMA
- 12 mL toluene
- 0.1g BPO

Polimerizasyon Şartları

- Reaktör hacmi: 100 mL
 - Karıştırma hızı: 600 rpm
 - Sıcaklık ve süre: İlk 4 saat için 65°C ve sonra 2 saat için 90°C
-

2.2.2. p(HEMA-co-MAH) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

2.2.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü

p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerinin spesifik yüzey alanı BET cihazı kullanılarak belirlenmiştir. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerinin ortalama boy ve boy dağılımı Tyler Standart elekleri kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.2.2. Şişme Testi

p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerinin su tutma oranı, deiyonize su kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için, başlangıçta kuru olan mikroküreler, tartıldıktan sonra, 50 ml damıtık su içeren izotermal su banyosuna aktarılmıştır. 25°C sıcaklıktaki su banyosunda 2 saat bekletildikten sonra, mikroküreler sudan alınmış ve süzgeç kağıdı kullanılarak kurulmuş ve tartılmıştır. Kuru ve ıslak mikrokürelerin ağırlık oranları kaydedilmiştir. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin su tutma oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. W_s ve W_o mikrokürelerin su tutmadan önceki ve sonraki ağırlıklarıdır

$$\text{Şişme oranı \%} = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100 \quad (2.1)$$

2.2.2.3. Yüzey Morfolojisi

Polimerik mikrokürelerin kesit yapısı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler analiz edilmeden önce 25°C'da havada kurutulmuştur. Kuru mikroküreler örnek haznesine yerleştirilmiş ve altın ile kaplandıktan sonra taramalı mikroskop ile (Raster Electron Mikroskopy, Leitz-AMR-1000, Germany) görüntüleri alınmıştır.

2.2.2.4. Elementel Analiz

Sentezlenen p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin, MAH içeriğinin belirlenmesi için, elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Elementel analiz verilerinin belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Polimerik mikroküreler (1mg) elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum hücrelerine yerleştirilerek $\pm 0,0001$ g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik örnek cihaza koyularak yakma işlemi sonucunda örneğin karbon, hidrojen, oksijen ve azot analizi yapılmıştır.

2.2.2.5. FTIR Analizi

MAH monomerinin ve p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) kullanılarak elde edilmiştir. Yaklaşık 0.1 g kuru mikroküreler 0.1 g KBr ile karıştırılmış, tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

2.2.2.6. NMR Analizi

MAH monomerinin NMR spektrumu, CDCl_3 içerisinde, JEOL GX-400 300 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden CDCl_3 referans alınarak rapor edilmiştir.

2.2.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

2.2.3.1. Polimerik Mikrokürelere Cu(II) Adsorpsiyonu

Sulu çözeltilerden, ağır metal adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon hızına ve kapasitesine; başlangıç ağır metal iyon derişiminin ve pH'ın etkisi incelenmiştir. 25 mL değişik miktarlarda (5-750 mg/L) Cu(II) içeren sulu çözeltiler polimerik mikrokürelere ile karıştırılarak adsorpsiyon ortamı olan 50 mL'lik cam beherlere aktarılmıştır. Süspansiyonlar istenen pH aralığına 0.1 M NaOH ve 0.1 M HNO₃ çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Metal iyonunun takılmasının tamamlanması için denge adsorpsiyon süresi boyunca adsorpsiyon ortamı bir manyetik karıştırıcı aracılığıyla 600 devir/dakika hızda karıştırılmıştır. Denge adsorpsiyon süresi yapılan ön çalışmalar sonucunda 2 saat olarak belirlenmiştir. Bu süre sonunda çözeltiden alınan örneklerden polimerik mikrokürelere santrifüjlenerek ayrılmış ve kalan çözeltideki Cu(II) iyonu grafit fırınlı atomik adsorpsiyon spektrometresi ile tayin edilmiştir. (AAS 5EA, Carl Zeiss Technology, Zeiss Analytical Systems, Almanya). Birim kütle başına, mikrokürelere adsorplanan metal iyonunun miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$Q = [(C_0 - C) \times V] / m \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer mikroküre başına adsorplanan metal iyon miktarını (mg/g), C₀ ve C sulu çözeltideki metal iyonunun başlangıç ve son derişim değerlerini (mg/L), V sulu çözeltinin hacmi (mL) ve m ise kullanılan mikrokürelere kütlesini (g) vermektedir. Sonuçlar üç kez tekrarlanan adsorpsiyon işlemlerinin ortalaması şeklinde verilmiştir.

2.2.3.2. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom-c Adsorpsiyonu

p(HEMA-co-MAH)/Cu(II) mikrokürelere 10 mL'lik sitokrom-c çözeltisi ile 3 saat 150 rpm'de karıştırılarak etkileştirilmiştir. Sitokrom-c adsorpsiyon

deneylerinde Cu(II) takılmasının ve miktarının, başlangıç sitokrom-c derişiminin, ortam pH'ının, tampon türünün ve iyonik şiddetin, sitokrom-c adsorpsiyon hızı ve kapasitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Tamponun adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek için adsorpsiyon çalışmaları MOPS, MES, HEPES, Tris-Cl ve fosfat tamponları kullanılarak yapılmıştır. Başlangıç sitokrom-c derişimi 5 µmol/L'dir. Sitokrom-c derişiminin adsorpsiyon üzerine etkilerini belirlemek için, derişim aralığı 5-50 µmol/L arasında değiştirilmiştir. Sitokrom-c adsorpsiyonu üzerine pH'ın etkisini incelemek için pH aralığı 7.0-12 arasında değiştirilmiştir. Sitokrom-c derişimi 417 nm'de UV spektrofotometresi (UV-2101 PC, UV-VIS Scanning Spektrofotometer, Japonya) kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar üç kez tekrarlanan ölçümlerin ortalaması şeklinde verilmiştir. Adsorplanan sitokrom-c miktarı derişim farkı belirlenerek hesaplanmıştır.

2.2.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Sitokrom-c desorpsiyonu için 0.1 M EDTA, desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Sitokrom-c adsorplamış polimerik mikroküreler desorpsiyon ortamında, oda sıcaklığında 4 saat 600 rpm hızında karıştırılmıştır. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon(\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan sitokrom-c}}{\text{Adsorplanan sitokrom-c}} \times 100 \quad (2.3)$$

p(HEMA-co-MAH)/Cu(II) mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, p(HEMA-co-MAH)/Cu(II) mikroküreleri, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH ile yıkanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.1.1. Yüzey Alanı Ölçümü

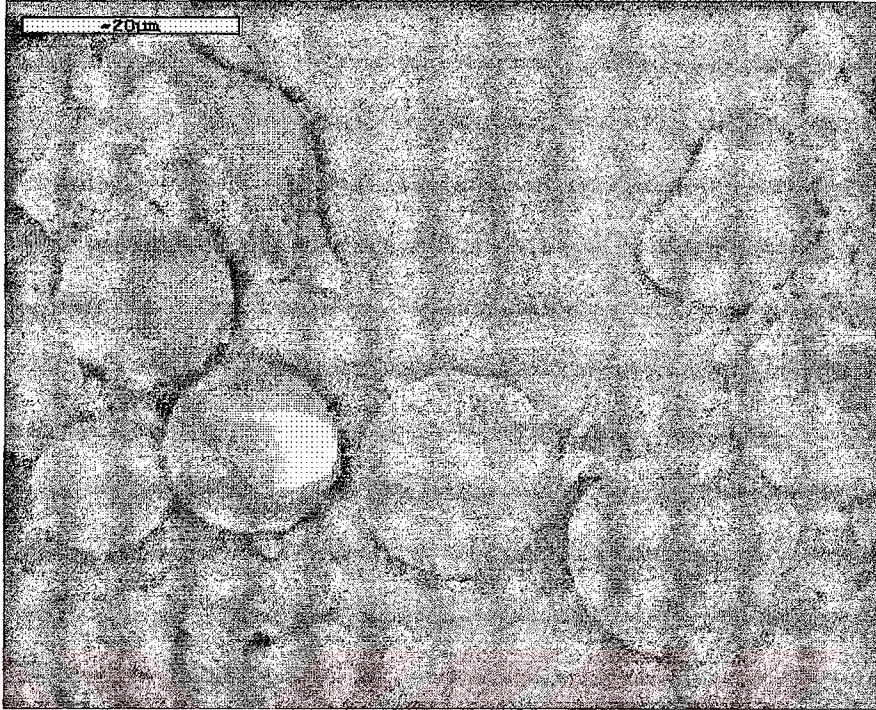
Radikal süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile elde edilen çapraz bağlı 50-63 μm çapında, küresel p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin SEM fotoğrafı Şekil 3.1'de görülmektedir. p(HEMA-co-MAH) partiküllerinin spesifik yüzey alanı $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dir. Polimerik yapıya MAH ilavesi gözenekliliği ve iç yüzey alanını arttırmaktadır. Elde edilen bu bulgular SEM fotoğrafları tarafından da desteklenmektedir.

