

171209

SİTOKROM C ADSORBSİYONU İÇİN  
MANYETİK METAL ŞELAT AFİNİTE  
SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

BİR NUR AKKAYA  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

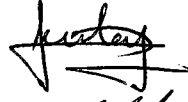
SİTOKROM C ADSORBSİYONU İÇİN MANYETİK METAL ŞELAT AFİNİTE  
SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

BİRNUR AKKAYA  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
2005


**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Bu çalışma, Jürimiz tarafından, Kimya anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sevtap BAKIR



Üye : Doç. Dr. Ferda CANDAN



Üye : Doç. Dr. Nursevin ÖZTOP



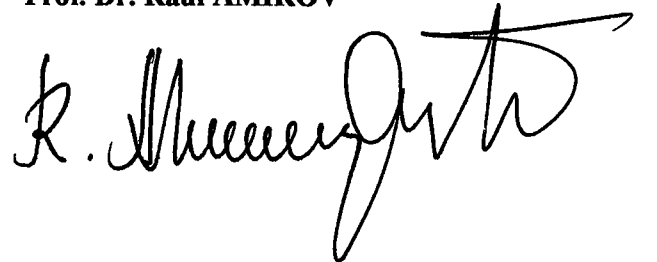
**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

31/01/2005

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ**

**Prof. Dr. Rauf AMİROV**



SİTOKROM C ADSORBSİYONU İÇİN MANYETİK METAL ŞELAT AFİNİTE  
SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

BİR NUR AKKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2005

Danışmanlar:  
Doç. Dr. Ferda CANDAN  
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Bölüm  
Cumhuriyet Üniv. Kimya Bölümü  
Hacettepe Üniv. Kimya Bölümü

İmza

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü Fen bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne hazırlanan ve yayınlanan “Yüksek Lisans ve Doktora tez yazım Kılavuzu” adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Biyoafinite Kromatografisi	2
1.1.1. İmmobilize Metal-İyon Afinite Kromatografisi	5
1.1.2. İMAK'ın Kimyasal Prensipleri	10
1.1.2.1. İMAK için Kromatografik Destekler(matriksler)	10
1.1.2.2. İMAK'da Şelat Oluşturucu Ligandlar	11
1.1.2.3. Serbest Çözeltilde ve İmmobilize Formdaki Amino asit	
Metal Etkileşmeleri	13
1.1.2.4. Serbest Çözeltilde ve İmmobilize Formdaki	
Protein-Metal Etkileşmeleri	14
1.1.3. İMAK'ta Peptit ve Proteinlerin Adsorpsiyon-Desorpsiyon	
Mekanizmaları	15
1.1.3.1. pH Etkisi	16
1.1.3.2. Tuz Etkisi	16
1.1.3.3. Yarışmalı Ajanlar	18
1.1.4. İMAK'ta Proteinlerin Alıkonma Davranışları	18
1.1.5. İMAK'ın Protein Safılaştırılmasında ve Diğer Bazı	
Uygulamalarda Kullanımı	20
1.1.6. İMAK'ın Bazı Avantajları	22
1.1.7. İMAK'ın Bazı Dezavantajları	24
1.1.7.1. Kolon İçindeki Olası Redoks Tepkimerleri	24
1.1.7.2. Metal Toksisitesi	25
1.1.8. Mikroküreler ve Kullanım Alanları	25
1.1.9. Manyetik Partiküller	26
1.2. Sitokrom c	26
2. MATERYAL VE METOD	30
2.1. Materyal	30
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	30

2.1.2. Kullanılan Cihazlar	30
2.2. Metod	31
2.2.1. Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması	31
2.2.1.1. 2-Metakrioloamidohistidin Sentezi	31
2.2.1.2. Manyetik poli(EGDMA) Mikrokürelerin Hazırlanması	31
2.2.1.3. Manyetik poli(EGDMA-MAH) Mikrokürelerin Hazırlanması	32
2.2.2. Manyetik Mikrokürelerin Karakterizasyonu	34
2.2.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü ve Yüzey Analizi	34
2.2.2.2. Şişme Testi	34
2.2.2.3. Yüzey Morfolojisi	34
2.2.2.4. Elementel Analiz	34
2.2.2.5. <sup>1</sup> H-NMR Analizi	35
2.2.2.6. FTIR Analizi	35
2.2.2.7. Manyetiklik Özellikler	35
2.2.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	35
2.2.3.1. Polimerik Mikrokürelere Cu <sup>2+</sup> İyonlarının Takılması	35
2.2.3.2. Cu <sup>2+</sup> Şelatlı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom c Adsorpsiyon Çalışması	36
2.2.3.3. Akış Hızı	37
2.2.3.4. Cu <sup>2+</sup> Şelatlı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom c Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirliği	37
3. BULGULAR	38
3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu	38
3.1.1. Yüzey Alanı Ölçümü ve Yüzey Analizi	38
3.1.2. Şişme Testi	38
3.1.3. Yüzey Morfolojisi	38
3.1.4. Elementel Analiz	39
3.1.5. FTIR Analizi	40
3.1.6. <sup>1</sup> H-NMR Analizi	43
3.1.7. Manyetik Özellikler	44
3.2. Cu <sup>2+</sup> Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom c Adsorpsiyonu	45
3.2.1. Polimerik Mikrokürelere Cu <sup>2+</sup> Şelasyonu	45
3.2.2. Sitokrom c Başlangıç Derişiminin Etkisi	45

3.2.3. Sitokrom c Adsorpsiyonuna pH Etkisi	47
3.2.4. Sitokrom c Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi	48
3.2.5. Adsorpsiyon İzotermi	49
3.2.6. Kinetik Çalışmalar	51
3.2.7. Akış Hızı Etkisi	54
3.2.8. $\text{Cu}^{2+}$ Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelere Sitokrom c Desorpsiyonu	55
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
5. KAYNAKLAR	60
6.ÖZGEÇMİŞ	66





ÖZET  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİTOKROM C ADSORBSİYONU İÇİN MANYETİK METAL ŞELAT AFİNİTE  
SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

Birnuş AKKAYA

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferda CANDAN

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Bu çalışmada, poli(etilenglikoldimetakrilat-metakrilamidohistidin) bazlı polimerlerin manyetik özellikte sentezlenmesi ve bakır şelat üzerinden Sitokrom c'nin immobilize metal afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasının incelenmesi amaçlanmıştır. İlk bölümde metakriloamidohistidin (MAH) komonomerinin sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen yapının NMR ve FTIR ile karakterize edilmesinin ardından EGDMA ile yapıya manyetik özellik kazandıracak ajan demir oksit varlığında polimerleştirildi. Uygun boy-boy dağılımına ve yüzey özelliğine sahip manyetik p(EGDMA-co-MAH) mikrokürelere farklı deneysel koşullarda (ortam pH'ı, sıcaklık, akış hızı ve protein başlangıç derişimi) sulu çözeltilerden model protein sitokrom c adsorpsiyonu in-vitro koşullarda, kesikli sistemde ayrıntılı olarak incelendi. Çalışmanın son bölümünde ise, adsorbentin rejenerasyonu ve tekrar kullanılabilirliği incelendi.

Metal şelatlayıcı ligand olarak N-metakroil-(L)-histidin metil ester (MAH) kullanılarak yeni metal-şelat adsorbentler hazırlandı. MAH ; Metakroil klorür ve L-histidin metil ester diklorür kullanılarak sentezlendi. Ortalama 50-100 µm büyüklükte manyetik mikrokürelere etilen glikol dimetakrilat'ın (EGDMA) ve MAH'ın süspansiyon polimerizasyonu ile oluşturuldu. Gözenekli mikrokürelere spesifik yüzey alanları 80 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> olarak bulundu. Manyetik poli (EGDMA-MAH) mikrokürelere: şişme testi, FTIR, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterize edildi. MAH'ın elementel analizi azot için 70.0 µmol.g<sup>-1</sup> olarak bulundu. Daha sonra, manyetik mikrokürelere üzerine Cu<sup>2+</sup> iyonları bağlandı. Cu<sup>2+</sup> şelatlı manyetik mikrokürelere ile manyetik mikrokürelere arasındaki sonuçlar kıyaslandı. Kesikli sistemde sitokrom c'nin adsorpsiyonu

için %40 şişme oranına sahip  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik mikroküreler kullanıldı. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin sitokrom c adsorpsiyonu pH 8.0'da  $51 \text{ mg g}^{-1}$  olarak gözlemlendi. Manyetik poli(EGDMA-MAH)- $\text{Cu}^{2+}$  mikrokürelerin maksimum sitokrom c adsorpsiyonu pH 8.0'da  $222 \text{ mg g}^{-1}$  olarak gözlemlendi. Sitokrom c adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla azaldı. Sitokrom c molekülleri adsorpsiyon kapasitelerinde herhangi bir değişim olmadan on defa tersinir olarak adsorblandı ve desorplandı.

**Anahtar sözcükler:** manyetik sorbent, sitokrom c, İMAK, poli(EGDMA-MAH)



## SUMMARY

MSc Thesis

PREPARING OF MAGNETIC METAL-CHELAT AFFINITY SORBENTS FOR  
ADSORPTION OF CYTOCHROME C

Birnur AKKAYA

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Dr. Ferda CANDAN

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

In this study, magnetic poly(EGDMA-MAH) poly(ethyleneglycoldimethacrylate-methacrylamidohistidine) metal-chelate affinity sorbents are synthesized and its usefulness for cytochrome-c adsorption were researched. A magnetic metal chelate adsorbent utilizing N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) as a metal-chelating ligand. In the first step, MAH was synthesized using methacryloyl chloride and L-histidine methyl ester. Magnetic microbeads were produced by suspension polymerization of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and MAH carried out in an aqueous dispersion medium. The characterization of synthesized magnetic polymer was evaluated by elemental analysis,  $^1\text{H}$ NMR and FTIR. Then  $\text{Cu}^{2+}$  ions were loaded to magnetic poly(EGDMA-MAH) mikrobeads and the effect of pH and  $\text{Cu}^{2+}$  initiation concentration on loading of  $\text{Cu}^{2+}$  were investigated. In the second step, for different temperature, pH, initial cytochrome c from aqueous solution were studied. Finally, desorption of adsorben cytochrome c on polymeric microbeads and reusability of microbeads were investigated.

A magnetic metal-chelate adsorbent utilizing N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) as a metal-chelating ligand was prepared. MAH was synthesized using methacryloyl chloride and L-histidine methyl ester. Magnetic beads with an average diameter of 50-100  $\mu\text{m}$  were produced by suspension polymerization of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and MAH carried out in an aqueous dispersion medium. Specific surface area of the magnetic beads was found to be  $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Elemental analysis

of the magnetic beads for nitrogen was estimated as  $70 \mu\text{mol MAH g}^{-1}$  polymer. Magnetic beads were charged with the  $\text{Cu}^{2+}$  ions directly via MAH for the adsorption of cytochrome c (cyt c) from aqueous solutions. The cyt c adsorption on the mag-poly(EGDMA-MAH) beads was  $51 \text{ mg g}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  charging increased the cyt c adsorption significantly. The maximum cyt c adsorption capacity of the  $\text{Cu}^{2+}$ -chelated beads (carrying  $68 \mu\text{mol Cu}^{2+}$  per g of polymer) was found to be  $222 \text{ mg g}^{-1}$  at pH 8.0 in phosphate buffer. Cyt c adsorption decreased with increasing temperature. Cyt c molecules could be reversibly adsorbed and desorbed ten times with the magnetic adsorbents without noticeable loss in their cyt c adsorption capacity.

**Keywords:** Magnetic sorbent, cytochrome c, IMAC, poly(EGDMA-MAH)



**TEŞEKKÜR**

Öncelikle bu tezin her aşamasında büyük ilgi ve anlayış göstererek beni destekleyen ve yol gösterici niteliği ile her zaman bana ışık tutan Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Ferda CANDAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını bana sunan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün deneysel çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma ve Cumhuriyet Üniversitesi'ndeki, desteğini esirgemeyen arkadaşlarıma da teşekkürler.

Maddi ve manevi olarak beni destekleyip, her konuda yanımda bulunan sevgideğer eşim Recep AKKAYA'ya sonsuz teşekkürler...

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi	5
Şekil 1.2. IDA metal-protein kompleksi	6
Şekil 1.3. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi	8
Şekil 1.4. IMAK'taki şelatlayıcı ligandlar	12
Şekil 1.5. Sitokrom c'nin yapısı	27
Şekil 1.6. Sitokrom c'nin mitokondrideki yeri	28
Şekil 2.1. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi	35
Şekil 3.1. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin SEM mikrografı	39
Şekil 3.2. Manyetik poli(EGDMA) ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin optik mikrografı	39
Şekil 3.3. Sentezlenen manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin önerilen yapısı	40
Şekil 3.4. MAH monomerinin FTIR spektrumu	41
Şekil 3.5. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumu	42
Şekil 3.6. MAH monomerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu	43
Şekil 3.7. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin manyetik davranışı	44
Şekil 3.8 Poli(EGDMA-MAH) mikroküreler ile Cu <sup>2+</sup> iyonları arasındaki etkileşim	45
Şekil 3.9. Adsorpsiyon kapasitesine başlangıç sitokrom c derişiminin etkisi	46
Şekil 3.10. Sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi	47
Şekil 3.11. Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	48
Şekil 3.12. Manyetik poli(EGDMA-MAH) ve Cu <sup>2+</sup> şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin a)Langmuir ve b)Freudlich izotermini	50
Şekil 3.13. Adsorbentin deneysel verilerinin yalancı birinci dereceden kinetiği	53
Şekil 3.14. Adsorbentin deneysel verilerinin yalancı ikinci dereceden kinetiği	53
Şekil 3.15. Akış hızı etkisi	54
Şekil 3.16. Manyetik polimerik mikroküreler ile Cu <sup>2+</sup> Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelerin tekrar kullanılabilirlikleri	55

**TABLolar DİZİNİ**

Tablo 1.1. Afinite kromotografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler	3
Tablo 1.2. Afinite kromotografisinin alt başlıkları	4
Tablo 1.3. Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminleri	19
Tablo 1.4. Protein alıkonmasında yeralan amino asitlerin bireysel dağılımı	19
Tablo 1.5. İMAK ve standart afinite kromatografisinin karşılaştırılması	23
Tablo 1.6. Tuna balığı, at ve maya sitokrom c'lerinin amino asit dizilimleri	29
Tablo 2.1. Manyetik poli(EGDMA) mikrokürelerin polimerizasyon koşulları	32
Tablo 2.2. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin polimerizasyon koşulları	33
Tablo 3.1. Sitokrom c için Langmuir ve Freundlich sabitleri	51
Tablo 3.2. Sitokrom c ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) Adsorpsiyonu İçin Kinetik Sonuçlar	52



## 1.GİRİŞ

Tutuklanmış metal iyon afinite kromatografisi (İMAK), terapötik proteinler, peptitler, nükleik asitler, hormonlar ve enzimler için geniş analitik ve preparatif ayırma yöntemi haline gelmiştir. Bazı geçiş metalleri, elektronca zengin bileşiklerle kararlı kompleksler oluşturabilirler ve O, N, S içeren molekülleri iyon-dipol etkileşimi ile koordine edebilirler. Birinci sıra geçiş metalleri olan ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) metal iyon ligandları; iminodiasetik asit, nitrilo triasetik asit ve tris(karboksimetil)etilen-diamin tarafından içerilir. İMAK, şelatlanmış metal iyonlarına karşı afinitelerine dayanan seçici etkileşen materyallere yeni bir yaklaşımı kapsar. Ayırma, şelatlanmış metal iyonun (Lewis asidi (elektron çifti alıcısı)), protein yüzeyindeki elektron donör atomla etkileşmesine dayanır. Bu etkileşim proteinlerin, yapısında bulunan daha çok histidindeki imidazol grubundan ve daha az olasılıkla da triptofanın indol grubu ve sistein'in tiol grubundan dolayı olduğu kabul edilir. Merkezi konformasyon ve komşu amino asit zincirleri arasındaki işbirliği protein bağlanmasında önemli rol oynar. Aromatik amino asitler ve peptitlerin amino terminali de bazı dağılımlara sahiptir. Metal-afinite metodunun ilgi çekmesinin sebebi, metallerin düşük fiyatı ve tekrar kullanılabilirliği, metal şelat özelliklerinde herhangi bir kayıp olmadan adsorbentlerin kullanılabilirliğinin çok olması gibi özelliklerdendir. Bu çalışmada, sitokrom c'nin İMAK kullanılarak saflaştırılmasında, metal şelat ligandı olarak, MAH'nin kullanılması amaçlandı.