3.1.2. Şişme Testi

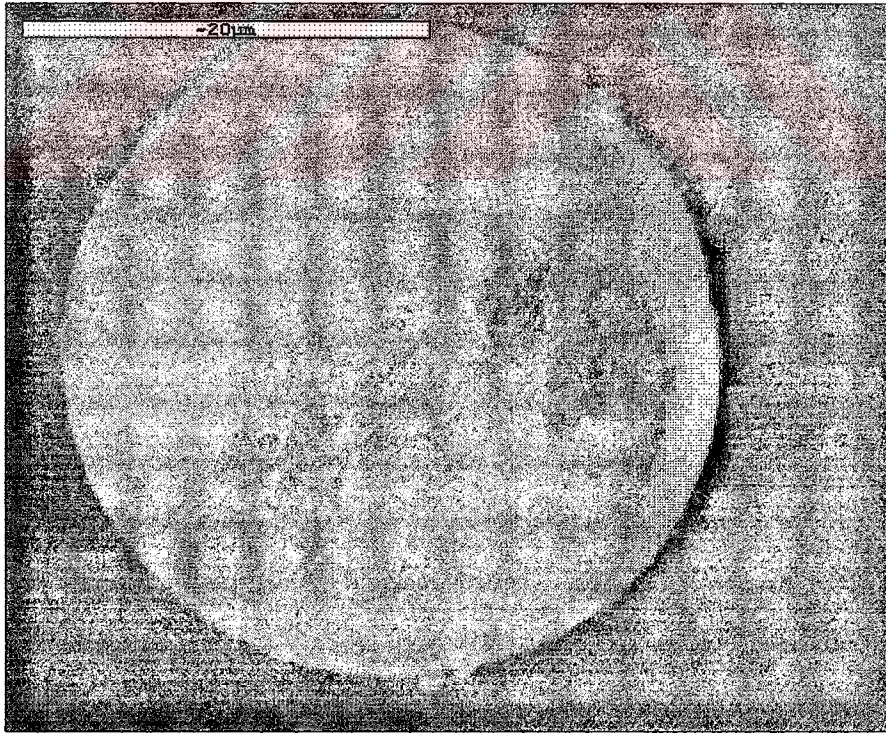
p(HEMA-co-MAH) partikülleri çapraz-bağlı, hidrofilik matrikslerdir. Sulu ortamda çözünmez, fakat çapraz-bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak şişerler. Bu çalışmada, Tablo 2.1'de polimerizasyon şartları verilen partiküllerin denge şişme değerleri % 65'dir. pHEMA (% 55) ile karşılaştırıldığında, p(HEMA-coMAH) partiküllerinin şişme değeri artmıştır. Bu sonucu iki şekilde açıklamak mümkündür. Öncelikle yapıya 2-metakriloamidohistidinin (MAH) ilavesiyle polimer zincirindeki hidrofilik fonksiyonel grup sayısının artması (özellikle imidazol grubu), matriksin daha çok su molekülü ile etkileşmesine neden olur. Bilindiği gibi histidin polar bir aminoasittir (Voet ve ark. 1999). Ayrıca pseudospesifik ve/veya metal kompleksleştirici ligand MAH sonuç polimerin molekül ağırlığını azaltarak su moleküllerinin polimer zinciri içerisine daha kolay girmesini sağlar. Bu mikroküreler çapraz bağlı yapıya sahip olduklarından sert ve dayanıklıdır. Dolayısıyla endüstriyel amaçlı protein saflaştırma proseslerinde dolgulu kolon uygulamaları için uygundur.

3.1.3. Yüzey Morfolojisi

p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.1.A'da görüldüğü gibi radikalik süspansiyon polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar küresel forma ve düzgün bir yüzeye sahiptirler. Şekil 3.1.B'deki fotoğraf polimerik yapının iç kısmının incelenebilmesi için mikroküre kırılarak alınmıştır. Mikrokürenin iç yapısındaki mikrogözeneklerin varlığı açıkça görülmektedir. Mikroküre yüzeyinin düzgün bir yapıya sahip olmaması yüzey alanını artıran bir faktördür. Bu durum polimerik mikrokürelerin pratik uygulamaları için bir avantaj oluşturmaktadır. Yapıdaki mikrogözenekler polimerik yapının yüksek iç yüzey alanına sahip olmasına neden olurlar. Sonuçta kütle aktarımını zorlaştıran yüzey ve difüzyon dirençleri azalmakta ve kütle aktarımı nispeten kolaylaşmaktadır. PHEMA mikrokürelerin yüzey ve yığın yapılarını gösteren SEM fotoğrafları ise Şekil 3.2'de verilmiştir. Görüldüğü gibi mikroküreler küresel ve düzgün yüzey özelliklerine sahiptirler. PHEMA mikrokürelerin daha sıkı bir yapıya sahip olduğu ve gözenek içermediği de not edilmesi gereken bir unsurdur.



(A)

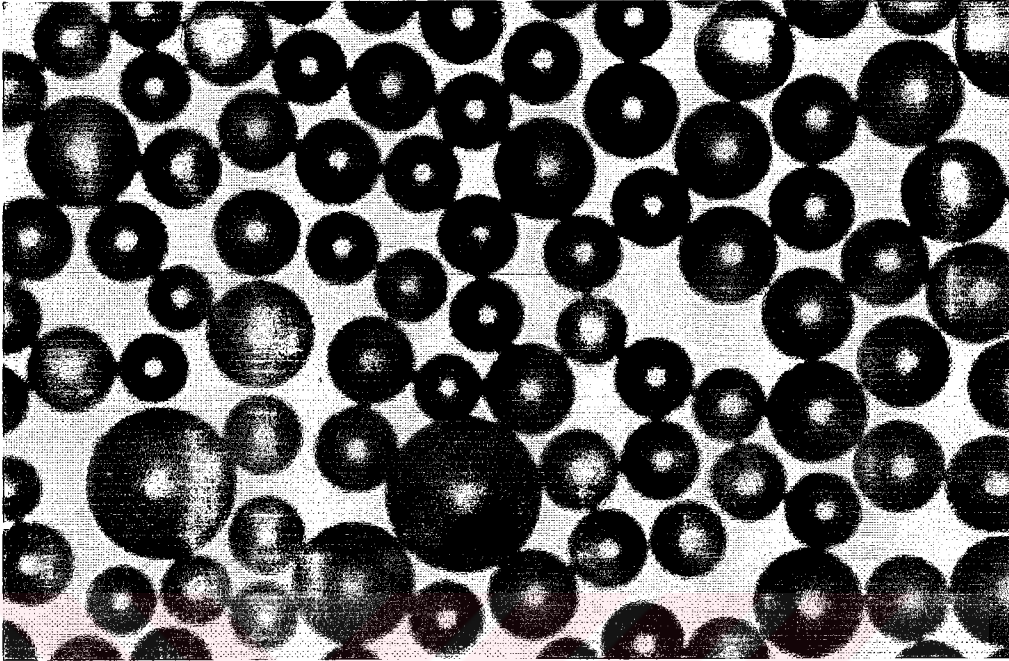


(B)

Şekil 3.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin SEM fotoğrafları

(A) Yüzey

(B) Kesit Alanı



Şekil 3.2. pHEMA mikrokürelerin optik fotoğrafı

3.1.4. Elementel Analiz

Sunulan tez kapsamında beş farklı miktarda MAH içeren p(HEMA-co-MAH) mikroküreler hazırlanmıştır. MAH takılma oranının bulunması için elementel analiz yöntemi kullanılmıştır. Azot sitokiyometrisi kullanılarak MAH takılma oranı 2.36-35.38 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulundu. HEMA grubu azot içermediği için elementel analiz yöntemi ile belirlenen azot miktarı sadece polimer yapısı içindeki MAH grubundan gelmektedir. MAH takılma miktarı yaklaşık %90 oranında bulunmuştur. Analiz sonucunda polimerizasyon ortamına katılan MAH miktarının artmasıyla takılan MAH miktarının da arttığı görülmüştür. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere ait elementel analiz verileri ve yapıya girme oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

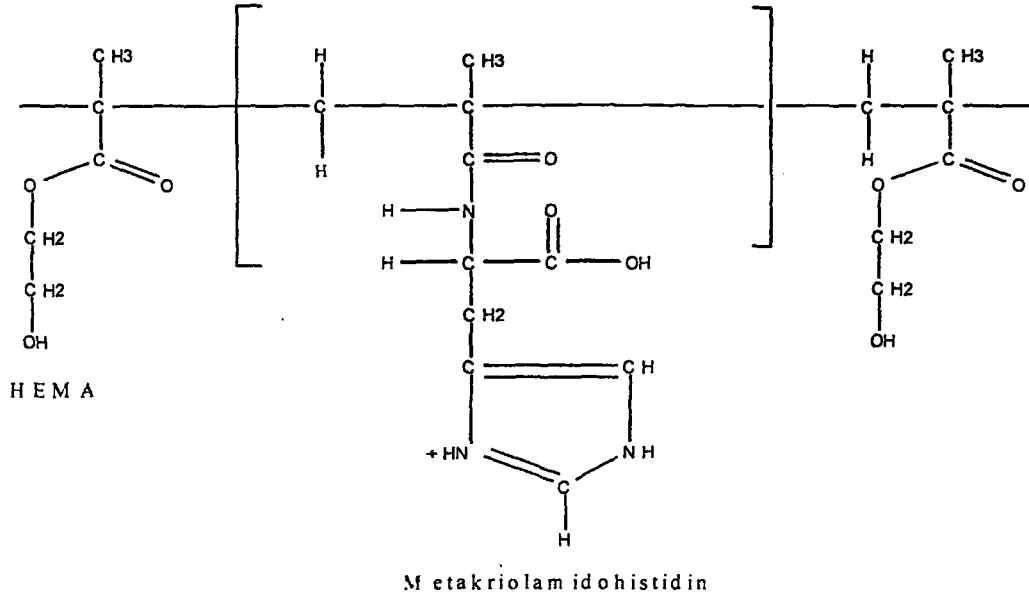
Çizelge 3.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin elemenal analiz verileri

MAH Miktarı (mg)	MAH Oranı ($\mu\text{mol/g}$)	MAH Takılma Oranı (%)
5	2.36	97.5
10	4.72	98.7
25	11.79	99.0
40	18.87	99.2
75	35.38	99.1

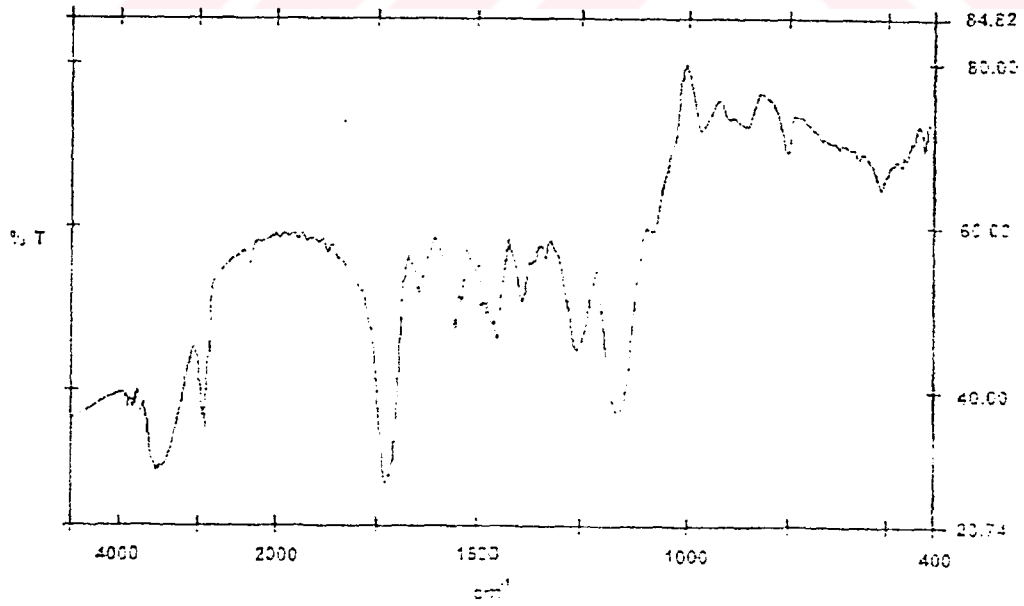
3.1.4. FTIR Analizi

Sitokrom-c adsorpsiyonu için 2-metakrilamidohistidin (MAH) komonomer ve ligand olarak seçilmiştir. İlk olarak histidin ve metakroilklorür kullanılarak MAH komonomeri sentezlenmiştir. Ardından radikalik süspansiyon polimerizasyonu ile MAH ve HEMA polimerleştirilerek p(HEMA-co-MAH) mikroküreler üretilmiştir. Sentezlenen p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerinin kimyasal yapısı Şekil 3.3'de verilmiştir. Şekil 3.4'de MAH monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir. MAH monomerine ait karakteristik karbonil bandı 1724 cm^{-1} 'de, amid I ve amid II gerilme titreşim bantları 1651 cm^{-1} ve 1558 cm^{-1} 'de görülmektedir.

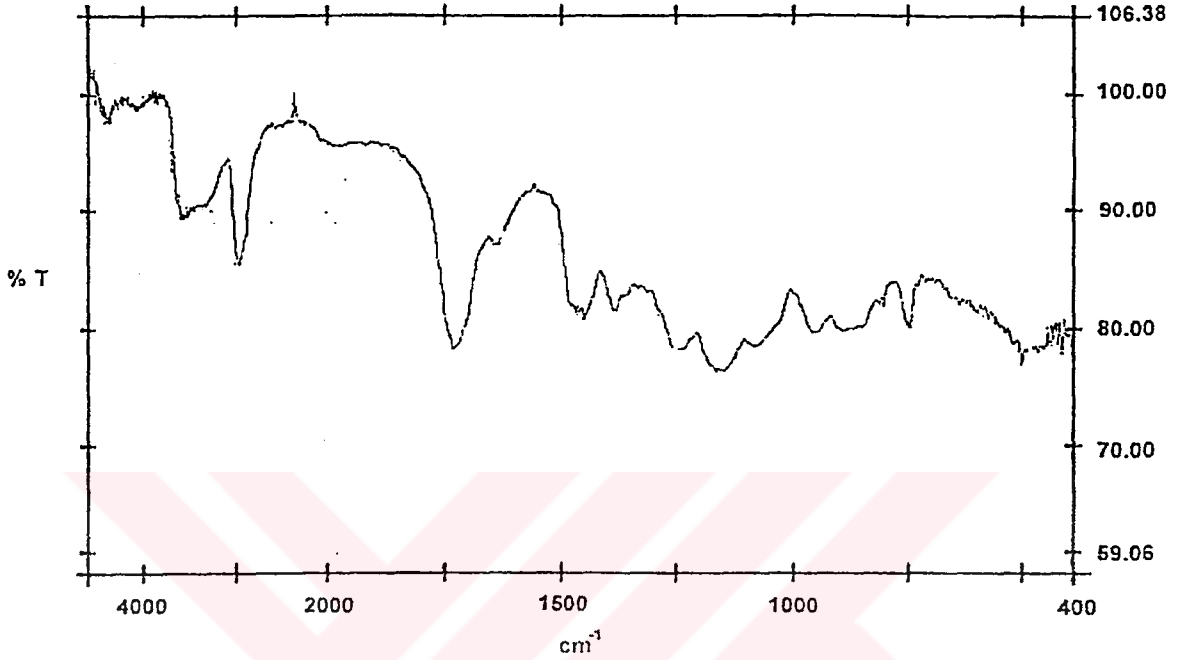
Şekil 3.5'de p(HEMA-co-MAH) partiküllerinin FTIR spektrumlarında 3586 cm^{-1} civarında karakteristik O-H titreşim bandı görülmektedir. p(HEMA-co-MAH) partiküllerinin FTIR spektrumu 1645 cm^{-1} 'de karakteristik karbonil, 1516 cm^{-1} 'de ise amid II titreşim bandlarını içermektedir. Bu spektrumlar hedef monomer-ligand ve polimerik yapının sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 3.3. p(HEMA-co-MAH) mikrotürelerin molekül formülü