Manyetik alanda uygulanan bir çok ayırma tekniği vardır (O'Brien ve ark, 1996; Tsai ve ark, 2002; Meszarosova ve ark, 2003). En çok bilinen teknik ise manyetik olarak kararlı akışkan yataklı sistemdir. Manyetik olarak kararlı akışkan yataklı sistem, sabit ve akışkan yatağın en iyi özelliklerinin bir arada taşır. Bunlar, akıcı katı-kütle transfer özelliklerini, partikül karışımının eliminasyonunu ve sürekli ters akım operasyonunu içerir. Manyetik adsorbentlerle kontakt halinde olan oldukça viskos ortamlara değinildiğinde, yüksek konvektif transport hızından dolayı manyetik olarak kararlı akışkan yataklı sistem elverişlidir. Son zamanlarda, biyomolekül bağlamada ve nükleik asit saflaştırmada manyetik adsorbentlerin kullanımına büyük ilgi vardır (Tong ve ark., 2001).

Manyetik adsorbentler, inorganik materyaller veya sentetik ve doğal polimerler kullanılarak üretilmektedir. Yüksek mekanik direnç, çözünür olmaması ve mükemmel raf ömrü, gibi özelliklerinden dolayı, inorganik materyaller, taşıyıcı olarak ideal olur. İnorganik adsorbentlerin önemli dezavantajı metal iyonlarıyla şelat oluşturmada sınırlı fonksiyonel gruba sahip olmasıdır. Manyetik adsorbentler gözenekli veya gözeneksiz olabilir (Cocker, ve ark, 1997). Manyetik adsorbentler çoğunlukla polimerden yapılırlar, çünkü farklı uygulamalarda



kullanılmak üzere çeşitli yüzey fonksiyonel gruba sahiptirler (Arıca ve ark, 2000; Odabası ve ar., 2004; Akgol ve ark, 2004; Özkara ve ark, 2004).

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 amino asitlere bağlanabilirler. Histidin, sistein ve triptofan gibi amino asitlerin metal iyonları ile şelat etkileşimi ilk kez Porath tarafından tanımlanmıştır (Porath ve ark, 1983). Daha sonra bu alanda çok sayıda çalışma gerçekleştirilerek değişik biyomoleküllerin saflaştırılması başarılmıştır. Bu yöntemin en önemli avantajı ligandların ucuz ve kararlı olmalarıdır.

Bu çalışmada, sitokrom c'nin İMAK'ında kullanmak üzere komonomer veya metal şelatlayıcı ligand olarak N-metakrilolil-(L)-histidin metil ester (MAH) kullanıldı. MAH, metakrilolil klorür ve L-histidin metil esterden sentezlendi. Manyetik poli (etilen glikol dimetakrilat N-metakrilolil-(L)-histidin metil ester) (EGDMA-MAH) mikroküreler MAH ve EGDMA'nın manyetik ortamda süspansiyon polimerizasyonu ile üretildi. Bu işlemde sonra,  $Cu^{2+}$  iyonları bu manyetik mikrokürelere şelatlandı. Poli(EGDMA-MAH) manyetik mikroküreler NMR, ESR, FTIR, SEM ve elementel analiz ile karakterize edildi. Daha sonra, farklı pH larda, farklı sitokrom c miktarına sahip sulu çözeltide, manyetik metal şelatlayıcı mikrokürelerin sitokrom c'yi adsorplama etkisine bakıldı. Sitokrom c'nin desorpsiyonu ve bu metal şelatlayıcı afinite adsorbentlerin tekrar kullanılabilirliği test edildi.

### 1.1.Biyoafinite Kromatografisi

Biyoafinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir.

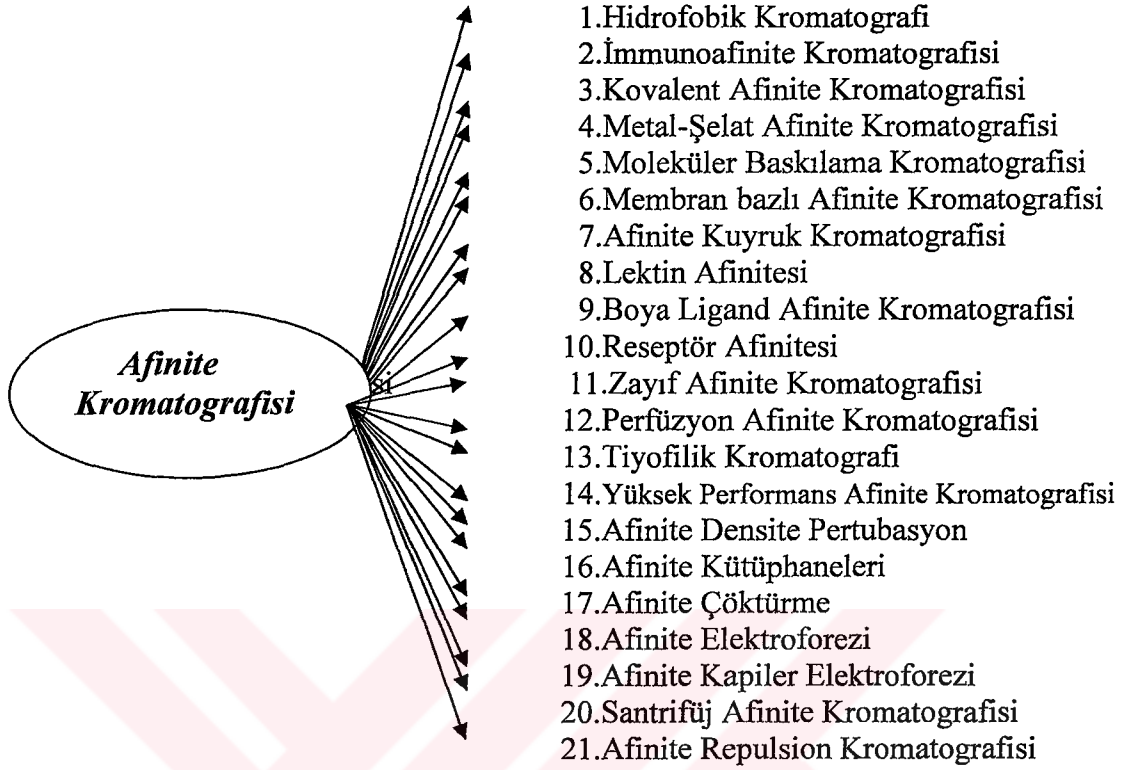
Proteinler büyüklük ve şekil, toplam yük, yüzeyde bulunan hidrofobik gruplar, kullanılan durağan faz ile bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklere sahip olduklarından, bu karakteristik özelliklerden biri temel alınarak gerçekleştirilen kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. İyon değişim kromatografisi protein yüküne dayanır. Jel geçirgenlik kromatografisi veya moleküler elek kromatografisi adı ile de bilinen ancak genelde jel filtrasyonu terimi kullanılan kromatografi tekniğinde ise proteinleri ayırmak için

proteinlerin şekil ve boyutlarını önemlidir. Hidrofobik uzantılar gibi protein yüzey özellikleri, hidrofobik etkileşim kromatografisinin temelini oluşturur. Afinite kromatografik ayırma da proteinlerin yüzey özelliklerine bağlıdır. Afinite kromatografisi bir biyolojik ligand (örneğin: substrat, enzim ya da hormon) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas alan güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir. Burada söz konusu etkileşim antikorları antijenlerle, enzimlerin substrat analoglarıyla ve de hormonların reseptörleri ile olan etkileşimleri türündendir. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler Tablo 1.1’de verilmiştir (Janson Jan-Christer ve Ryden Lars, 1997).

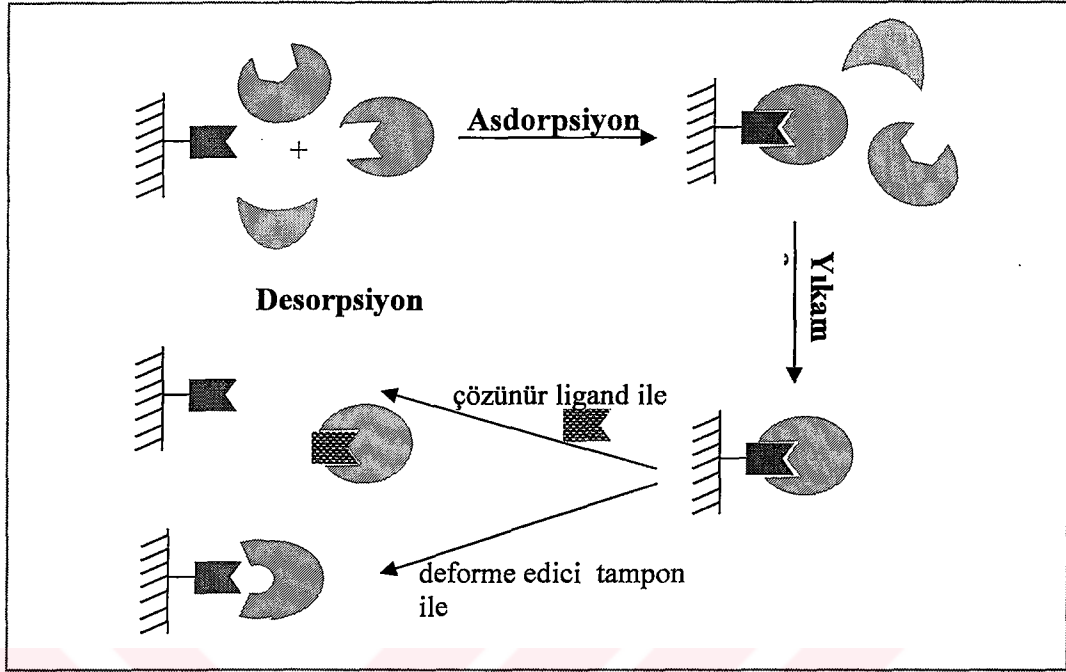
**Tablo 1.1.** Afinite Kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler

<b>Ligand</b>	<b>Ligandla Etkileşen Protein</b>
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon, Vitamin	Reseptör, Taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlı proteinler

Afinitenin geniş alanda değişik uygulamaları nedeniyle alt afinite teknikleri ortaya çıkmış ve bazıları kendilerine özel isimler almışlardır. Tablo 1.2’de bu tekniklerden bazıları verilmiştir.

**Tablo 1.2.** Afinite Kromatografisinin alt başlıkları (Janson Jan Christer ve Ryden Lars, 1997)

Biyofinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.1'de verilmiştir. Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. 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.



Şekil 1.1. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi (Ueda ve ark, 2003).

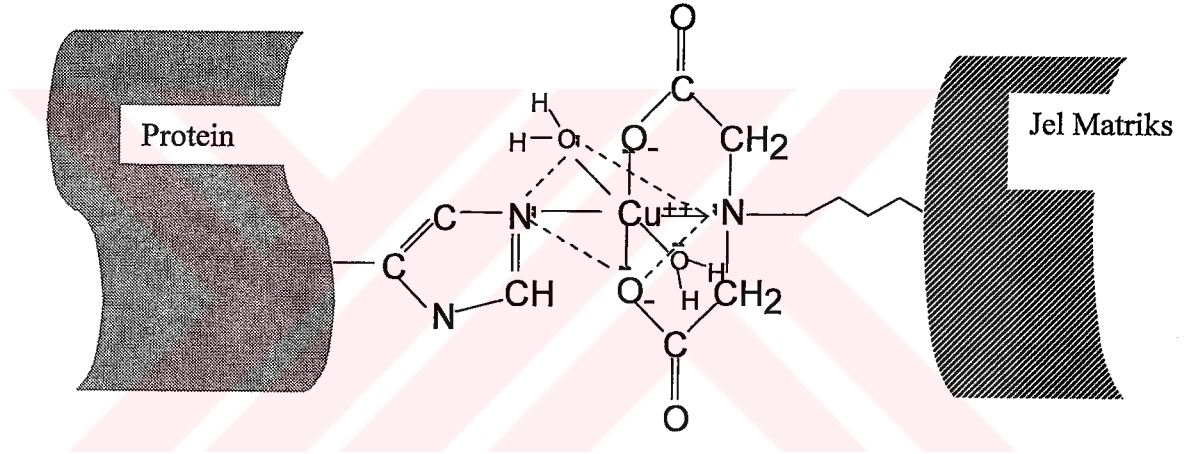
### 1.1.1. İmmobilize metal-iyon afinite kromatografisi

İmmobilize 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, detaylıca gözden geçirilmiştir (Davankov ve Semechkin, 1977). Biorad tarafından pazarlanan Chelex 100 gibi şelat yapıcı bir reçine, küçük metal iyonlarının bir katyon değiştirici olarak kullanıldığı iminodiasetat ligantlarını içerir. Makromoleküller için bir afinite ligant olan iminodiasetatın kullanımı, Porath ve arkadaşları tarafından 1975'te gerçekleştirildi. Daha sonra ligand değişimini de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin bütün şekillerini kapsayan "immobilize metal iyon afinitesi" terimi ortaya konuldu ve bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak, saflaştırılabildiğini gözlemledi (Porath ve ark, 1983).

Çoğu protein, metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilir. Bunlardan bir çoğu çok dişli kompleksler olup, İMAK'la proteinlerin saflaştırılmasını sağlarlar. Birçok durumda İMAK'ın yüksek spesifikliğini arttıran, oluşan kompleksin kuvvetidir ve proteinden proteine değişmektedir.

Proteinlerin (veya peptitlerin), metal iyonlara bağlanması, protein yüzeyindeki elektron verici gruplar ile bir veya daha çok koordinasyon merkezi olan metal iyonları arasındaki etkileşime dayanır. İMAK'ta, metal şelatlayıcı grubun kovalent bağlandığı matriks veya sorbent kullanılır.

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, denatürasyonu azaltabilir ve aktivitesini devam ettirebilir. Çözeltideki metal kompleks çalışmaları üzerine kurulu şematik bir resim Şekil 1.2' de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi metal, katı bir desteğe bağlı İDA ile şelat oluşturmaktadır (Ueda ve ark, 2003).



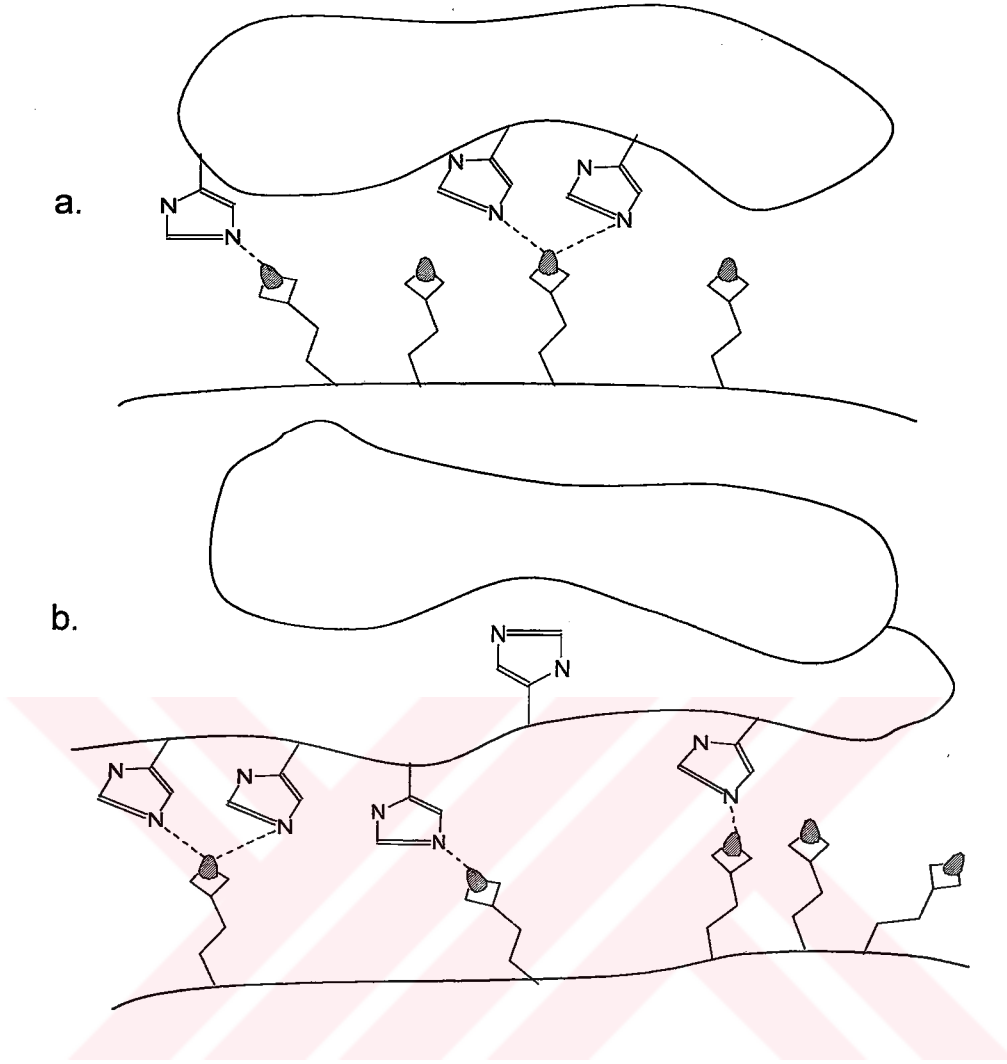
**Şekil 1.2.** İDA Metal-Protein Kompleksi.

Bir İMAK kolonu,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  gibi herhangi bir iyon çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle yüklenebilir. Çözeltiyi kolondan geçirme işlemine, çözeltideki metal iyonu ile sabit fazda şelat oluşturan metal iyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam edilir. İminodiasetik asit (İDA) gibi bir ligant, silika veya polimer bazlı olan katı destek materyale bağlanır. Kolon birkaç kez aşırı metal çözeltisiyle doldurulur ve uygun bir tampon ile dengeye getirilir. İlgilenilen biyolojik olarak aktif ürünleri içeren bir karışım, kolondan geçirilir. Karışımında bulunan bileşiklerden, liganta eşlenik olmayan moleküller kolondan geçer. İmmobilize metal-ligant kompleksi için afinite gösteren ürünler kolonda tutunur.

Metal afinite ile protein adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistenin tiyol ve histidinin imidazol grubu gibi elektron verici amino asit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına

katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere liganın bağlanması, metal şelasyonunun yanısıra elektrostatik, hidrofobik ve van der Waals etkileşimlerini de içermektedir. Proteinler, immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı şartlarda, komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz derişiminin ve pH'nın değişimi veya bağlanmada görev alan amino asit kalıntılara benzerliği bulunan yarışmalı bir ajanın ortama eklenmesi, proteini bağlı bulunduğu kompleksten uzaklaştırabilir. İmidazol ve histidin, İMAK' de bağlı proteinleri uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılan iki yarışmalı ajandır.

İMAK' de proteinlerin adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupları ile immobilize bir metal iyonu arasındaki koordinasyon oluşumuna dayanır. Çoğunlukla kullanılan metaller, Lewis asitleri olarak düşünölebilen ve elektron çifti kabul eden Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(II) gibi geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelat oluşturuıcı 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 amino asitler bağlanmaya katılabilmesine rağmen, İMAK' de proteinin gerçekte alıkonması histidil kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Trp, Phe, ve Tyr gibi aromatik yan zincire sahip amino asitler de, eğer dışarı uzanabilen histidil artıklarına yakın iseler onlarda bağlanmaya katkıda bulunabilir (Porath, 1992; Sulkowski, 1985). Şekil 1.3 Afinite desteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir (Ueda ve ark, 2003).



**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

İMAK desteklerine protein adsorpsiyonu, histidil artıklarındaki imidazol azotunun, nötral veya hafif bazik ortamlarda, protonlanmadığı pH larda gerçekleşir. Genellikle relatif olarak özgül olmayan elektrostatik etkileşimleri indirgemek için 0.1-1.0 M NaCl içeren yüksek iyonik şiddetli tamponlar kullanılır. Hedef proteinin elusyonu ortamın protonlanması, ligant değişimi veya EDTA gibi güçlü bir şelat oluşturuucu ile metal iyonunun



uzaklaştırılması yöntemleri ile yapılır. Hedef protein elusyonu için düşürülen pH gradientleri veya düşük pH'lı elusyon tamponları kullanılır. Düşük pH'a hassas proteinler için nötral pH civarında imidazol ile ligant 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, A ve B,1996). EDTA gibi güçlü şelat oluşturucu ajanların kullanılması da bağlı proteinlerin elusyonunu sağlar; fakat bu durumda sorbentin bağlama etkisi tahrip edildiği için, bir daha ki ayırmadan önce matriks tekrar şelat oluşturucu iyon ile yüklenmelidir.

Protein ayırmadaki seçicilik, uzatıcı kolla, ligant yoğunluğu, tuz derişimi ve yarışmacı ajanların değişmesi ile veya şelat oluşturucu ajanların değişimi ve metal ligantların seçimi gibi değişik yaklaşımlardan etkilenebilir. Mesela, insan büyüme hormonunun ayırımında, sorbent üzerindeki İDA, Cu(II) ligant yoğunluğunun düşürülmesi, daha yüksek protein saflığı ve artan bir ürün ile sonuçlanır (Liesiene ve ark, 1997). Bir metal şelat için proteinin görünen afinitesi koordinasyonda görev alan metal iyonlarına bağlıdır. İDA şelatlayıcı ajan kullanıldığında, alıkonan proteinlerin çoğunun, metal iyonlarına afinitesi ve alıkonma süreleri genellikle Cu(II)>Ni(II)>Zn(II)≥Co(II) şeklindedir. Ekstra azot içeren amino asitler için bir önceliği olan güncel olarak çoğunlukla kullanılan bu metallerin aksine, Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III) gibi sert Lewis asitleri aspartat ve glutamik asit gibi oksijence zengin grupları veya fosfat gruplarını tercih ederler (Liesiene ve ark, 1997).

Afinite kromatografisinde, geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında, İMAK pek çok avantaja sahiptir. Farklı metal iyonları, şelat oluşturucu ligant üzerine immobilize edilebilir ve daha güçlü şelat yapan başka bir ajan ile ortamdaki uzaklaştırılabilir. Metal bağlama özellik kaybını minimum düzeyde tutmak için, şelat oluşturucu jel sabitleştirilmelidir. Özel ayırma metotları, uygun metal seçimi ile çalışılabilir ve protein ile ligant arasında farklı adsorpsiyon özellikleri, şelat oluşturucu liganta farklı metal iyonlarının immobilize edilmesiyle başarılıdır. Çoğu durumda proteinler, İMAK kolonlarından ayrıldıktan sonra da hala aktivitelere sahiptirler. 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 .

Bir potansiyel saflaştırma işlemi olarak İMAK' nin kullanımı birçok araştırmacı tarafından yayınlanmış, İMAK ile ilgili uygulama ve geçmiş bilgileri açıklanmıştır (Porath ve Olin, 1983; Sulkowsk, 1985).



İMAK çalışmalarının büyük bir çoğunluğu Porath ve arkadaşları tarafından yayınlandı. Porath'ın çalışması, destek materyali olarak agaroz veya dekstran çapraz bağlı polimerik matrikslerin kullanımı,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  immobilizasyon için kullanılan metal iyonlarının seçimi, şelat yapan ajanların seçimi ve İMAK adsorpsiyon/desorpsiyon kimyası gibi İMAK temelleri üzerine odaklanmıştır. Porath'ın, protein ayırmalarında İMAK üzerine çalışmaları, serum proteinlerinin saflaştırılması, metalloproteinlerin karakterizasyonu ve serbest formlarının hazırlanması, fosfoproteinlerin ayrılması, yüksek performans immobilize metal iyon afinite kromatografisi (HP-İMAK) ve bir protein molekülü üzerindeki histidin artıklarının topografyasındaki İMAK' nın bir prob olarak kullanılması gibi uygulamaları içermektedir (Porath ve Olin, 1983; Chaouk ve Hearn, 1999; Gaberc-Porekar ve Menart, 2001).

### **1.1.2. İMAK' nin kimyasal prensipleri**

#### **1.1.2.1. İMAK için kromatografik destekler (matriksler)**

Afinite kromatografisi için kullanılan çeşitli destek materyaller vardır. Destek matriks, bir protein ile immobilize metal arasında şekillenen kompleksin dayanıklılığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. Bir kromatografik destek için istenilen genel özellikleri, iyi bir kolon dolgusu için aynı form büyüklük ve şekle sahip olma, yüksek kapasite için etkili yüzey alanı ve mekanik dayanıklılık olarak sayılabilir. Küçük partiküllü destekler, akış hızına karşı büyük bir direnç gösterirler ve kolon tıkanabilir. Geniş partiküller, akış rezistansını düşürürler fakat kolon etkinliğini (ayırma kapasitesini) azaltırlar. Farklı formdaki partiküller, düzensiz bir dolgu oluşturabilirler ve bu da kanallaşmaya neden olabilir. Kolon dolgu maddelerinin bakterilere karşı göstereceği direnç de önemli bir özelliktir.

İMAK da kullanılan ilk matriks, oksiran ile aktive edilmiş agaroz, iminodiasetat (İDA) ligantlarının kovalent olarak bağlanmasıyla elde edildi. İDA-agaroz matrikslerin hazırlanmasına alternatif metotlar daha sonra Hemdan ve Porath tarafından geliştirildi (Ueda ve ark, 2003). Agaroz matriksleri hidrofilik, mekanik ve kimyasal olarak dayanıklı ve relativ olarak inerttirler. Agaroz matrikslere örnek olarak, Sepharose (Pharmacia) ve Bio-gel A (Bio-Rad) gibi ticari isimli ürünleri verilebilir.

HPLC uygulaması için silika desteklere, İMA jellerinin bağlanması ile ilgili çalışmalarda yapılmış ve bu yüksek performans destekler ile proteinleri ayırmak için,

hidrofobik olarak kaplanmış silikaya İDA şelatları bağlanmıştır (El-Rassi ve Horvath, 1986).

Kato ve arkadaşları, organik polimerlerin yüksek performans matrisleriyle de çalışmalar yapıp, 1000 Å luk geniş gözenekli ve 10µm lik küçük partikül boyutuna sahip hidrofilik kaplanmış bir reçine olan TSK-gel G500 PW üzerine İDA' yı immobilize ederek HP-İMAK için yeni bir destek geliştirmişlerdir (Kato ve ark., 1986).

Sentetik polimer ve silika bazlı yüksek performans materyalleri, agaroz ve dekstranlara nazaran daha büyük avantajlara sahiptirler. Bu materyaller, daha iyi bir mekanik dayanıklılığa, sağlam bir şekil ve yapıya, ve kullanım süresince çok küçük hacimsel değişim özelliklerine sahiptirler. Bu yüksek performans materyallerinin bazı dezavantajlarını, silika bazlı destekler ile düşük ve yüksek pH' da silanol oluşması ve TSK reçinelerindeki İDA ile immobilize metal arasında daha zayıf bağların oluşması olarak sıralanabilir. Kolon, nötral pH' da glisin veya birincil aminleri içeren tamponlar ile yıkandığı zaman, TSK-jel şelat SPW' den gelen immobilize metal iyonlarının sızdığı tespit edilmiş ve bu yüzden birincil aminleri içeren tamponlardan sakınılarak, pH 6.5 ile 8.0 arasında 50 mM fosfat tamponunda imidazol derişimini düşürülerek metal sızması önlemiştir (Belew and Porath, 1990 ).

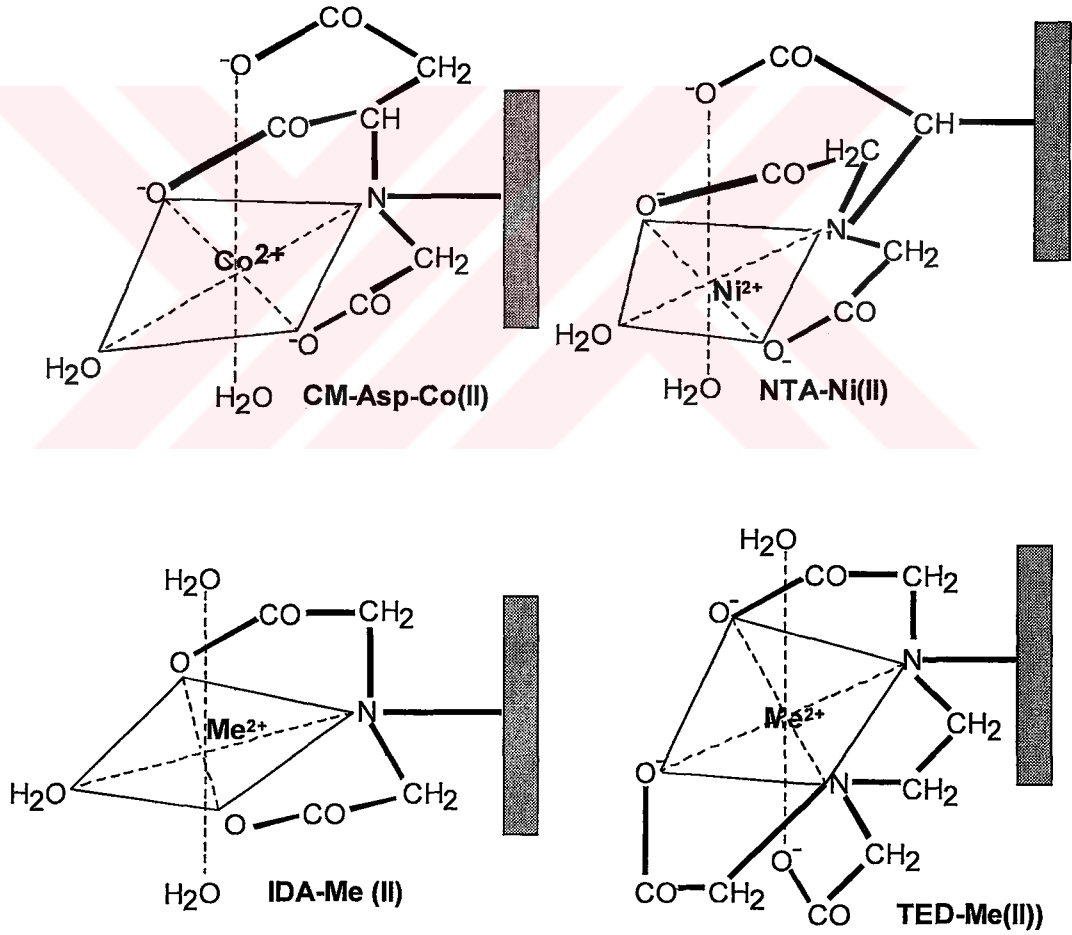
#### 1.1.2.2. İMAK' da şelat oluşturucu ligandlar

Sulu bir ortamda metal iyonları, su molekülleri tarafından çevrilererek çözünür. Metal iyonu bir Lewis asiti, su ise Lewis bazı gibi davranır. Su daha güçlü bir baz ile yer değiştirdiği zaman, bir koordinasyon kompleksi oluşur. Azottaki elektronlardan dolayı amonyak gibi bir baz, bir metal kompleks ile sonuçlanan tek dişli bir ligant oluşturabilir.

Bir liganta metal iyonunun bağlanması, bir metal komplekse nazaran metal şelatla daha güçlüdür. Bir metal şelatın daha büyük olan dayanıklılığı, çok dişli liganttan halka oluşumu ile üretilen serbest enerjinin kaybı ile artar. Bu termodinamik dayanıklılık şelat etkisi olarak adlandırılır. Aynı tek dişli ligantlarla oluşan benzer metal komplekslere kıyasla, şelatın daha düşük serbest enerji kapasitesi,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  için hem entalpi hem de entropideki değişimlerden artar. Beş veya altı üyeli küçük halka oluşumu için, uygun metal kompleksinden gelen metal şelat oluşumundan dolayı entropideki artma, daha düşük enerji kapasitesi için baskın bir şekilde yardım eder. Büyük halka oluşumu için entropideki artmadan gelen küçük yardım ile kompleks üzerindeki metal şelatın entalpisindeki artma, büyük itici güçtür. Entalpi değişimine neden olan kuvvetlerin bazıları orbital çakışması,

ligant alan etkileri, kompleksteki ligantlar arasında statik ve elektrostatik itmeler ve şelatdaki halka oluşumundan ortaya çıkan kulomb etkileşimleridir. Halka oluşumu ile koordine olmuş metal iyonları ve ligantlardan salınan çözücü moleküllerinin sayı ve büyüklüğü ile kombinasyondaki şelat halkasının sayı, dağılım ve büyüklüğü, şelat enerjisi için entropik katkıda bulunur(Gaberc-Porekar ve Menart, 2001).

İMAK'de metal iyonlarının immobilizasyonu için genellikle kullanılan şelatlayıcı ligant, iminodiasetik asit (IDA) dır. IDA'nın dışında İMAK' de Nitrilotriasetikasit (NTA) ve Karboksi metillenmiş aspartik asit (cM-Asp) , Tris (karboksimetil)etilen diamin (TED) gibi şelat oluşturucu ligantlarda kullanılmaktadır (Şekil 1.4) (Gaberc-Porekar ve Menart, 2001; Ueda ve ark, 2003).