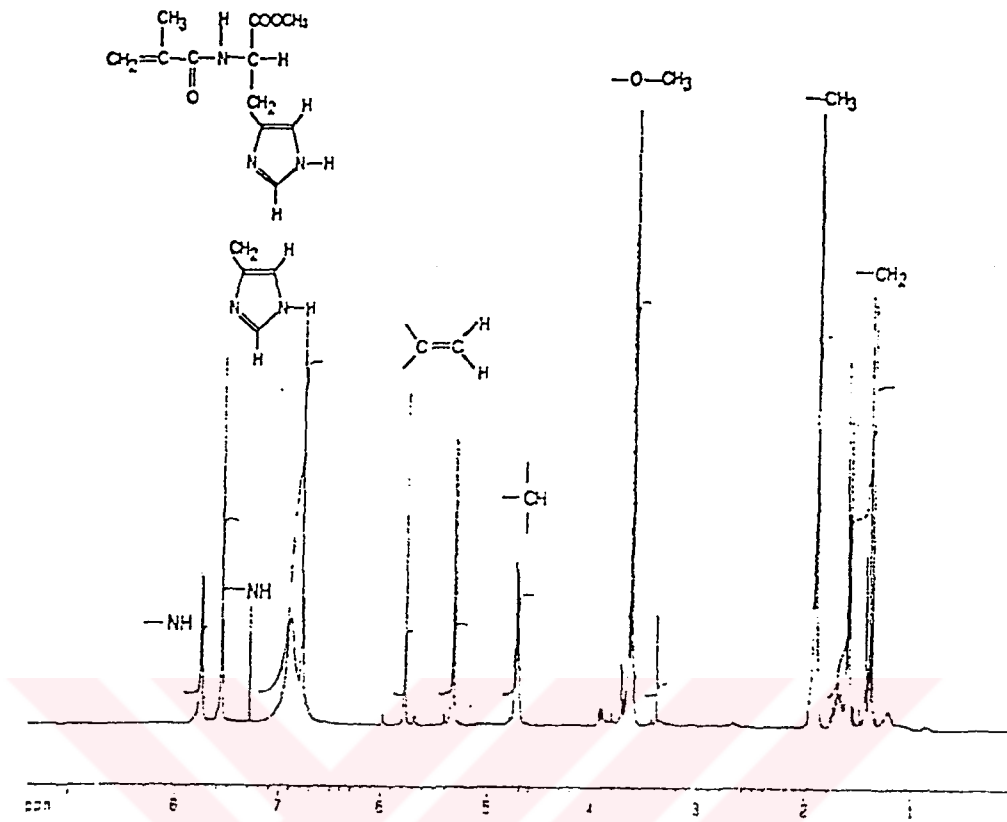
Şekil 3.4. MAH monomerinin FTIR spektrumu



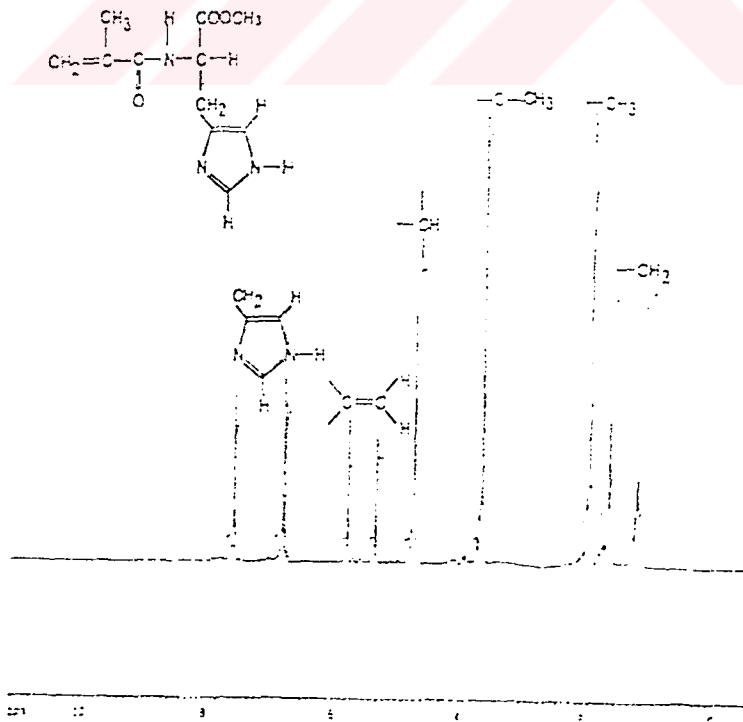
Şekil 3.5. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumu

3.1.6. ¹H-NMR Analizi

MAH monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde ¹H-NMR kullanılmıştır. MAH monomerinin Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'da verilen ¹H-NMR spektrumunda MAH yapısında bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.99 (t: 3H, J=7.08 Hz, CH₃), 1.42 (m: 2H, CH₂), 3.56 (t: 3H, -OCH₃), 4.82-4.87 (m: 1H, metin), 5.26 (s: 1H, vinil H), 5.58 (s: 1H, vinil); 6.86 (d: 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (d: 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m: 5H, aromatik) şeklindedir.



Şekil 3.6. MAH monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

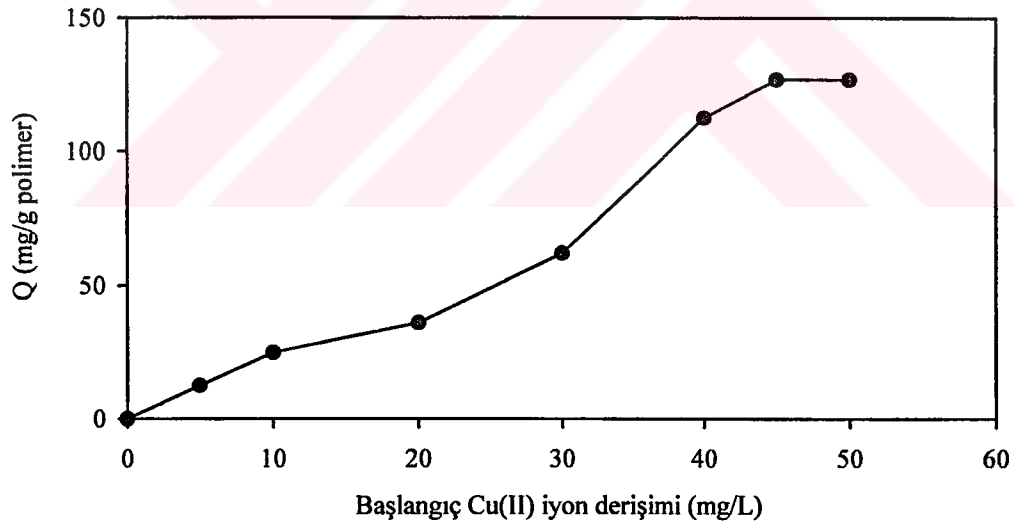


Şekil 3.7. MAH monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (D_2O değişim)

3.2. Polimerik Mikrokürelere Cu(II) Adsorpsiyonu

3.2.1. Cu(II) Başlangıç Derişiminin Etkisi

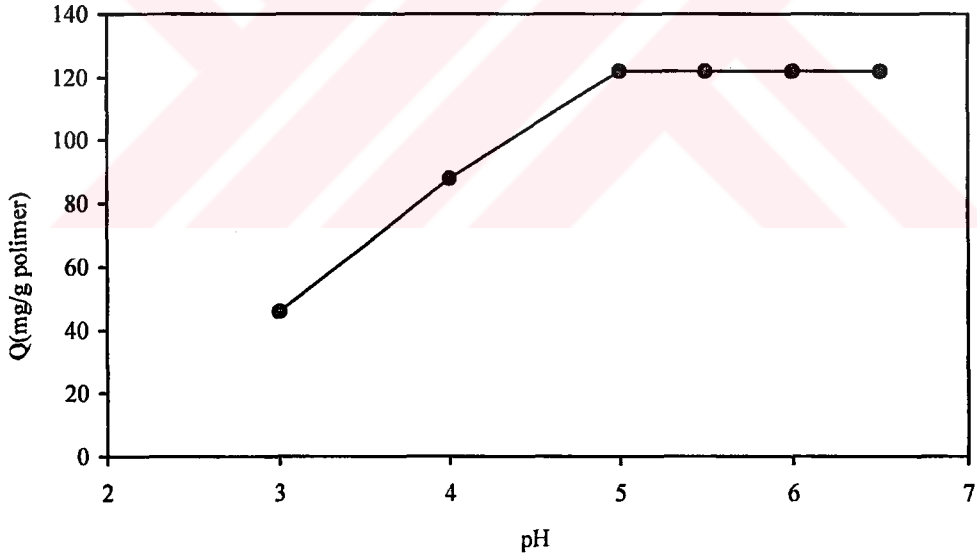
Şekil 3.8'de Cu(II) bağlanmasına Cu(II) başlangıç derişiminin etkisi verilmiştir. Polimerin birim kütlesi başına adsorplanan Cu(II) miktarı, Cu(II) başlangıç derişiminin artması ile artmaktadır. Bu artış 30 ppm değerine kadar devam etmektedir. Daha yüksek Cu(II) derişim değerlerinde (özellikle 50 ppm'in üzerinde) Cu(II) iyonlarının çökme problemi söz konusu olduğundan bu grup deneylerde 50 ppm başlangıç Cu(II) derişim değerinin üzerinde çalışılmamıştır. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere maksimum Cu(II) adsorpsiyonu 122.7 mg/g ve MAH yükleme oranı 11.79 $\mu\text{mol/g}$ 'dır. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere Cu(II) bağlanması MAH yapısındaki imidazol halkasında bulunan azot atomları üzerinden gerçekleşmektedir