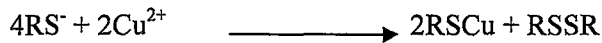


Şekil 1.4. İMAK'taki şelatlayıcı ligantlar

### 1.1.2.3. Serbest çözültide ve immobilize formdaki amino asit metal etkileşimleri

Amino asitler çözültideki pek çok metal iyonu ile dayanıklı sürekli şelat halkalarını oluştururlar (Hansen ve Lindeberg 1995; Williams, 1971). Amino asitlerin genel yapısı  $\alpha$  amino ve karboksil grubundan ibaret olan  $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COO}^-$  yapısında olup, her iki grup da şelat oluşumuna katılır. Bazı amino asitler yan R zincirinde bulunan ve kompleks oluşturmada  $\alpha$ -amino ve karboksil gruplarıyla yarışan, etkili verici atomlara sahiptir. Amino asitlerin  $\text{NH}_2$  ve  $\text{COO}^-$  olmak üzere iki verici atom grubu vardır. Amino asitler hem metal-karboksilat tuzu hem de amin-metal gruplarıyla kompleks oluştururlar veya her ikisiyle birlikte beş üyeli halka oluştururlar.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  gibi iyonlar amino asitlerin imidazol, tiyol ve indol fonksiyonel gruplarını hedef alır. Bu sınır metal iyonları şelat halkası oluşturmayı tercih ederken,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  gibi daha kuvvetli metal iyonları karboksilat anyonlarıyla tuz oluştururlar. Eğer amino asitin R yan grubu arjinin ve glutamin gibi pozitif yüklü ise, oluşacak kompleks, pozitif yüklü metal ile itici etkileşimden dolayı daha az dayanıklı olur. Eğer yan grup aspartat ve glutamat gibi negatif yüklü olursa, ekstra yük, metal ile güçlü dayanıklı bir kompleks vermek üzere dimerizasyon yapar.

Histidin ve sistein, reaktif yan gruplara sahiptirler ve güçlü kompleks ajanları oluştururlar. Histidin, 5, 6 ve 7 üyeli halkaları da kapsayan dört farklı yolla kompleks oluşturabilir. Histidin, karboksilat ve  $\alpha$ -amino gruplarını içine alan 5 üyeli halka,  $\alpha$ -amino ve imidazol gruplarını içine alan 6 üyeli halka veya karboksilat ve imidazol grupları 7 üyeli bir halka aracılığıyla bir metal iyonu ile birleşebilir ayrıca, bir metal iyonu ile histidinin bütün verici gruplarının birleştiği bir yapıyı da oluşturabilirler. Oluşan yapı pH'nın bir fonksiyonudur (Hansen ve Lindeberg 1995). Sistein, yan grubundaki bir kükürt atomundan dolayı diğer, amino asitlerden daha kuvvetli bir şekilde asitlerle birleşir. Bakır iyonu ile oluşan bir redoks tepkimesi, kolaylıkla sisteini sistine yükseltir.



$\alpha$ -amino asitlerin tutunma davranışı silika bazlı jele bağlanmış metal yüklü IDA ve çıplak IDA ile karşılaştırıldığında,  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-silikanın bütün  $\alpha$ -amino asitleri tuttuğunu ve tutunmanın pH 6'da daha yüksek olduğunu bulunmuş ve  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA kolonlarındaki  $\alpha$ -amino asitlerin tutunma süreleri ve serbest çözültideki  $\text{Cu}^{2+}$  ile amino asitten elde edilen komplekslerin denge sabitleri karşılaştırılmıştır.

Serbest çözültide en güçlü kompleksleri oluşturan,  $\alpha$ -amino asitlerden olan histidin ve sistein,  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA kolonlarında daha güçlü bir şekilde tutunmaktadır (El-Rassi ve Horvath, 1986)

#### 1.1.2.4. Serbest çözültide ve immobilize formdaki protein-metal etkileşimleri

Serbest çözültideki protein-metal iyonu etkileşimlerinde göz önünde bulundurulacak olan birkaç faktör vardır (Williams, 1971). Karboksil, imidazol ve sülfhidril gibi yan zincir grupları, terminal amino ve karboksil gruplarına metal iyonu bağlamada daha etkindir. Ligant grupları üzerindeki yükler, metal iyonu ile bağlanma afinitesine etki eder. Metal iyonları için bağlanma sabitleri pH'nın düşmesiyle azalır, çünkü:  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}^-$  ve  $-\text{COO}^-$  gibi ligantlara 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.

Çözültideki doğal bir proteinin üçüncül yapısı, protein üzerindeki fonksiyonel ligantların bir metal iyonuna yaklaşmasını engeller. Proteinler pek çok ligant 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 ligant grupları, bir metal iyonu ile yapılan şelat oluşturmada düzenleyici rol oynar. Diğer proteinlerde ligant 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 (Gaberç-Porekar ve Menart, 2001).

İMAK kolonlarına protein bağlanması, değişik tuz derişimlerinde  $\text{Ni}^{2+}$  yüklü kolonlar kullanılmasıyla nitel olarak da çalışılmış ve peptid bağlanmasının pH yükselmesiyle arttığı bulunmuştur (Hemdan ve Porath, 1985).

Metalin amino asite bağlanma gücü, ligant ile metalin orbital çakışmasına bağlıdır. Metal iyonu ile protein arasında koordine kovalent bağ oluşturarak meydana gelen etkileşimleri, Porath ve Belew, üç grupta karakterize etmişlerdir; bunlar: Yük kontrollü iyonik adsorpsiyon (iyon paylaşma), koordine bağ oluşumu (elektronca zengin ligant ile metalin koordinasyonu) ve kovalent bağ oluşumudur (iki sülfhidril grubunun bağlanması)( Belew ve Porath, 1990; Porath, 1993).

### 1.1.3.İMAK'ta peptit ve proteinlerin adsorpsiyon-desorpsiyon mekanizmaları

İMAK' ta proteinlerin metal iyonlarına bağlanmasının elektronca zengin ligantların, metal komplekslerindeki, su gibi zayıf bağlı ligantlarla yer değiştirmesiyle gerçekleştiğine inanılmaktadır. İMAK' de alıkonma davranışının açıkta olan histidin, triptofan ve sistein merkezlerinin yüzey yoğunluğuyla kontrol edildiğini öne sürülmüştür (Porath ve Olin, 1983). 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 yöntemdir. Protein yüzeyindeki elektron verici grubun protonlanması, koordinasyonu tersine çevirerek proteinin ayrılmasını sağlar.

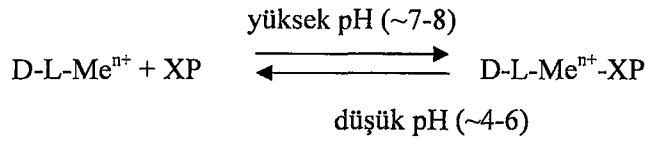
Bakır, çinko, kobalt veya nikel gibi sınır Lewis asitleri kullanıldığında, adsorpsiyon, yüksek tuz derişiminde gerçekleşir. Adsorpsiyon kapasitesi ve seçimliliği tampondaki tuz derişimi arttıkça artar. Tuz derişimini azaltmak, bazı proteinler için desorpsiyona neden olabilir (Ljungquist ve ark, 1989; Grisshammer ve Tucker,1997). Elektrolitlerin tutunma üzerindeki etkisi, metal iyonlarının solvate olmuş su moleküllerine ilgisiyle bağlantılıdır. Metal iyonlarıyla su molekülleri arasındaki çekim gücünün, tuz tarafından zayıflatılması, adsorpsiyon yöntemini kolaylaştırır. İyonik şiddet arttıkça adsorpsiyon seçiciliği arttığına göre, proteinlerin kısmi ve seçimli elusyonu, eluentteki tuz derişimini azaltarak gerçekleştirilebilmelidir.

Bununla birlikte çeşitli proteinlerin adsorpsiyonu ve elusyonu  $Fe^{3+}$  gibi kuvvetli bir Lewis asidinin, bir IDA kolonuna immobilizasyonu ve NaCl derişiminin 0' dan 1M' a kadar arttırılmasıyla gerçekleştirilir (Grisshammer ve Tucker,1997).



### 1.1.3.1. pH etkisi

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. Özgül olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak için, pH tamponuna bir tuz katılır. Fosfat ve asetat tamponları yaygın olarak kullanılır. "Tepkime" şöyle gösterilebilir:



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

pH, alıkonma ve elusyon proseslerinde karışık 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 (Wong ve ark, 1991).

IDA- $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose matriksi üzerinde sığır serum albumin (BSA) adsorpsiyonu çeşitli pH' larda çalışılmış ve BSA alıkonması, pH 7.0'de en yüksek iken, pH 6.0'da ihmal edilebilir düzeyde olduğu ve bununda erken elusyona sebep olduğu bulunmuştur (Sulkowski,1996).

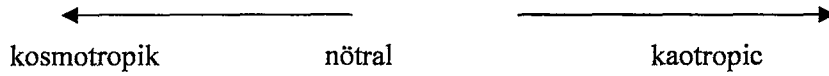
### 1.1.3.2. Tuz etkisi

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 (Wong ve ark, 1991).

İMAK' de 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 kosmotropik tuzlar kullanılır. Pek çok araştırmacı, yüksek kosmotropik tuz derişiminde, çıplak IDA kolonlarında protein alıkonmasının, spesifik olmayan etkileşimlerin (kısmen hidrofobik etkileşmeler) rolünü gösterdiğini gözlemiştir (Sulkowski,1985). Tuzlar, proteinleri sulu çözeltilerinden çöktürme yeteneklerine göre bir İyotropic veya Hofmeister serisi şeklinde düzenlenebilir.

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



soyum< magnezyum< kalsiyum, baryum< manganez, nikel

Kosmotropik tuzlar, denature proteinlerin yeniden doğal yapılarına dönme oranını artırır ve protein denaturasyonunun hassasiyetini azaltır. Bu tuzlar proteinin yüklü gruplarıyla direk etkileşmezler ve protein yüzeyinden ayrı dururlar. Çözücüye kosmotropik tuzların katılması proteinin hidrofobik etkileşmelerini artırır. Polar olmayan grupların, bir proteinin sulu çözeltilisine etkimesi su moleküllerinin bu gruplar etrafında düzenli bir yapı almasına, ve böylece istenmeyen bir şekilde, sistemin entropisinin düşmesine neden olur. Kosmotropik tuzun eklenmesi suyun daha da farklı bir yapı almasına neden olabilir. Su molekülleri bu tuzların etrafında sıkı bir hidrasyon küresi oluşturur ve proteinin apolar grupları çevresinde daha fazla su toplanır.

Hidrofobik etkileşmeler, yalnızca proteinin kararlılığına katkıda bulunmaz, aynı zamanda kromatografik matriks yüzeyine adsorpsiyonu destekler. Kosmotropik tuz-destekli adsorpsiyon; proteinin, çözeltilerinden matriks yüzeyine 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 (Ueda ve ark, 2003).



### 1.1.3.3. Yarışmalı ajanlar

Seçici desorpsiyon yapmanın diğer yaygın bir yöntemi, 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 derişimlerde (50mM) imidozol veya histidin içeren seçici gradientin kullanılması, bağlanmış proteinleri yerinden çıkarmak için etkin bir yöntemdir.

İmmobilize proteinlerin elusyonundaki son çare, immobilize şelat oluşturmuş metal komplekslerini düşük pH larda bozmak ya da histidin eklemek veya EDTA gibi güçlü bir şelatlayıcı ajan eklemektir. Şelatlar oluşturmuş metalin ortama salınması proteinleri elue eder, fakat kolon subsratının etkinliğini tahrip eder ve eluentdeki proteini denature edebilir (Ueda ve ark, 2003).

### 1.1.4. İMAK 'ta proteinlerin alıkonma davranışları

Proteinlerin tutunma davranışları eluentin değişen pH değerine ve sabit fazdaki metallerin şelatlaşmasına bağlı olarak değişmektedir.

İMAK'taki tutunma sürecinin fizikokimyasal özellikleri tam olarak anlaşılmış değildir. İmmobilize metal iyonuna protein bağlanmasının, elektron verici atomları vasıtası ile bu metallere koordine olabilen triptofan, sistein ve histidin yan zincirlerinden dolayı arttığına dair güçlü kanıtlar vardır. İmmobilize bir metal ile bir protein içindeki amino asit uzantısı arasındaki etkileşim, sadece bu amino asitin durgun fazdaki metal şelatın fonksiyonel gruplarına ulaşabilmesi ile mümkündür. Bu konu, değişik histidin, triptofan ve sistein içeriğine sahip birkaç proteinin alıkonma davranışlarını inceleyen Sulkowski tarafından tartışılmıştır (Sulkowski, 1996A, 1996B). Bir dizi homolog proteinin gözlenen alıkonma davranışlarının, yüzey ile temasta bulunan histidin sayısının artması ile arttığı belirlenmiştir. Bir proteindeki histidin merkezlerinin sayısı ile proteinlerin kolon alıkonma davranışları tahmin edilebilir. Yüzeyde bulunan bir veya daha fazla sayıdaki histidin merkezleri genellikle alıkonmanın artmasına neden olduğu halde, protein yüzeyindeki histidin merkezlerinin yetersizliği genellikle alıkonmanın yetersizliği ile ilişkilendirilir.

Sulkowski, İMAK ile özel bir proteini ayırmak istendiğinde hangi metallerin kullanılacağını da tanımlamıştır. Kabaca, bir protein  $Ni^{2+}$ -IDA kolonunda tutunması için en

az iki histidin merkezine ihtiyaç duyar. Oysa  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlanmış metal kullanıldığında sadece bir merkezin olması yeterlidir.

Protein veya peptidin amino asit kompozisyonu bilindiğinde, hangi çeşit metal iyonlarının İMAK'da alıkonmaya neden olacağı Tablo 1.3'deki kurallar kullanılarak bulunabilir. İMAK'da protein adsorpsiyonunda yer alan başlıca amino asitlerin alıkonma kuvveti Tablo 1.4 'de gösterilmiştir (Ueda ve ark, 2003).

**Tablo1.3.** Protein yüzeyindeki uygun histidin ve triptofan uzantılarına dayanan protein metal afinite tahminleri

Protein yüzeyindeki Histidin ve Triptofan uzantıları	Adsorbsiyona neden olan Metal İyonu
His/Trp yoksa	-----
Bir His	$\text{Cu}^{2+}$
Birden fazla His	$\text{Cu}^{2+}$ (kuvvetli ads.), $\text{Ni}^{2+}$
Bir küme His	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
Birkaç Trp varsa, His yoksa	$\text{Cu}^{2+}$

**Tablo 1.4.** Protein alıkonmasında yer alan amino asitlerin bireysel dağılımı

Fonksiyonel grup	Alıkonma kuvveti
Histidin	++++
Sistein <sup>a</sup>	++++
Aspartik asit, glutamik asit	-
Lizin, arjinin	+
Triptofan, tirozin, fenilalanin	+
N-Terminal	+

<sup>a</sup>sistein indirgenmiş formda

İMAK'ın bir protein molekülündeki histidin kalıntısının topografyası için bir prob olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Hemdan ve Porath,1985). Tiredoksin, ubikuitin, kalmodulin, lizozim, sitokrom c ve miyogloblin gibi model proteinlerin immobilize geçiş metal matriksleri ile etkileşiminin değerlendirilmesi, proteinlerdeki histidin merkezlerinin yoğunluğunun yüzey lokalizasyonunun ve çokluluğunun alıkonmaya nasıl etki ettiği konusunda bilgi sağlamaktadır.

Bir proteindeki tüm histidin merkezleri aynı değildir. Tek bir histidin kalıntısı içeren, model proteinlerin afinitelerini içeren çalışmalar, İMAK'da adsorbentlerine ulaşabilirliğin alıkonma için önemli bir kriter olduğunu göstermiştir.  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA sefroz kolonunda elusyon sıralaması, tek histidin taşıyan protein serileri için, tiredoksin (*Escherichia coli*), sitokrom c (at), kalmodulin (sığır), ubikuitin (sığır) ve lizozim (tavuk) şeklindedir. Lizozim gibi daha güçlü bağlı proteinlerin elusyonu için, 7.0 den 6.0 ve 5.0 e doğru azalan bir pH gradienti gerekir. İMAK kolonunun lizozime daha güçlü afinite göstermesi yapıdaki His-15 ilaveten 62. ve 123'üncü pozisyonlarda bulunan triptofanın varlığı ile açıklanır. Diğer proteinler, bağlanmalarına katkıda bulunan, dış ortamla etkileşebilen histidin uzantılarına sahiptir. Bu proteinlerdeki tutunma sırası ise histidin gruplarının pK değerlerindeki farklara dayandırılmaktadır. Histidin gruplarının bağlanma potansiyeli, sitokrom c ( His-33, pK 6.5), kalmodulin (His-107, pK 6.1), ve lizozim (His-15, pK 5,2) sıralamasında belirtildiği gibi pK değerinin azalması ile artar. Bu model, histidin gruplarının protonlanmamış  $\text{Me}^{n+}$ -IDA ile, daha güçlü koordine olduğu teorisinden hareketle uygulanır. Bir protein molekülü içinde uygun bir şekilde konumlanmış bir histidin grubunun alıkonmada daha başarılı olduğu görünür.

His-trp, his-tyr-NH<sub>2</sub> ve his-gly-his dizinlerine sahip olan peptitlerin,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  immobilize IDA-sefades kolonlar için yüksek afiniteye sahip oldukları gösterilmiştir (Smith ve ark, 1988). His-trp dizinlerden birini içeren şelatlı peptit ve genetik olarak düzenlenmiş proinsülin,  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA sefades kolonunda önemli derecede tutunma göstermektedir (Ljungquist ve ark, 1989).

### 1.1.5. İMAK'ın protein saflaştırılmasında ve diğer bazı uygulamalarda kullanımı

İMAK genellikle protein yapısını karakterize etmede veya çözeltideki diğer bileşenlerden histidin içeren proteinleri ayırmada kullanılır (Sulkowski, 1985).

İMAK genetik olarak düzenlenmiş proteinlerin saflaştırılmasında etkindir. 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 geliştirilmiştir (ŞP-İMAK) Rekombinant peptitlerin  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  yüklü İDA-İMAK kolonlarına karşı yüksek afinite gösterdiklerini saptanmıştır. Şelat oluşturucu peptit, ilgili proteini şelat oluşturucu peptidi içeren, birbirinin içine dağılmış bir proteinin, NH<sub>2</sub> terminal ucuna klonlanabilir. Daha sonra şelat oluşturucu peptit, ayırma teknikleri kullanılarak ortamdan 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 (Smith ve arkadaşları, 1988).

Hochuli ve arkadaşları (1988), polihistidin şelatlı peptit ve fare dihidrofolat redüktaz dan oluşan bir protein karışımı ve  $Ni^{2+}$ -NTA adsorbent ile benzer yaklaşımı araştırdılar. Polihistidin peptidi, amino veya karboksil terminaline bağlı üç ile altı arasında ki histidin kalıntılarından oluşmaktadır. Onlar bu yaklaşım ile,  $Ni^{2+}$ -NTA dolgulı kolonunda, birbiri içinde bulunan proteinler için etkili bir saflaştırma elde etmişlerdir. Bu sonuçlar, karboksil ucuna bağlı iki histidin ve karboksil veya amino ucuna bağlı altı histidinin, tercihi şelat oluşturucu peptitler olduğunu göstermektedir. Karboksipeptidaz A, protein uçlarından şelat oluşturucu peptidi uzaklaştırmak için kullanılıyordu.

Al-Mashikhi ve Nakai (1988) kan serumundan ve kan plazmasından proteinleri ayırmak için  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  yüklü IDA-BGE sefaroze 613/sefakril S-300 kolonlarını kullanmışlardır. Farklı metalleri taşıyan dolgular, immunoglobulin ve transferin saflaştırılmasında karşılaştırılmışlardır. Ayrılan proteinlerin immunokimyasal analizleri, biyolojik aktivitelerinde kayıp olmadığını göstermiştir.  $Cu^{2+}$  yüklü kolonlar, en yüksek IgG aktivitesi (>%95) veren ve en ılımlı koşullarda kullanılan kolonlardır.

Histidin amino asiti 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. Bir başka çalışmada, peynir suyundan gelen immunoglobulin ve laktoferrinin ayrılmasında benzer şekilde modifiye edilmiş histidin guruplarını İMAK' a uygulanmıştır (Al-Mashikhi ve ark, 1988). 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 amino asitlerin (büyük olasılıkla sistein) etkileşimini ileri sürmektedir.

Wunderwald ve arkadaşları (1982), aktif endoproteinazları, biyolojik sıvılardan uzaklaştırmak için,  $\alpha_2$ -makroglobulinin,  $Zn^{2+}$ -bis-karboksimetil-amino sefaroza immobilize edilmesini içeren yeni bir yöntem tanımlamışlardır.

El-Rassi ve arkadaşları (1986) ise, konkanavalin A' yı (Con-A)  $Cu^{2+}$ -İDA ile silika destek üzerine immobilize etmişlerdir. Con A' nın İMAK kolonuna kuvvetli bir şekilde bağlandığı ve ancak pH yı düşürerek veya nötral pH da EDTA eklenmesiyle

uzaklaştırılabildiği gözlenmiştir. Con A-Cu<sup>2+</sup>-İDA kolonları, çeşitli proteinlerin saflaştırılması ve ayrılması için, ayrıca çeşitli glikoproteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Yapılan diğer bir çalışma konusu ise, proteinlerin küçük veya büyük ölçekte saflaştırılmasında hayati olabilecek kromatografik parametrelerin, nicel olarak saptanması üzerinedir (Belew ve ark, 1987A). Nicel veriler, küçük ölçek ayırma sistemlerinin dizaynında önemlidir. Belew ve arkadaşları, beş model proteinin, Chelating Sepharose Fast Flow ve TSK-gel Chelate 5PW sorbentleri üzerindeki etkileşimlerini incelemişler, adsorpsiyon izotermeleri kullanarak, bu sorbentler için, sorbentlerin afinite sabitlerini ve kapasitelerini saptamışlardır (Belew ve ark, 1987B). Sorbentlerin, protein için afinitesi arttıkça, adsorpsiyon kapasitelerinin düştüğünü gözlediler. Bu olay, proteinlerin adsorpsiyon yüzeyine çok noktadan bağlanması ve adsorpsiyon sonucu proteinlerin konformasyonunda meydana gelen değişimlerden kaynaklanıyor olabilir şeklinde açıklamışlardır.

İMAK'ın diğer bazı uygulamaları ise, laboratuvar düzeyinde özellikle bilimsel veya araştırma çalışmaları için gün geçtikçe daha popüler olmaktadır. Piyasada histidin kodlayan baz dizilimleri içeren ticari klonlama vektörleri elde edilebildiği gibi, histidin işaretli proteinlerin spesifik belirlenmesi için antibadiler de elde edilebilmektedir (Lindner ve ark, 1997).

İMAK, Ni-NTA şelat reçinesi ile seçici adsorpsiyona aracılık eden 6 tane ardarda gelen 6-histaminil purinli bir afinite etiketini kullanarak DNA gibi protein içermeyen moleküllerin de saflaştırılmasında kullanılabilir. Bazlar üzerindeki girişim yapabilen azotlardan dolayı RNA ve oligonükleotidler, İMAK matriksine sıkıca bağlanırken, doğal DNA, İMAK matriksine zayıfça bağlanır (Murphy ve ark, 2000).

#### 1.1.6. İMAK'ın Bazı Avantajları

Tablo 1.5'de görüldüğü gibi İMAK, afinite kromatografisi teknikniği ile karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptir.

**Tablo 1.5.** İMAK ve standart afinite kromatografisinin karşılaştırılması

Özellik	Metal	Afinite
<b>Biyospesifik/biyoafinite</b>		
Ligand kararlılığı	yüksek	düşük
Protein doldurma	yüksek	düşük
Elusyon koşulları	yumuşak	genellikle aşırı
Kolon rejenerasyonundan sonra ligand kazanımı	tam	genellikle tam değil
Seçicilik	düşük ortam	yüksek
Ücret	düşük	yüksek

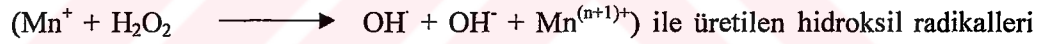
İMAK, aşağıdaki bazı önemli özelliklere sahiptir (Ueda ve ark, 2003):

- İMAK tek basamaklı saflaştırma sağlar
- Diğer afinite kromatografik tekniklere kıyasla protein doldurma kapasitesi oldukça yüksektir (0,1-10  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  jel)
  - EDTA (etilen daimin tetra asetik asit) veya EGTA (etilen glikol bis-( $\beta$  aminoetil eter)N,N,N',N'-Tetra asetik asit) gibi kuvvetli şelatlayıcı ajanlarla, metal iyonları reçineden kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Böylece, aynı şelatlayıcı reçineyi kullanarak, ilgili proteinin ayrılmasında en iyi ligandı saptamak için, farklı metal iyonları test edilebilir.
- İMAK'ın endüstriyel kullanımı oldukça kolaydır ve endüstriyel uygulamada tekrar üretilebilir.
- İMAK, seyreltik protein çözeltilerinin deriştirilmesinde kullanılır.
- İMAK, karışık bileşenler veya yüksek iyonik kuvvet içeren birçok sayıda tampona uygundur.
- İMAK, genelde protein yapısını etkilemez. Birkaç durumda metalloenzimlerin kendi asıl metal iyon sıyırmasına sahip olduğu rapor edilmiştir. Cu(II)-IDA kolonunda İMAK'ta proteinin zarara uğradığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir, fakat bu zarar; Cu(II) tarafından katalizlenen oksidatif proteolizin sebep olduğu indirgeyici ajanlar tarafından başlatılır.
  - Yüklü olmayan kolon boyunca çözeltiler geçici olarak sterile edilir, bakteriyel gelişmeye hazır bütün metal iyonları şelatlamayla uzaklaştırılır.
  - Bir İMAK reçinesi, kromatografik özelliğini kaybetmeden birkaç yüz kere rejenere edilebilir.

### 1.1.7. İMAK'ın Bazı Dezavatajları

#### 1.1.7.1. Kolon İçindeki Olası 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 tepkimelerine karşı hassastırlar. Dikkat edilmelidir ki, Cu(II) iyonları gibi metal şelatlar, proteinlerin belirli bölgelerinin ayrılmasında kullanılabilir. Proteinlerin temel yapılarının bozulması ve amino asit yan zincirlerinin tahribi beklenen bir durumdur. 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. Rutin İMAK ayırmalarının çoğu, örnek veya tamponda çözünen oksijenden dolayı aerobik ortamda yani hafifçe oksidatif şartlarda yürütülür. İMAK kolonunda metal katalizli tepkimeler veya reaktif oksijen türevinin proteinler üzerindeki potansiyel tahribatı bugüne kadar yeterince çalışılmamıştır. Hidrojen peroksit veya askorbat veya özellikle bu kombinasyonun ikisi birlikte elüsyon tamponuna ilave edildiği zaman, Cu(II)-İDA kolonlarında protein aktivitesinde önemli bir kayıp gözlenmiştir (Krishnamurthy ve ark, 1995). Bu olay, Fenton tepkimesi;



tepkimelerine dayandırıldı. Kısa model peptidler ile yapılan deneyler, histidinin bu tür tepkime tipleri ile çabucak etkileştiğini göstermiştir (Khosravi ve Borchardt, 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, virtüs 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  $\beta$ -merkptoethanol ( $\beta$ -ME) veya dithiotreitöl (DTT) gibi indirgeyici ajanlar ilave edilir (Leo ve ark, C.,1996).



### 1.1.7.2. Metal Toksisitesi

Her İMAK kolonunda metal iyonları sızması, elusyonun tarzına ve şelatlayıcı ajanın türüne bağlı olarak meydana gelir. Ni-NTA veya TALON gibi dört dişli şelatlayıcı ajanlar, üç dişlilere nazaran daha üstündür. Ni-NTA sızması 1 ppm gibi çok küçük bir değerdedir (Schäfer ve ark, 2000). Bunun yanında Ni-NTA agarozu kullanma, His6-işaretli restrüksiyon endonükleaz Eco-RV'ın 1 molü başına 2 mol Ni(II) kontaminasyonunu göstermektedir (Oswald ve ark, 1997).

Ni(II) bileşiklerinin kanserojen olduğu düşünülmektedir (Bal, ve ark, 2000 ). 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, histidin bir metal bağlayıcı bölge olarak hareket ettiğini göstermekte ve buda Ni(II) toksisitesinden sorumludur (Zoroddu ve ark, 2000).

### 1.1.8. Mikroküreler Ve Kullanım Alanları

Mikroküreler birkaç mikrondan milimetre boyutlarına kadar değişik çap ve boy dağılımlarında, gözenekli veya gözeneksiz farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen mikropartiküllerdir. Mikroküre kullanım alanlarını ;

- Ayırma işlemleri
- Biyoafinite kromatografisinde taşıyıcı
- Biyolojik etkinliğe sahip maddelerin immobilizasyonu
- Hücre kültürlerinde taşıyıcı
- Kolon kromatografisinde kolon dolgu maddesi

şeklinde sıralamak mümkündür.

Manyetik partiküller bir çok ayırma işlemlerinde az kirlilik, iyi kütle aktarımı ve az aşınma göstermesi vb kolaylıkları yanında bir çok araştırmada basınç düşmesi, substrat dönüşümü ve enzim kararlılığı için daha iyi bir performans göstermesi nedeniyle akışkan yatak reaktörlerde kullanılmaktadır. Diğer ayırma işlemlerinde yer alacak olan santrifüjleme ve filtrasyon birimleri enzimin veya proteinlerin üçüncül yapısını bozarak aktivitesinde düşüşe neden olurken bu tür partiküllerin kullanımı ile sorun ortadan kalkmakta ve işletme maliyeti azalmaktadır. Manyetik partiküllerin kullanıldığı akışkan yatak reaktörler; atık suların arıtımında, enzim tutuklanmasında, afinite ayırımında önemli rol oynamaktadır (Cocker ve ark, 1997; Tong ve ark., 2001).



### 1.1.9. Manyetik Partiküller

Manyetik partiküller; asıltı katıları içeren sıvılardan seçici olarak uzaklaştırılması, manyetik ayırma ile kolay toplanılması ve gözeneksiz olduklarından az kirlilik, iyi kütle transferi ve az aşınma göstermesi gibi bir çok avantaja sahiptir.

L-asparajinaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzimlerinin *Escherichia coli* hücre protoplazmasından saflaştırılmasında (Dunnill ve Lilly, 1974) ve karaciğerden alkol dehidrogenaz enziminin kazanımı için bu tür manyetik partiküller kullanılmıştır (Mosbach ve Andersson, 1977). Küçük ölçekli uygulamalarda kullanılan manyetik partiküller, katalizin geri kazanımı için hem hızlı hem de kolay kazanım sağlamaktadır. Diğer taşıyıcı partiküller için işlem bir çok basamak gerektirdiğinden geniş ölçekli endüstriyel uygulamalarda enerji ve verimlilik açısından manyetik ayırma tercih edilebilir. Munro ve arkadaşları, 1977 yılında gözeneksiz manyetik partiküllerin ortama aktardığı kirliliği araştırmak için nikel-kimotripsin partiküllerini soğuk süt ortamında 48 saat tutarak aktivite tayini yapmışlardır. Sonuçta ciddi bir kirlilik oluşturan selüloz desteklere göre aktivite de çok az bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca çalışma ferrit-laktaz katalizi kullanılarak tekrarlanmış ve aynı şekilde aktivite de çok az bir düşüş kaydedilmiştir.

### 1.2. Sitokrom c

Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup, hemoglobinin hem halkasına benzer şekilde porfirin halkasına bağlı demir atomu içerir. Sitokromlardaki demir atomları  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye geri dönüşümlü olarak değiştirebilen tek elektron taşıyıcılarıdır (Şekil 1.5) (Bowden ve Hawkridge, 1984; Funk ve ark, 1990; Caffrey ve ark, 1991).

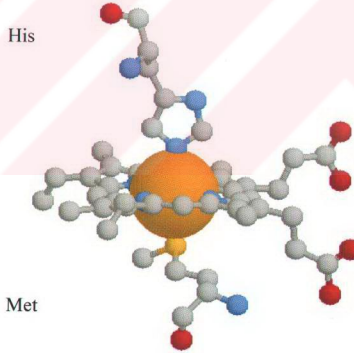
Mitokondriyel sitokrom c en sık çalışılan elektron taşıyıcı proteindir. Örneğin, sitokrom c amino asit dizilişi: insan, şempanze, maymun, at, eşek, zebra, inek, domuz, koyun, deve, balina, fil, ayıbalığı, köpek, su aygırı, yarası, tavşan, kurbağa, deniz yıldızı ve meyve kurtlarını içeren organizmalar için ortaya konmuştur. Sitokrom c, sudaki çözünürlüğünden dolayı, mitokondriyal çevreden kolayca ayrılabilir. Dahası, sitokrom c iç membran alanında zayıf bir şekilde tutunur. Sitokrom c, pahalı olmasına rağmen, saf ve doğal halde hazır olarak bulunur. Birkaç kaynaktan sağlanan mitokondriyal sitokrom c'nin kristal yapısı atomik resolusyonda hesaplanmıştır. Sitokrom c'nin fizikokimyasal

özelliklerinin açıklanması konformasyonel bilgilerle kolaylaştırılmıştır (Bowden ve Hawkrige, 1984; Funk ve ark, 1990).

Sitokrom c (mol kütlesi 12,400) 104 amino asit uzantısından oluşan tekli polipeptid zincirine sahiptir ve hem grubuna kovalent olarak bağlıdır ( Dickerson ve Timkovich, 1975; Senn ve Wuthrich, 1985; Machon ve ark, 1982; Raphael ve Gray, 1991 )  $34 \text{ \AA}$  çapla birlikte pürüzlü ve küreseldir.