Şekil 3.8. Polimerik mikrokürelere adsorplanan Cu(II) miktarının Cu(II) başlangıç derişimi ile değişimi; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; pH : 5; T : 20°C

3.2.2. Cu(II) Adsorpsiyonuna pH Etkisi

Metal iyonlarının çözünürlüğü pH'a kuvvetle bağlıdır. Cu(II) iyonları pH 7.0 civarında derişime de bağı olarak çökmeye başlar. Bu nedenle, Cu(II) adsorpsiyon deneylerinde ortam pH'ı 3.0-6.5 aralığında değiştirilmiştir. Şekil 3.9'da p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere Cu(II) adsorpsiyonuna pH'ın etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi düşük pH değerlerinde polimerik yapıdaki MAH grupları ile Cu(II) iyonları arasındaki etkileşim oldukça zayıftır. pH'ın artması ile bu etkileşim şiddeti artmakta ve pH 5.0-6.5 arasında hemen hemen pek değişmemektedir. Muhtemelen polimerik yapıdaki imidazol halkasındaki fonksiyonel gruplar pH 5.0'un üzerinde iyonize olarak Cu(II) iyonları ile şelat oluşturmaktadırlar. p(HEMA-co-MAH) partiküllerinin Cu(II) iyonlarını bağlama kapasitesi 122.7 mg/g (1,92 mmol/g)'dır.



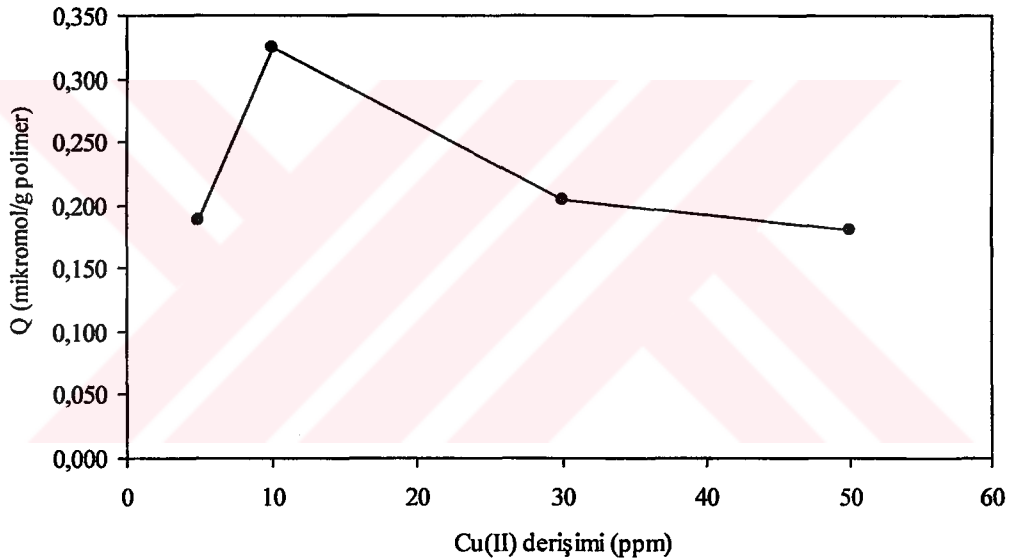
Şekil 3.9. Polimerik mikrokürelere adsorplanan Cu(II) miktarının pH ile değişimi; MAH yükleme

oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Başlangıç derişimi: 30 ppm; T : 20°C

3.3. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom-c Adsorpsiyonu

3.3.1. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna Cu(II) Başlangıç Derişiminin Etkisi

p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere yüklenen Cu(II) başlangıç derişiminin sitokrom-c adsorpsiyonuna etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi 10 ppm Cu(II) yükleme oranında maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu 4.21 mg/g olarak bulunmuştur.

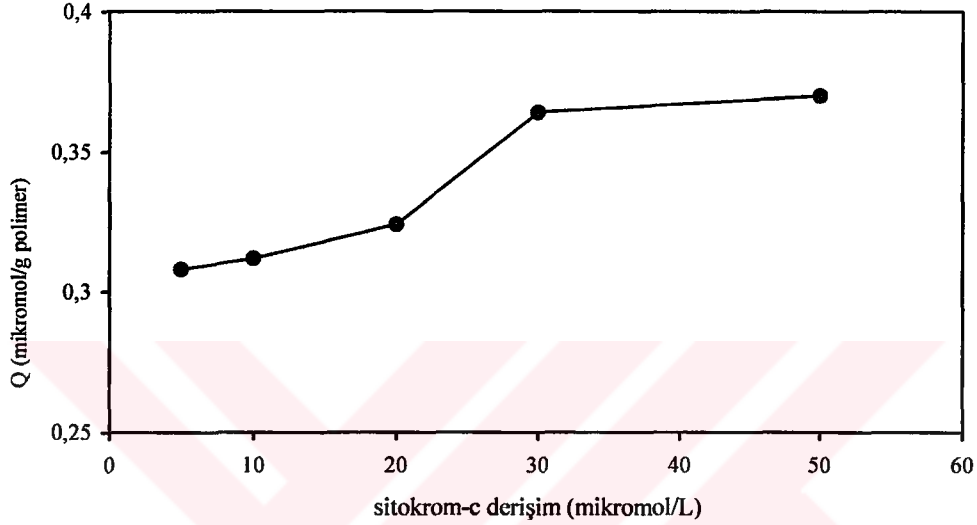


Şekil 3.10. Sitokrom-c adsorpsiyonuna Cu(II) başlangıç derişiminin etkisi; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; pH : 10; Sodyum fosfat tamponu; T: 20°C

3.3.2. Sitokrom-c Başlangıç Derişiminin Etkisi

Sitokrom-c başlangıç derişiminin sitokrom-c adsorpsiyonuna etkisi Şekil 3.11'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere çözeltideki sitokrom-c derişiminin artmasıyla birim polimer kütlesi başına adsorplanan sitokrom-c miktarı, 30 $\mu\text{M/L}$ 'den düşük derişimlerde artmış, daha sonra bir denge değerine ulaşmıştır. Bu adsorpsiyon davranışında

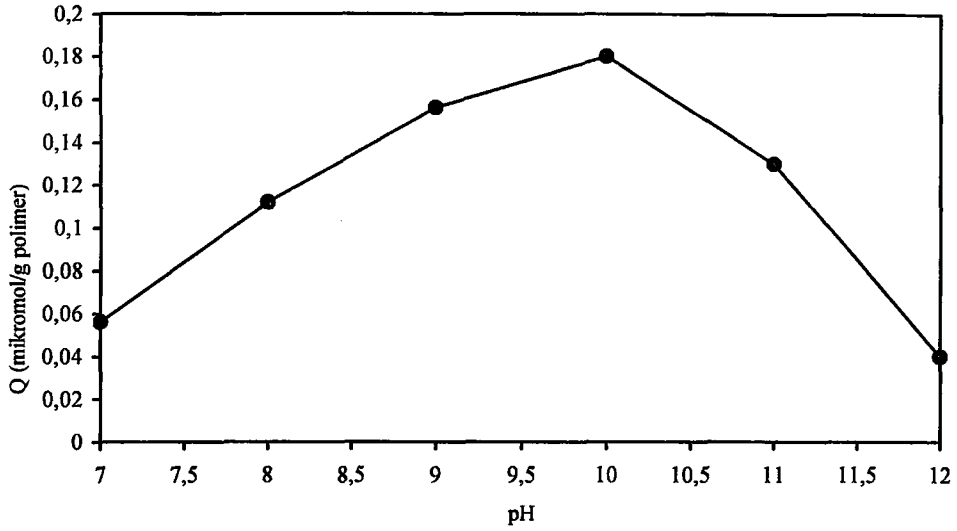
beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (DC) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile de adsorpsiyon kapasitesinde artış gözlenmektedir. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere maksimum sitokrom-c adsorpsiyon kapasitesi 4.81 mg/g'dır.



Şekil 3.11. Sitokrom-c adsorpsiyonuna Sitokrom-c başlangıç deriminin etkisi; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Cu(II) yükleme miktarı: 122.7 mg/g; pH : 10; Sodyum fosfat tamponu; T : 20°C

3.3.3. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna pH Etkisi

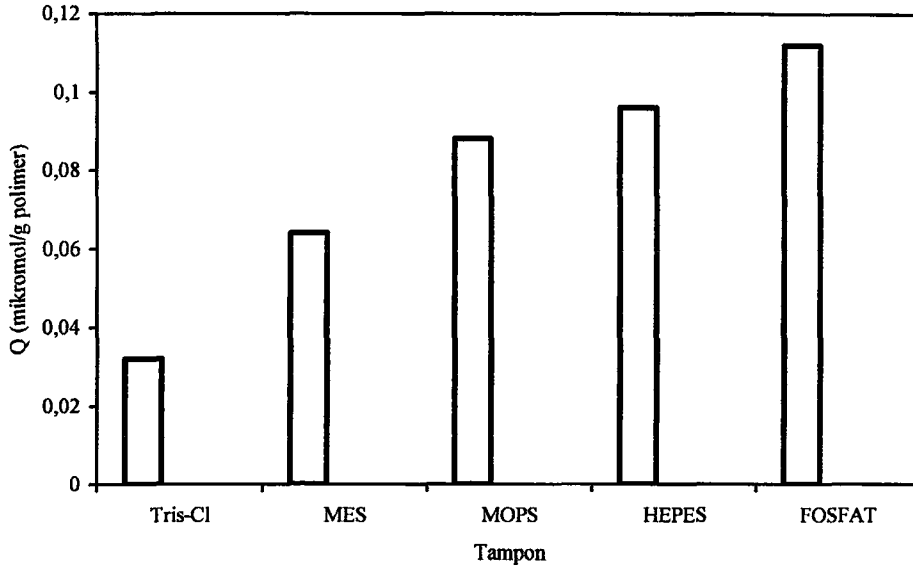
Şekil 3.12'de polimerik mikrokürelere sitokrom-c adsorpsiyonuna pH'ın etkisi verilmiştir. Bu grup deneylerde sodyum fosfat tampon sistemi kullanılmıştır. Fosfat tamponu ile pH 7.0-12 aralığında (0.1 M) çalışılmıştır. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu pH 10.0'da gözlenmiştir. Maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu ise 2.34 mg/g'dır.



Şekil 3.12. Sitokrom-c adsorpsiyonuna sodyum-fosfat tamponunda pH'nın etkisi; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Cu(II) yükleme miktarı: 122.7 mg/g; Sitokrom-c başlangıç derişimi: 0.065 mg/ml; T : 20°C

3.3.4. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna Tampon Etkisi

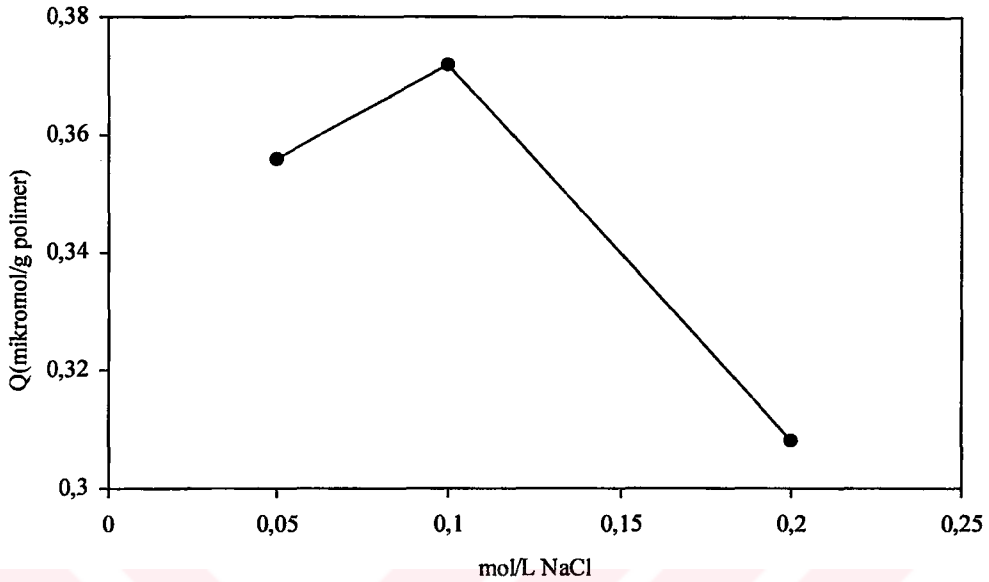
Şekil 3.13'de polimerik mikrokürelere Sitokrom-c adsorpsiyonuna tampon etkisi verilmiştir. MOPS, MES, HEPES, Tris-Cl ve sodyum fosfat tamponları kullanılarak sitokrom-c adsorpsiyonu incelenmiştir. 122.7 mg/g Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere adsorplanan sitokrom-c miktarı Tris-Cl tamponu için 0.416 mg/g, MES tamponu için 0.832 mg/g, MOPS tamponu için 1.144 mg/g, HEPES tamponu için 1.248 mg/g ve sodyum-fosfat tamponu için 1.456 mg/g bulunmuştur.



Şekil 3.13. Sitokrom-c adsorpsiyonuna tampon etkisi; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Cu(II) yükleme miktarı: 122.7 mg/g; Sitokrom-c başlangıç derişimi: 0.065 mg/ml; pH: 7; T: 20°C

3.3.5. Sitokrom-c Adsorpsiyonuna İyonik Şiddet Etkisi

Bu grup deneylerde Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere sitokrom-c adsorpsiyonuna iyonik kuvvetin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14.'de topluca sunulmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi, tuz derişimi arttıkça sitokrom-c adsorpsiyon kapasitesi 0.1 M NaCl tuz derişimine kadar biraz artış göstermiş, bu değerden sonra ise adsorpsiyon kapasitesi önemli oranda azalmıştır. Tuz derişimi 0.1 M değerinde iken sitokrom-c adsorpsiyonu 4.84 mg/g olarak bulunmuştur.



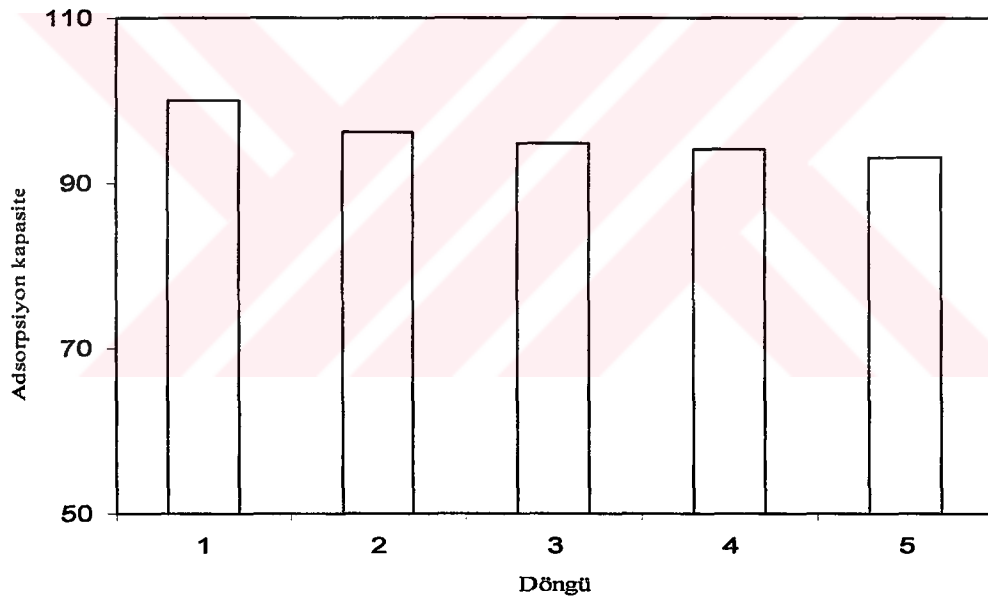
Şekil 3.14. Sitokrom-c adsorpsiyonuna iyonik kuvvetin etkisi; MAH yükleme oranı 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Cu(II) yükleme miktarı: 122.7 mg/g; Sitokrom-c başlangıç derişimi: 0.065 mg/ml; pH: 10; T : 20°C

3.4. Cu(II) Takılı Polimerik Mikrokürelere Sitokrom-c Desorpsiyon Çalışmaları

Sitokrom-c desorpsiyon deneyleri kesikli sistemde incelenmiştir. Sitokrom-c adsorplanmış p(HEMA-co-MAH)-Cu(II) mikrokürelere desorpsiyon ortamında 600 devir/dakika hızda 2 saat karıştırılmıştır. Desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M EDTA çözeltisi kullanılmıştır. Sitokrom-c desorpsiyon oranı % 93.1'dir. Bu değerin desorpsiyon ortamı hacmi ve desorpsiyon süresini arttırarak % 100 değerine ulaşılacağı not edilmelidir. Desorpsiyon ajanı p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere adsorplanan Cu(II) iyonları ile şelasyon yaparak, Cu(II) iyonlarını ortamdan uzaklaştırır. Sonuçta sitokrom-c molekülleri ile şelat formadaki Cu(II) iyonları arasındaki etkileşim kuvvetleri azalacağından sitokrom-c adsorbentten ayrılarak desorpsiyon ortamına geçer.