Sitokrom c yapısı içindeki hem grubu hidrofobik yan zincirler tarafından sıkıca sarılmıştır. Hem grubu içindeki demir atomu metiyonin amino asidindeki sülfür atomuna ve histidin amino asidindeki azot atomuna bağlıdır (Şekil 1.5) (Smith ve ark, 1985).

Hem grubunun çevresindeki hidrofobik karakter sitokrom c'nin bu indirgenme potansiyelini aynı hem 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 hem grubundan elektron uzaklaştırmaktan daha zordur.

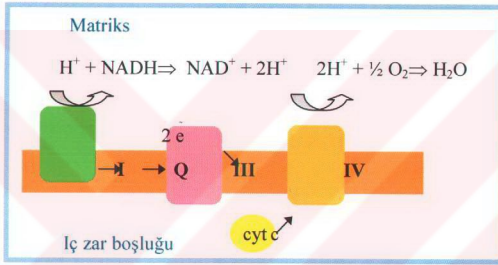


Şekil 1.5. Sitokrom c'nin yapısı

Sitokrom c molekülü çok az  $\alpha$ -sarmal yapıya sahiptir,  $\beta$ -tabakalı yapı içermez ve polipeptid zinciri hem grubu etrafında katlanmıştır. Sitokrom-c molekülünün 1 ve 47. konumları arasındaki kalıntılar hem grubunun histidin ile bağ yaptığı kısımda iken 48 ve 91. konumları arasındaki kalıntılar metiyonin ile bağ yaptığı kısımda yer alır. 92 ile 104.

konumlar arasındaki kalıntılar ise hem grubunun arkasındaki histidin ile bağ yaptığı kısımda bulunur (Smith ve ark, 1985).

Sitokrom c daha önce de değinildiği gibi elektron transferinde rol alan bir proteindir ve sitokrom redüktaz kompleksinden sitokrom oksidaz' a elektron taşır (Şekil 1.6). 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 grupları vardır. Böylece elektrostatik etkileşimler sayesinde sitokrom c elektron transferini gerçekleştirir (Roskoski Robert,1996).



Şekil 1.6. Sitokrom c'nin mitokondrideki yeri

İMAK'ta önemli nokta, şelatlayıcı grup ile bağ yapacak amino asidin, protein yüzeyinde yer almasıdır. Tablo 1.6'da tuna balığı, at ve maya'ya ait sitokrom c proteinlerinin amino asit dizilimleri verilmiştir. Burada görüldüğü gibi tuna balığı, at ve maya sitokrom c'leri farklı konumlarda ve farklı sayılarda histidin içermektedir. Fakat tuna balığında koordinasyona katılabilecek yüzey histidini bulunmazken, at'a ait sitokrom-c'de 33 numaralı konumda bir adet, mayada ise 33 ve 39 numaralı konumda iki adet yüzey histidini bulunmaktadır. Diğer histidinler protein yüzeyinde yer almadığı için koordinasyon yapamaz. Bu özelliğinden dolayı sitokrom c İMAK'da çalışma alanı oluşturmuştur. Sitokrom c'nin İMAK adsorbentleri çalışılmıştır (Emir ve ark, 2004).

**Tablo 1.6.** Tunabalığı, at ve maya sitokrom c'lerinin amino asit dizilimleri

Tür	Amino asit sırası			
	10	20	30	40
Tuna balığı	GDVAKGKKT	VQKCAQCHTV	ENGGKHVGP	NLWGLFGRKT
	GQAEGYSYTD	ANKSKGIVWN	ENTLMEYLEN	PKKYIPGKTM
	IFAGIKKKGE	RQDLVAYLKS	ATS	
At	GDVEKGKKIF	VQKCAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT
	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	PKKYIPGKTM
	IFAGIKKKTE	REDLIAYLKK	ATNE	
Maya	GSAKKGATLF	KTRCLQCHTV	EKGGPVKVGP	NLHGIFGRHS
	GQAEGYSYTD	ANIKKNVLWD	ENNMSEYLTN	PKKYIPGKTM
	AFGGLKKEKD	RNDLITYLLKK	ACE	

Proteinin histidin gruplarının çeşitliliği ile, İMAK kolonunda alınması arasındaki bir korelasyon da mevcuttur. Çoklu histidin gruplarının varlığı üç farklı sitokrom c de görüldüğü gibi daha güçlü tutunmaya neden olur. Ton balığı sitokrom c'si (dış ortamla etkileşen histidin yok), at sitokrom c'si (dış ortamla etkileşen bir histidin var), maya sitokrom c'si (dış ortamla etkileşen iki histidin var), 1.0 M sodyum klorür varlığında, pH'sı 7.0 olan 0.1 M sodyum asetat eşliğinde İDA-Cu<sup>2+</sup> sefroz kolona uygulanmış ve ton balığı sitokrom c, at sitokrom c ve maya sitokrom c sıralaması gözlenmiştir. pH gradientindeki 5'e doğru bir azalma ile at ve maya sitokrom c lerinin yer değiştirdiği gözlenmiştir. Ton balığı sitokrom c'si serbest sistein içermez, triptofanları (Trp-59 ve Trp-33) ve iki histidinden biri (his-18) molekülün hidrofobik merkezinde gizlidir. Diğer histidin ise komşu hidrofobik grupların çokluğu nedeni ile immobilize metal matrikse ulaşamaz. Maya sitokrom c'sinin daha güçlü tutunması proteinin yüksek sayıdaki çözütüye ulaşabilir histidin gruplarının varlığından kaynaklandığı söylenebilir.

Cu<sup>2+</sup> şelat dışındaki metal şelat içeren kolonlardaki proteinlerinin alınması sadece yapıdaki çoklu grupların varlığına değil aynı zamanda uygun yerleşmesine de bağlıdır. At ve maya sitokromları 1.0 M sodyum klorür ile hazırlanan pH 7.0 olan 20 mM sodyum fosfat ile, bir Ni<sup>2+</sup>-İDA kolonuna uygulandığında, at sitokrom c'si alınmaz iken, maya sitokrom c'si kolon hacminin 10 katı eluent kullanıldığında izokratik olarak elue edilir. İDA-Co<sup>2+</sup> ve İDA-Zn<sup>2+</sup> arasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, maya sitokrom c'nin İDA-Zn<sup>2+</sup> ve İDA-Co<sup>2+</sup> için at sitokrom c den daha güçlü bir afinite etkisine sahip olduğu bulunmuştur.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Sitokrom c (at kalbinden, M12,384 pI 10,6), L-histidin metil ester ve metakrilolil klorür Sigma'dan sağlandı (St Louis,USA). EGDMA, Fluka A.G'den alındı (Buchs,Switzerland) ve hidrokinin inhibitörü varlığında indirgenmiş basınca damıtılarak kullanılmaya kadar 4 °C de saklandı. Benzoil peroksit (BPO) Fluka'dan alındı. Poli vinil alkol (PVAL;MW:100.000, %98 hidrolizli) Aldirich (USA)'dan sağlandı. Bütün diğer kimyasallar Merck A.G (Darmstadt,Germany)'den sağlandı. Deneyde kullanılan su, Barnstead (Dubuque,IA) RO pure LP® yüksek akış selüloz membranla ters osmos ünitesi (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE® organik kolloid uzaklaştırılması ve iyon değişim dolgu yatak sistemiyle devam eden aletinden kullanıldı.

#### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Taramalı elektron mikroskopu (SEM): Raster Electron Mikroskopy, Leitz-AMR-1000

Elemental analiz cihazı: Leco,CHNS-932

FTIR Spektrometresi:FTIR 8000 Series

<sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi cihazı:JEOL GX-400, 300 MHz

UV-Vis Spektrofotometresi :UV-2101 PC, UV-Vis Scaning

Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi cihazı:AAS-5AE,Carl Zeiss Technology

Peristaltik pompa ARITEA (Sweden)

Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektroskopisi : EL 9, Varian



## 2.2. Metod

### 2.2.1. Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması

#### 2.2.1.1. 2-Metakriloamidohistidin Sentezi

MAH sentezi için, aşağıdaki deneysel yöntem uygulandı:

5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon 100 mL diklorometan çözeltisinde çözüldü. Bu çözelti 0 °C'a kadar soğutuldu ve 12.7 g trietilamin çözeltiye eklendi. 5mL metakroil klorür, iki saat boyunca oda sıcaklığında manyetik olarak karışan çözeltiye katıldı. Kimyasal tepkime periyodunun sonunda, hidrokinon ve tepkimeye girmeyen metakroil klorür %10'luk NaOH çözeltisinde özütlendi. Sulu faz, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Kalıntı (MAH) eter sikloheksan karışımında kristallendirildi ve daha sonra etil alkolde çözüldü.

#### 2.2.1.2. Manyetik poli(EGDMA) mikrokürelerin Hazırlanması

Manyetik poli(EGDMA) mikroküreler radikal süspansiyon polimerizasyon tekniğiyle hazırlandı. Monomer EGDMA (çapraz bağlayıcı) magnetit varlığında süspansiyon ortamında başlatıcı olarak benzoil peroksit (BPO) ve stabilizatör olarak da poli(vinilalkol)'ün kullanıldığı süspansiyon ortamında polimerleştirilmiştir. Manyetik mikrokürelerde gözenek oluşturması amacıyla ve seyreltici olarak toluen kullanılmıştır. Tablo 2.1'de kısaca manyetik poli(EGDMA) mikrokürelerin oluşması için gerekli polimerizasyon koşulları sunulmuştur. Polimerizasyon tepkimesi sonunda, çözünür bileşenler, polimerin tekrarlanan su ve etil alkol ile aktarımı sonucu polimerden uzaklaştırıldı.

**Tablo 2.1.** Manyetik poli(EGDMA) mikrokürelerin polimerizasyon koşulları

<u>Sulu Dispersiyon Faz</u>		<u>Organik Faz</u>	
Damıtık su	:50 mL	EGDMA	:8.0 mL
PVAL	:0.2 g	Toluen	:12 mL
		BPO	:0.1 g
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	:0.5 g
<u>Polimerizasyon Koşulları</u>			
Reaktör hacmi	: 100 mL		
Karıştırma hızı	:600 rpm		
Sıcaklık ve zaman	:ilk önce 65 °C'de 4 saat, sonra 90°C'de 2 saat		

Kullanılmadığı müddetçe sentezlenen mikroküreler, mikrobiyal kirliliği önlemek amacıyla buzdolabında %0.02 NaN<sub>3</sub> çözeltisinde saklandı.

### 2.2.1.3.Manyetik poli(EGDMA-MAH) Mikrokürelerin Hazırlanması

Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlandı. Yöntem şu şekilde özetlenebilir: stabilizatör, PVAL, sürekli fazın hazırlanması için 50 ml deiyonize suda çözüldü. Dispersiyon faz EGDMA (8.0 ml ), MAH (1.0g ) ve toluen (12.0 ml ) bir tane test tüpünde karıştırılarak hazırlandı. Başlatıcı, BPO (100 mg), demir oksit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) bu homojen çözeltide çözüldü. Dispersiyon faz, sıcaklık kontrolüne sahip su banyosunda bulunan camdan yapı polimerizasyon reaktöründeki sürekli faza eklendi. Polimerizasyon reaktörü polimerizasyon ortamı 600 rpm'de 30 dk. karıştırılarak 65 °C'ye kadar ısıtıldı. Polimerizasyon 65 °C'de 4 saat ve 90°C'de 2 saat yürütüldü (Şekil 2.1). Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, seyreltici ve tepkimeye girmeden kalan monomerin ve diğer karışımdaki maddelerin uzaklaştırılması için yıkama işlemi uygulandı. Manyetik mikroküreler filtre edildi ve etil alkolde şişirildi. Süspansiyon bir saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve mikroküreler filtrasyonla ayrıldı. Mikroküreler iki kere etil alkol, dört kere de deiyonize su ile yıkandı. Şematik gösterimi Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin polimerizasyon koşulları**Sulu Dispersiyon Faz**

Damıtık su :50 mL

PVAL :0.2 g

**Organik Faz**

MAH :40 mg

EGDMA: 8.0 mL

Toluen :12 mL

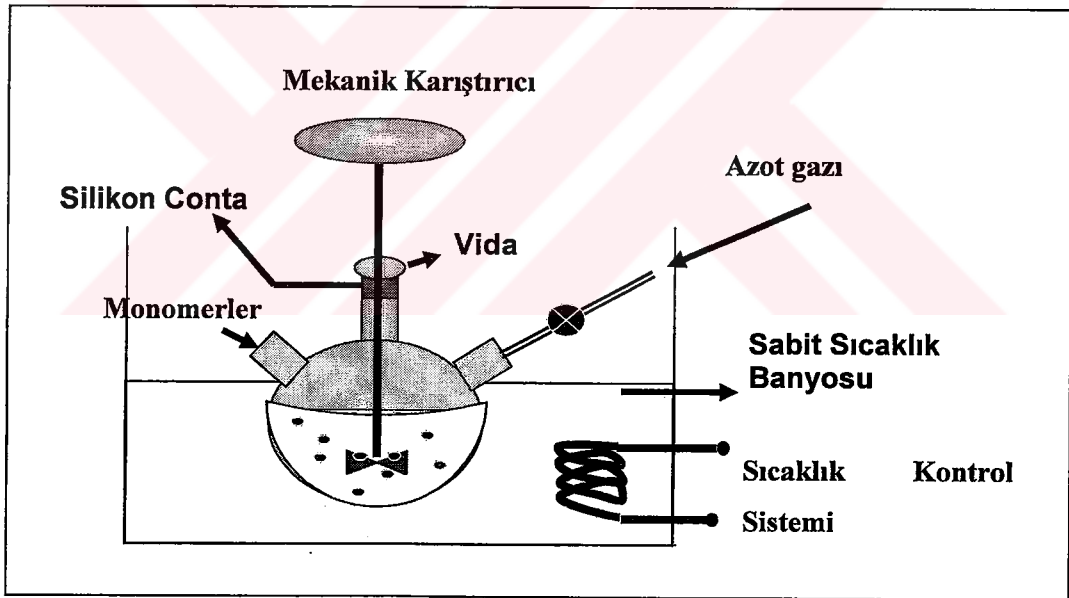
BPO :0.1 g

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> :0.5 g**Polimerizasyon Koşulları**

Reaktör hacmi :100 mL

Karıştırma hızı :600 rpm Sıcaklık ve zaman: ilk önce 65 °C'de 4 saat, sonra 90°C'de 2 saat

Mikroküreler mikrobiyal kirliliği önlemek için buzdolabında %0.02 sodyum azid çözeltisinde saklandı.

**Şekil 2.1.** Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi



## 2.2.2. Manyetik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

### 2.2.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü ve Yüzey Analizi

Mikrokürelerin spesifik yüzey alanı Brunnauer-Emmett-Teller (BET) aleti (Mikrometrik ASAP 2000 Sorptometre, USA) ile ölçüldü. Ortalama şekil ve mikrokürelerin büyüklük dağılımı Tyler Standard Sieves kullanılarak yüzey analizi ile bulundu.

### 2.2.2.2. Şişme Testi

Mikrokürelerin su alım oranı, distile suda hesaplandı. Bu amaçla, başlangıçta kuru mikroküreler dikkatlice tartılarak 50 ml distile su içeren ufak bir şişeye konuldu. Mikrokürelerin şişme testi farklı zaman aralıklarında denenerek, şişme zamanının 2 saat olması yeterli bulunmuştur. Bu nedenle şişe 2 saat, sabit sıcaklıkta ( $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) izotermal su banyosunda bekletildi. Mikroküreler sudan alınarak, süzgeç kağıdı yardımıyla kurutulup tartıldı. Kuru ve yaş örneklerin kütle oranı kaydedildi.

Mikrokürelerin su bileşeni, aşağıdaki denklem 2.1 kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Sualım oranı(\%)} = [W_s \pm W_0 / W_0] \times 100 \quad (2.1)$$

$W_0$  ve  $W_s$  sırasıyla mikrokürelerin su alımından önceki ve sonraki kütlesidir.

### 2.2.2.3. Yüzey Morfolojisi

Manyetik mikrokürelerin yüzey morfolojisi SEM (Taramalı elektron mikroskopi) kullanılarak görüldü. Örnekler analiz edilmeden önce, başlangıçta havada  $25^{\circ}\text{C}$  de 7 gün boyunca kurutuldu. Bu kurutulmuş örnek SEM analizi için örnek diskine yerleştirildi. Daha sonra örnek SEM cihazından (Model: JEOL Model JMS 5600, Japan) sonuçlar alındı.

### 2.2.2.4. Elementel Analiz

MAH katılım derecesine, Leco Elemental Analizator (model CHNS-932)'ünde sentezlenen manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler kullanılarak, elemental analiz yöntemiyle bakıldı. Yapıda sadece MAH'ta bulunan azottan dolayı elemental analizi yapıldı.