Bir afinite adsorbanında aranan önemli özelliklerden biri de, bu malzemenin ayırma işleminde defalarca kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik sonucunda aynı adsorbent

defalarca kullanılarak ayırma işleminin maliyeti önemli ölçüde azaltılır. Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbente 5 kez ardarda adsorpsiyon-desorpsiyon işlemin uygulanmıştır (Şekil 3.15). Sterilizasyon amacıyla her adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası polimerik mikroküreler 50 mM NaOH çözeltisi ile ardından damıtık su ve daha sonra dengeleme için sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile yıkanmıştır. Her bir yıkama işlemi 30 dakika sürdürülmüştür. Desorpsiyon ve sterilizasyon işlemleri sırasında polimerik yapıdan MAH sızması gözlenmemiştir. 5 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 3.15. Polimerik mikrokürelerin tekrar kullanılabilirlikleri; MAH yükleme oranı: 11.79 $\mu\text{mol/g}$; Cu(II) yükleme miktarı: 122.7 mg/g; Sitokrom-c başlangıç derişimi: 0.065 mg/ml; T: 20°C.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada p(HEMA-co-MAH) metal şelat afinite adsorbentleri hazırlanmış ve sitokrom-c adsorpsiyon özellikleri incelenmiştir.

Sentezlenen p(HEMA-co-MAH) mikroküreler çapraz bağlı ve nispeten hidrofilik yapıda bir matrikstir. pHEMA'nın denge su tutma kapasitesi % 55 iken p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin su tutma oranı % 65 olarak bulunmuştur. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Polimerik yapılar küresel forma ve düzgün bir yüzeye sahiptirler. Polimerik yapının iç kısmının incelenmesi için mikroküreler kırılarak SEM fotoğrafları alınmıştır. Bu fotoğraflardan görüleceği gibi (Şekil 3.1.) mikrokürenin iç yapısında mikrogözenekler söz konusudur. Mikroküre yüzeyinin gözenekli bir yapıya sahip olması yüzey alanını artıran bir faktördür.

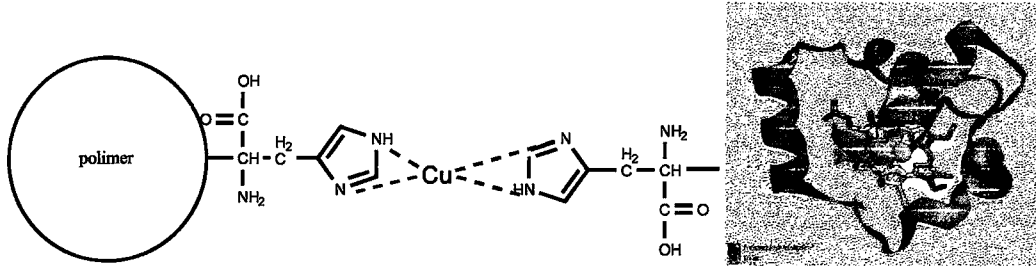
Üretilen p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin 50-63 µm çap aralığında olduğu Tyler elek analizi yöntemi ile bulunmuştur. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin spesifik yüzey alanı Brunner Emmet Teller (BET) yöntemi ile 17.6 m²/g olarak tayin edilmiştir.

Polimerik yapıdaki MAH oranının tayini için p(HEMA-co-MAH) mikrokürelerin elementel analizleri alınmıştır. MAH içeriği, azot sitokiyometrisi kullanılarak 2.36-35.38 µmol/g polimer aralığında bulunmuştur. MAH'ın polimerik yapıya girme oranı % 90'ın üzerindedir. Analiz sonucunda polimerizasyon ortamına katılan MAH miktarının artmasıyla takılan MAH miktarının da arttığı görülmüştür.

Polimerin birim kütlesi başına şelat oluşturan Cu(II) miktarı Cu(II) başlangıç derişiminin artması ile artmaktadır. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere maksimum Cu(II) adsorpsiyonu 11.79 µmol/g MAH yükleme oranı için 122.7 µmol/g'dır.

Cu(II) adsorpsiyon deneylerinde ortam pH'ı 3.0-6.5 aralığında değiştirilmiştir. Düşük pH değerlerinde polimerik yapıdaki MAH grupları ile Cu(II) iyonları arasındaki etkileşim oldukça zayıftır. pH'ın artması ile bu etkileşim şiddeti artmakta ve pH 5.0-6.5 arasında hemen hemen pek değişmemektedir.

Sentezlenen p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere Cu(II) yüklenmesinin ardından sitokrom-c adsorpsiyon deneylerine geçilmiştir. Sentezlenen mikrokürelere ile Cu(II) metali ve sitokrom-c arasındaki olası etkileşimin şematik gösterimi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere ile sitokrom-c molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi

p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere yüklenen Cu(II) başlangıç derişiminin sitokrom-c adsorpsiyonuna etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.9’da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi 10 ppm Cu(II) yükleme oranında maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu 4.21 mg/g olarak bulunmuştur.

Cu(II) takılı p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere sitokrom-c adsorpsiyon kapasitesi 4.81 mg/g’dir. Adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini göstermek için sodyum fosfat tampon sistemi kullanılmış ve pH 7.0-12.0 aralığında (0.1 M) çalışılmıştır. Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu pH 10’da 2.34 mg/g olarak bulunmuştur.

Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere, sitokrom-c adsorpsiyonuna tampon çözelti etkisi incelenmiştir. Hidroksimetil aminometan hidroklorür (Tris-HCl) tamponu için adsorplanan sitokrom-c miktarı 0.416 mg/g, morfolinoetan sülfonik asit (MES) tamponu için 0.832 mg/g, morfolinopropan sülfonik asit (MOPS) tamponu için 1.144 mg/g, hidroksietilpiperazinetan sülfonik asit (HEPES) tamponu için 1.248 mg/g ve sodyum-fosfat tampon sistemi için ise 1.456 mg/g olarak bulunmuştur.

Cu(II) yüklenmiş p(HEMA-co-MAH) mikrokürelere sitokrom-c adsorpsiyonuna iyonik kuvvetin etkisi incelenmiştir. Şekil 3.12’den de görüldüğü

gibi, 0.1 M tuz derişiminde maksimum sitokrom-c adsorpsiyonu 4.84 mg/g olarak bulunmuştur.

Desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M EDTA çözeltisi kullanılmış ve sitokrom-c desorpsiyon oranı % 93.1 olarak bulunmuştur. Bu değerin desorpsiyon ortamı hacmi ve desorpsiyon süresini arttırarak % 100 değerine ulaşılabilceği not edilmelidir.



KAYNAKLAR

ANDERSON, L. ve PORATH, J., *Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{+3}) affinity chromatography*, *Analytical Biochemistry*, **154**, 250-5 (1986).

APEZTEGUIA, I., CALLIGARIS, R., BOTTARDI, S. ve SANTORO, C., *Expression, purification and functional characterization of the two zing-finger domain of the human GATA-1*, *Protein Expression Purif.*, **5**, 541-6 (1994).

ARNOLD, F.H., *Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing*, *Bio/Technology*, **9**, 150-5 (1991).

BAL, W., KOZLOWSKI, H. ve KASPRZAK, K.S., *Molecular models in nickel carcinogenesis*, *J. Inorg. Biochem.*, **79**, 213-218 (2000).

BEUVAIS, R.A. ve ALEXANDRATOS, S.D., *Polymer-supported reagents for the selective complexation of metal ions: an overview*, *React., Funct. Polym.*, **36**, 113-123 (1998).