### 2.2.2.5. <sup>1</sup>H NMR Analizi

MAH monomerinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu, CDCl<sub>3</sub>'lü JEOL GX-400 300 MHz enstrümantel aletinden alındı. Döteryumsuz CHCl<sub>3</sub> çözeltisi iç referans olarak kullanıldı. Kimyasal kayma CHCl<sub>3</sub>'e bağlı olarak ppm (δ) olarak kaydedildi.

### 2.2.2.6. FTIR Analizi

MAH monomerinin ve poli(EGDMA-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.

### 2.2.2.7. Manyetik Özellikler

Poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin manyetik özelliği, Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektroskopisi (EL 9, Varian) kullanılarak manyetik alanda ölçüldü.

## 2.2.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

### 2.2.3.1. Polimerik Mikrokürelere Cu<sup>2+</sup> İyonlarının Takılması

Manyetik poli (EGDMA-MAH) mikrokürelere, Cu<sup>2+</sup> iyonlarının şelatlanması için şu işlemler yapıldı: 1.0 g. manyetik mikroküreler oda sıcaklığında Cu<sup>2+</sup>'in şelatlanması için optimum pH olan pH:5'te (HCl veya NaOH ile ayarlanır), 30 ppm Cu<sup>2+</sup> iyonları içeren 50 mL sulu çözeltiye karıştırıldı. Cu<sup>2+</sup> iyonları kaynağı olarak 1000 ppm atomik absorpsiyon standart çözeltisi (%10 HNO<sub>3</sub> içeren) kullanıldı. Beher 100 rpm'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı (dengeye gelmesi için yeterli bir süredir) (Emir ve ark.,2004). Sonuçta oluşan çözeltideki Cu<sup>2+</sup> iyonlarının derişimi grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrofotometresi yardımı ile bulundu. Adsorblanan Cu<sup>2+</sup> iyonları, başlangıç çözeltideki Cu<sup>2+</sup> iyonları ve denge çözeltideki Cu<sup>2+</sup> iyonları kullanılarak bulundu.

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

Burada, Q; 1g mikroküreye adsorblanan metal iyon miktarını (mg g<sup>-1</sup>); C<sub>0</sub> ve C sırasıyla sulu çözeltideki metal iyonun başlangıç ve son derişim değerlerini (mg mL<sup>-1</sup>); V sulu fazın hacmi (mL); m ise kullanılan mikrokürelerin miktarını (g) vermektedir.

$\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere  $\text{Cu}^{2+}$  sızması, 1.0 M NaCl içeren ve pH: 8 olan ortamda incelendi. Manyetik mikroküre süspansiyonu 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.  $\text{Cu}^{2+}$  iyon derişimi AAS kullanılarak süpernatanttan alınan sonuçlardan ortamda bakırın olmadığı görüldü. İmmobilize metal içeren mikroküreler, 10 mM Tris-HCl (7.4) tamponuyla %0.02 sodyum azid içeren çözeltide mikrobiyal kirliliği önlemek için saklandı.

### 2.2.3.2. $\text{Cu}^{2+}$ Şelatlı Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom c Adsorbsiyon Çalışması

Sitokrom c adsorbsiyonu, fosfat tamponu (0.1M pH 6.0-8.0) ve karbonat tamponu (0.1M pH 9.0-11.0) kullanılarak bu pH aralıklarında, 70  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MAH katılma, 68  $\mu\text{mol g}^{-1}$  maksimum  $\text{Cu}^{2+}$  yüklenmiş  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere çalışıldı. Başlangıç sitokrom c derişimi, her tamponda (ilgili tamponlarda, değişik pH'larda) 1.0 mg  $\text{mL}^{-1}$  dir. Adsorbsiyon deneylerine pH etkisi 25°C'de 2 saat sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

Başlangıç sitokrom c derişiminin manyetik ve  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik mikrokürelere adsorpsiyonuna etkisine, 25°C'de pH:8.0 tamponunda 0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 1.0 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 1.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 2.0 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 2.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 3.0 mg  $\text{mL}^{-1}$  sitokrom c derişimlerinde bakıldı. Adsorbsiyon deneyleri, 70  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MAH katılma, 68  $\mu\text{mol g}^{-1}$  maksimum  $\text{Cu}^{2+}$  yüklenmiş  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere 25°C'de protein çözeltisi ile 2 saat sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

Sıcaklığın sitokrom c'nin adsorpsiyonuna etkisine ise pH:8.0 tamponunda, 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  başlangıç sitokrom c derişimi kullanılarak 4°C, 25°C ve 37°C'de 2 saat karıştırılarak bakıldı. Bu periyodun sonunda, çözeltide mikrokürelere adsorblanmadan kalan sitokrom c'nin derişimi ve sitokrom c'nin başlangıç derişimi 280 nm'de UV spektrofotometresi (UV-2101 PC, UV-Vis Scanning) absorbansın ölçülmesi ile aşağıdaki denklem (2.3) kullanılarak hesaplandı:

$$Q = [(C_0 - C)V] / m \quad (2.3)$$

Burada, Q; 1g mikroküreye adsorblanan sitokrom c'nin mg olarak miktarıdır ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $C_0$  ve C sırasıyla başlangıç çözeltisinde ve belli bir süre geçtikten sonra sulu fazdaki sitokrom c derişimidir ( $\text{mg mL}^{-1}$ ); V sulu fazın hacmi (mL); m ise kullanılan mikrokürelere miktarıdır (g).

### 2.2.3.3. Akış Hızı

Sitokrom c moleküllerinin manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorpsiyonunun pH 8.0'da 25°C'de 1, 1.5, 3 ve 4.5 mL dk<sup>-1</sup> gibi değişik akış hızlarında, Biorad ekonomik kolonlar (uzunluk: 6cm, çap: 1cm)'in kullanıldığı manyetik kararlı akışkan yataklı sistemlerde (MSFB) çalışılmıştır. Bu sistem bir kolon, peristaltik pompa ve manyetik alan kullanılarak oluşturulmuştur. Bu peristaltik pompa kullanılarak önce, mikrokürelere dört kat kolon hacmi miktarında pH: 8.0 fosfat tamponuyla dengeye getirildi. Daha sonra sitokrom c çözeltisi için de aynı işlem tekrarlandı ve deney süresince kolonun etrafında manyetik alan oluşturuldu. Aynı zamanda protein çözeltisi manyetik karıştırıcıyla 200 rpm'de karıştırıldı. Sitokrom c'nin akışı peristaltik pompa ile sağlandı.

### 2.2.3.4. Cu<sup>2+</sup> Şelatlı Polimerik Mikrokürelere Sitokrom c Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirliği

Sitokrom c desorpsiyon çalışmaları 2.0 M NaCl içeren tampon çözeltide yapıldı. Sitokrom c adsorblanmış 70 µmol g<sup>-1</sup> MAH katılma, 68 µmolg<sup>-1</sup> maksimum Cu<sup>2+</sup> yüklenmiş Cu<sup>2+</sup> şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere desorpsiyon ortamına konuldu ve 100 rpm'de 25°C'de 1 saat karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki son sitokrom c derişimi spektrofotometreyle hesaplandı. Cu<sup>2+</sup> iyonlarının desorpsiyonu da, desorpsiyon ortamında atomik adsorpsiyon spektrometresi ile ölçüldü. Desorpsiyon oranı kürelere adsorblanan ve desorplanan sitokrom c miktarından hesaplandı.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan sitokrom c}}{\text{Adsorblanan sitokrom c}} \times 100 \quad (2.4)$$

Cu<sup>2+</sup> Şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere tekrar kullanılabilirliğini kontrol etmek için, sitokrom c adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı adsorbent kullanılarak 10 defa tekrar edildi. Her adsorpsiyon desorpsiyon deneyinden sonra Cu<sup>2+</sup> iyonları 25 mM EDTA ile pH 4.9 da sıyrıldı ve Cu<sup>2+</sup> takma prosedürü yeniden uygulandı. Sterilizasyon için, manyetik mikrokürelere, her adsorpsiyon desorpsiyon döngüsünden sonra 30 dk boyunca 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkandı, daha sonra fosfat tamponuyla bir sonraki adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü için dengeye getirildi.

### 3.BULGULAR

#### 3.1.Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

##### 3.1.1.Yüzey Alanı Ölçümü ve Yüzey Analizi

Sentezlenen mikroküreler 50-100  $\mu\text{m}$  boyut aralığında bulundu. Civa porosimetre verisine göre, manyetik mikrokürelerin ortalama gözenek büyüklüğü 830 nm dir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin spesifik yüzey alanı  $80 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  olarak bulundu. Bu manyetik mikrokürelerin oldukça çok mikrogözenekli olduğunu gösterir. Bu gözenek çap aralığı sitokrom c moleküllerinin difüzyonu için uygundur. Hidratlı sitokrom c'nin çapı 0.34 nm'dir. Bu veriye göre, sitokrom c'nin sıvı kromatografik ayrılması için manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin etkili gözenek yapısına sahip olduğu söylenir.

##### 3.1.2. Şişme Testi

Poli(EGDMA) ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler çapraz bağlı jellerdir. Sulu ortamda çözünmezler fakat çapraz bağlarından dolayı şişerler.

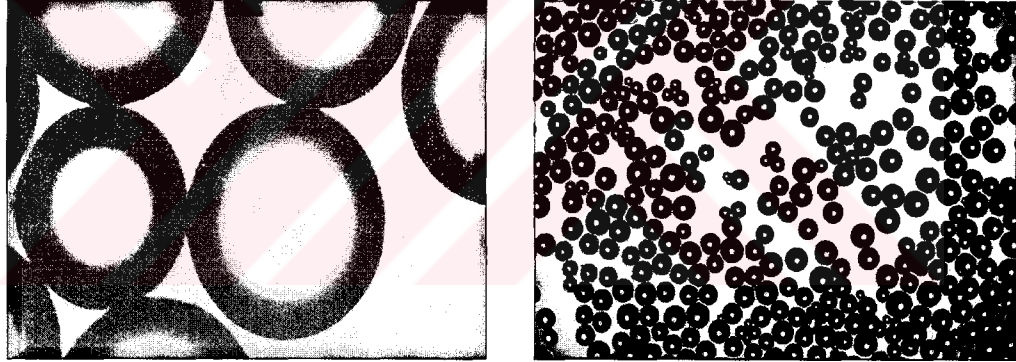
Poli(EGDMA) ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler denge şişme oranı çalışma sonucunda sırasıyla %17.7 ve %40 olarak bulunmuştur. Bu değerler kıyaslandığında, manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin su alım oranı arttığı bulunmuştur.

##### 3.1.3.Yüzey Morfolojisi

Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin yüzey morfolojisi Şekil 3.1'de SEM mikrografi ile Şekil 3.2'de ise optik mikrografi ile gösterilir. Buradan da açıkça görüldüğü gibi, mikroküreler küresel formdadır ve polimerizasyon yöntemi boyunca oluşan gözeneklerden dolayı pürüzlü yüzeye sahiptir. Mikroküre yüzeyindeki gözeneklerin varlığı bu fotoğrafta açıkça görülmektedir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler kuru halde, pürüzlü yüzeye çevrili gözenekli yapıya sahiptir. Yüzeyin pürüzlülüğü yüzey alanının artmasını sağlayan bir faktör olarak kabul edilir. Buna ilaveten bu gözenekler, difüzyonal direnci azaltır ve yüksek iç yüzey alanından dolayı kütle transferini kolaylaştırır.



**Şekil.3.1.** Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin SEM mikrografı



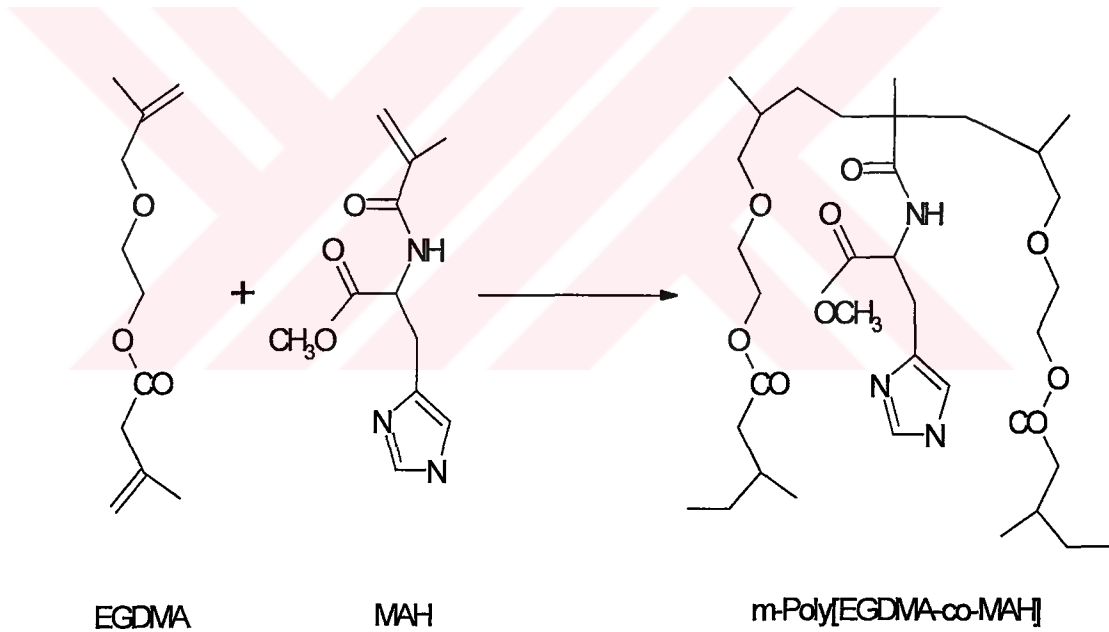
**Şekil 3.2.** Manyetik poli(EGDMA) ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin optik mikrografı

#### 3.1.4. Elementel Analiz

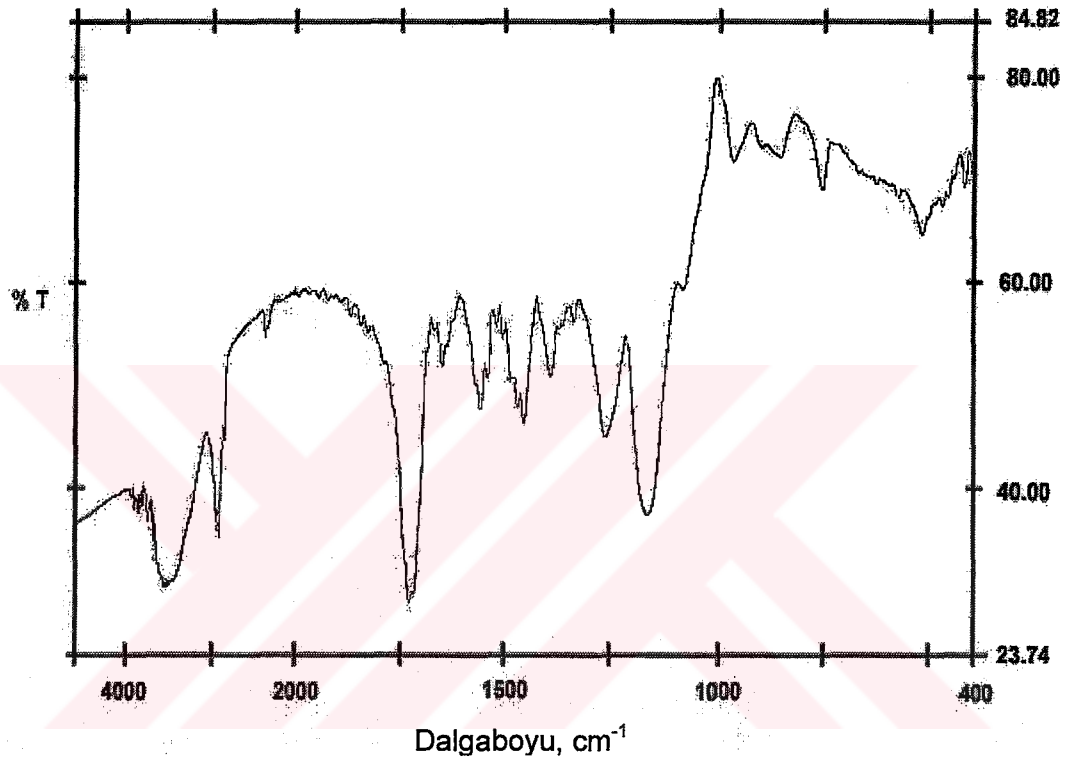
Polimerik yapıya katılan MAH'ın inkorporasyon derecesini bulmak için sentezlenen manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin elementel analizi yapıldı. MAH'ın inkorporasyonu azot stokiyometrisi kullanılarak  $70.0 \mu\text{mol g}^{-1}$  polimer olarak bulundu.