CHAGA, G., L. ANDERSON, B. ERSSON ve J. PORATH, *Purification of two muscle enzymes by chromatography on immobilized ferric ions*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **11**, 424-31 (1989).

CHAIKEN, I.M., WILCHEK, M. ve PARIKH, J., *Affinity Chromatography and Biological Recognition*, Academic Press, New York, USA (1983).

COLLANGELI, R., HEIJBEL, A., WILLIAMS, A.M., MANCA, C., CHAN, J. ve LYASHCHENKO, K., *Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Chromatography B: Biomed Sci. Appl.*, **714**, 223-35 (1998).

DAVANKOV, V.A. ve SEMECHKIN, A.V., *Ligand-exchange chromatography*, *Journal of Chromatography*, **14**, 313 (1977).

DENİZLİ, A. ve PİŞKİN, E., *Heparin Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate Microbeads for Cholesterol Removal: A Preliminary Report*, *J. Chromatogr. B.*, **670**, 157-161 (1995).

GÖZÜKARA, E., *Biyokimya*, Ofset Repromat Ltd. Şti, Ankara, Türkiye (1989).

GRIBNAN T.C.B., VISSER J. ve NIVARD R.J.F., *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Elsevier, Amsterdam, Netherland (1982).

KEHA, E. ve KÜFREVİOĞLU, İ., *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, İstanbul, Türkiye (2000)

KHOSSRAVI, M. ve BORCHARDT, RT., *Chemical pathways of peptide degradation: IX Metal-catalyzed oxidation of histidine in model peptides*, Pharm. Res., **15**, 1096-1102 (1998).

KIM, M., SAITO, K., FURUSAKI, S., SUGO, T. ve ISHIGAKI, I., *Protein adsorption capacity of a porous phenylalanine containing membrane based on a polyethylene matrix*, J. Chromatogr., **586**, 27-33 (1991).

KRISHNAMURTY, R., MADURAWA, R.D., BUSH, K.D. ve LUPMKIN, J.A., *Conditions promoting metal-catalyzed oxidations during immobilized Cu-immunodiacetic acid metal affinity chromatography*, Biotechnol. Prog., **11**, 643-650 (1995).

LEO, C., NELSON, P., KAIN, S. ve YANG, T., *Talon resin offers 6xhis protein purification under native conditions using β -mercaptoethanol as a reducing agent*, Clontechiques, p. 19, (1996).

PORATH, J., ve BELEW, M., *Affinity Chromatography and Biological Recognition*, Academic Press Inc., New York, USA (1983).

PORATH, J., CARLSSON J., OLSSON, I. ve BELFRAGE, G., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*, Nature, **258**, 598-9 (1975).

PORATH, J., *IMAC-immobilized metal ions affinity based chromatography*, Trends in Analytical Chemistry, **7**, 254-9 (1988).

ROMAN, M. ve BROWN, P., *Separation techniques for biotechnology in 1990s*, Journal of Chromatography, **592**, 3-12 (1992).

SAY, R., GARİPCAN, B., EMİR, S., PATIR, S. ve DENİZLİ, A., *Preparation of Poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylamidohistidine) Beads and its Design as a Affinity Adsorbent for Cu(II) Removal from Aqueous*

SCOUTEN W.H., *Affinity Chromatography. In Chemical Analysis Monograph Series*, Wiley, New York, USA (1981).

SMITH, M.C., T.C. FURMAN, T.D. INGOLIA ve C. PIDGEON, *Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography: a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins*, *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 7211-5 (1988).

SULKOWSKI E., *Purification of proteins by IMAC*, *Trends in Biotechnology*, **3**, 1-7 (1985).

SULKOWSKI E., *The saga of proteins by IMAC*, *Bioassays*; **10**, 170-5 (1989).

SULKOWSKI E., *Immobilized metal ion affinity chromatography: imidazole proton pump and chromatographic sequelae: I. Proton pump*, *J.Mol. Recognit*; **9**, 389-93 (1996).

SULKOWSKI E., *Immobilized metal ion affinity chromatography: imidazole proton pump and chromatographic sequelae: II. Chromatographic sequelae*, *J.Mol. Recognit*; **9**, 494-8 (1996).

SUNDARAM P.V. ve ECKSTEIN F., *Theory and Practice in Affinity Techniques*, Academic Press, New York, USA (1978).

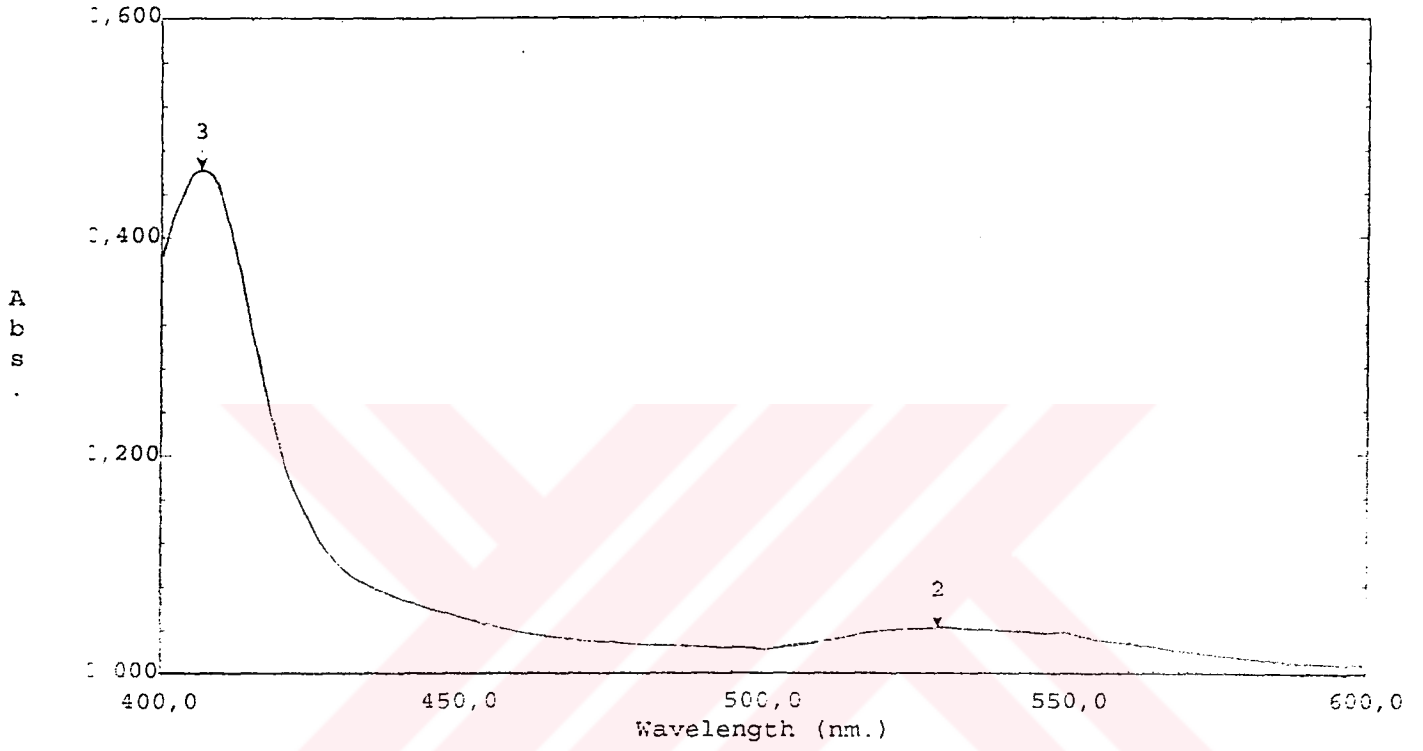
VOET, D., VOET, J.G. ve PRATT, C.W., *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (1999).

WILLIAMS, D.R., *The Metals of Life: The Solution Chemistry of Metal Ions in Biological Systems*, Van Nostrand Reinhold Company, London, England (1971).

WONG, J.W., *Frontal Analysis and Engineering Applications in Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, M.S. Thesis, Purdue University, Dec. (1990).

ZORODDU, M.A., KOWALIK-JANKOWSKA, T., KOZLOWSKI, H., MOLINARI, H., SALNIKOW, K. ve BRODAY, L., *Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4: akrhrk, a model of the H4 tail*, *Bba Gen Subj*, **1475**, 163-8 (2000).

EKLER**EK 1.** Sitokrom-c kalibrasyon doğrusu



EK 2. Sitokrom-c UV-VIS Spektrumu