### 3.1.5. FTIR Analizi

Sitokrom c adsorpsiyonu için 2-metakriloamidohistidin (MAH), komonomer ve psödospesifik ligand olarak kullanılmıştır. İlk olarak histidin ve metakroilklorür kullanılarak MAH komonomeri sentezlenmiştir. Ardından radikalik süspansiyon polimerizasyonu ile Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler üretilmiştir. Sentezlenen p(EGDMA-MAH) mikrokürelerin kimyasal yapısı şekil 3.3'de verilmiştir. Şekil 3.4'de MAH monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir. MAH monomerine ait karakteristik karbonil bandı  $1724\text{ cm}^{-1}$ 'de, amid I ve amid II gerilme titreşim bandları  $1651\text{ cm}^{-1}$  ve  $1558\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. Şekil 3.5'de ise manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumlarında  $3612\text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik O-H gerilme titreşim bandı,  $1653\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil,  $1496\text{ cm}^{-1}$ 'de amid II titreşim bandı görülmektedir.

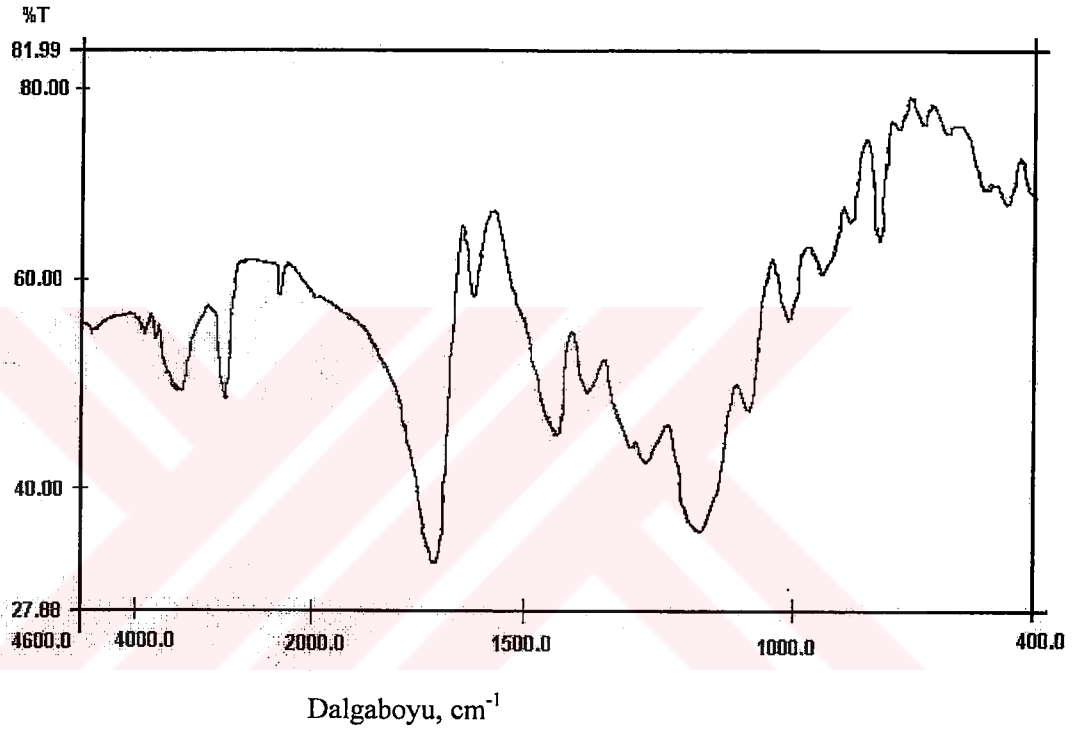


Şekil 3.3. Sentezlenen manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin önerilen yapısı



Şekil 3.4. MAH monomerinin FTIR spektrumu

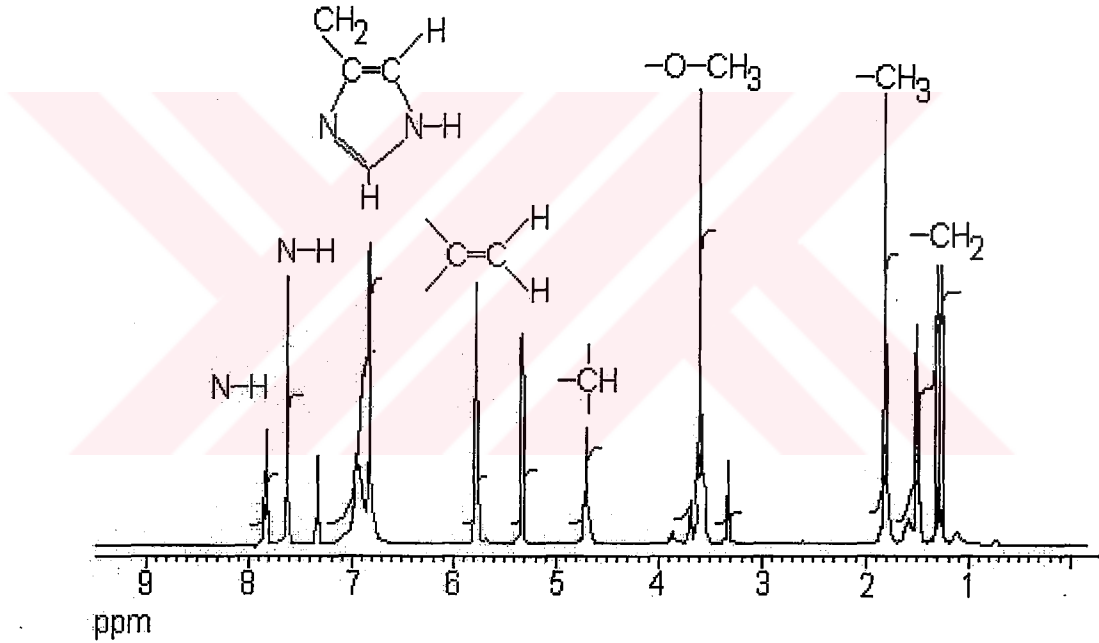




Şekil 3.5. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumu

### 3.1.6. $^1\text{H-NMR}$ Analizi

MAH monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde  $^1\text{H-NMR}$  kullanıldı. MAH monomerinin Şekil 3.6'da verilen  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda MAH yapısında bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.99 (t: 3H,  $J=7.08$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) 1.42 (m: 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.56 (T: 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.82-4.87 (m: 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil H),; 6.86 ( $\delta$ : 1H,  $J=7.4$  Hz, NH), 7.82 ( $\delta$ : 1H,  $J=8.4$  Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) şeklindedir.



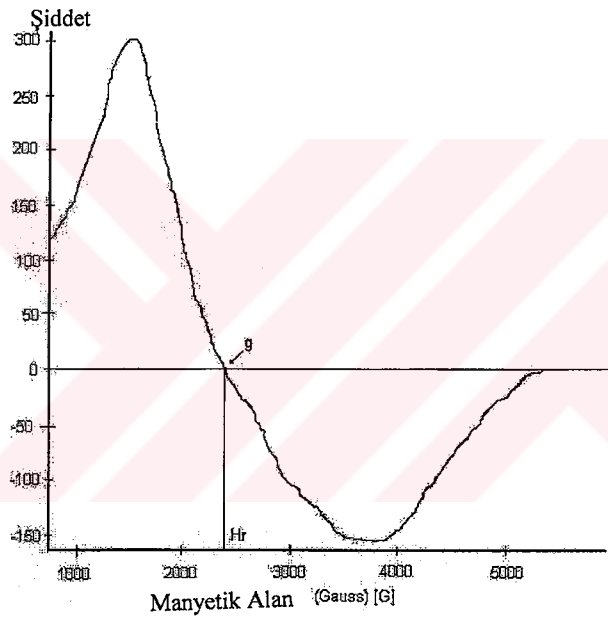
Şekil 3.6. MAH monomerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

### 3.1.7. Manyetik Özellikler

Polimerik yapıdaki manyetit partiküllerin varlığı ESR ile belirlenir. Manyetit pikin manyetik alana (Gauss) karşı şiddeti Şekil 3.7’de gösterilmiştir.

Dış manyetik alanın uygulanması örnekte, dış alandan çıkarılan veya eklenecek olan iç manyetik alanın oluşmasına neden olur. Elektronik manyetik momentle oluşturulan lokal manyetik alanın ( $H_{\text{lokal}}$ ) vektörel olarak dış manyetik alana ( $H_{\text{dış}}$ ) eklenmesiyle etkin alan oluşur ( $H_{\text{etkin}}$ ).

$$(H_{\text{etkin}}) = (H_{\text{lokal}}) + (H_{\text{dış}}) \quad (3.1)$$



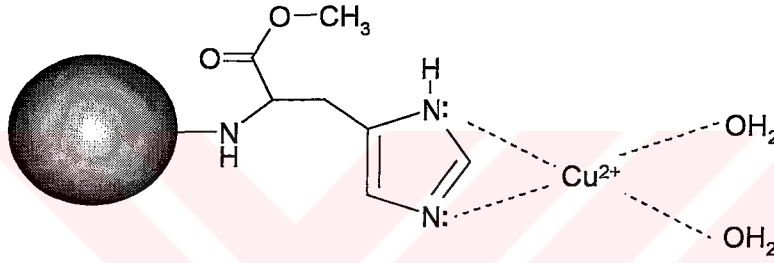
Şekil 3.7. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin manyetik davranışı

Şekil 3.7’den de görüldüğü gibi, manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler 125 bağıl şiddete sahiptir. Bu değer, polimerik yapının, yapısındaki manyetitten kaynaklanan lokal manyetik alana sahip olduğunu gösterir. Şekil 3.7’de verilen g faktörü çiftleşmemiş elektronların yerleşmiş olduğu molekülün nicel karakteristiği olarak kabul edilir. Bilinmeyen bir sinyalin g faktörü hesaplandığında, sinyalin tanınmasında sağlayabilir. Literatürde,  $Fe^{+3}$  (düşük spin ve yüksek spin kompleksi) için hesaplanan g faktörü sırasıyla 1.4-3.1 ve 2.0-9.7 dir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin g faktörü 2.56 olarak bulundu.

### 3.2. $\text{Cu}^{2+}$ Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelere Sulu Çözeltiden Sitokrom c Adsorpsiyonu

#### 3.2.1. Polimerik Mikrokürelere $\text{Cu}^{2+}$ Şelasyonu

Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere şelatlanan  $\text{Cu}^{2+}$  miktarı ölçüldü ve  $68 \mu\text{mol g}^{-1}$  polimer olarak bulundu. Bir MAH molekülü bir  $\text{Cu}^{2+}$  iyonuyla etkileşir. Çünkü MAH azot atomundan dolayı iki koordinasyon bölgesine sahiptir ve dörtlü kompleks oluşturur, Şekil 3.8’de görüldüğü gibi boş kalan yerleri ise su molekülleri doldurur.

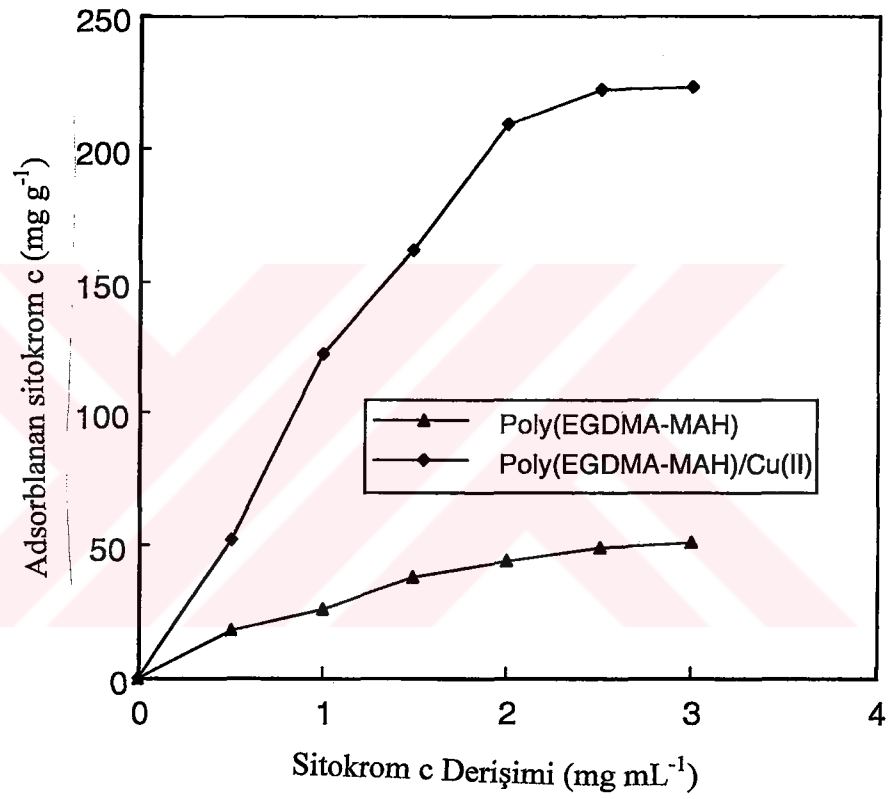


Şekil 3.8. Poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere ile  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları arasındaki etkileşim

#### 3.2.2. Sitokrom c Başlangıç Derişiminin Etkisi

Şekil 3.9 manyetik poli(EGDMA-MAH) ve  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorplanan sitokrom c miktarının denge derişimiyle ilişkisini gösterir. Şekilde de görüldüğü gibi, sitokrom c derişiminin artmasıyla birlikte, birim kütle başına adsorblanan sitokrom c miktarı da artar ve daha sonra  $2.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ’de doygunluğa ulaşır. Adsorpsiyon izotermindeki eğimin başlangıç parçası sitokrom c ve  $\text{Cu}^{2+}$  grupları arasındaki yüksek afiniteyi gösterir. Protein derişimi  $2.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ’nin üzerine çıktığında ise eğim sabitlenir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorplanan sitokrom c molekülleri yaklaşık  $51 \text{ mg g}^{-1}$ ’dir. Sitokrom c’nin adsorpsiyon kapasitesi protein molekülleri ve mikrokürelere arasındaki hidrofobik etkileşimden dolayıdır.  $\text{Cu}^{2+}$  şelasyonu, mikrokürelere adsorpsiyon kapasitesini  $222 \text{ mg g}^{-1}$ ’a çıkarır. Bu artışın nedeni şelatlanmış  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları ve sitokrom c arasındaki spesifik etkileşim (sitokrom c yapısındaki histidin uzantısının imidazol

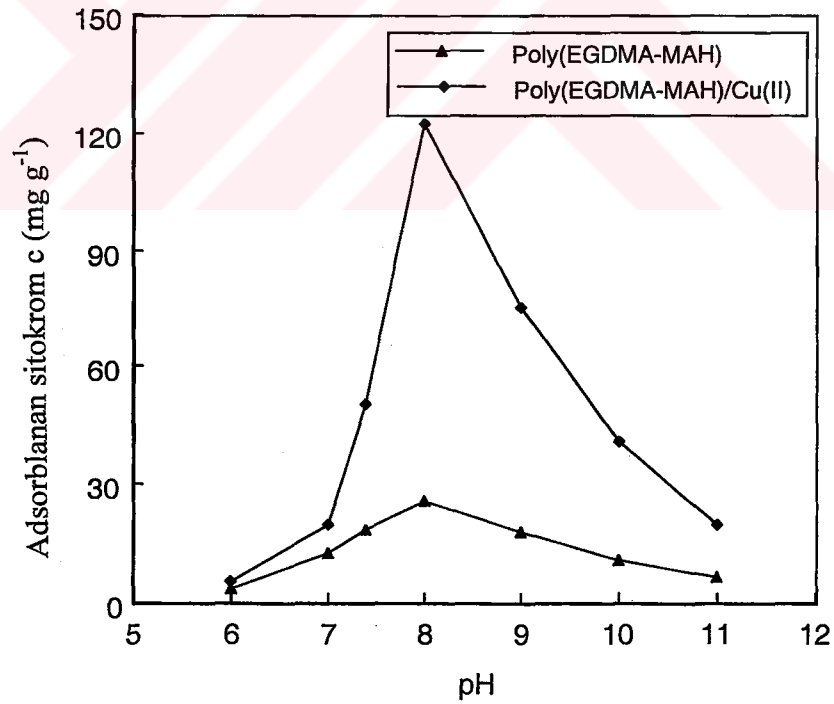
uzantısı nedeni ile) lerden dolayıdır. At kalbi sitokrom c'si; 29. konumunda tekli yüzey histidin'e sahiptir ve 33. pozisyonda ilaveten kabul gören histidin vardır (Abudiab ve Beitle, 1998).



Şekil 3.9. Adsorpsiyon kapasitesine başlangıç sitokrom c derişiminin etkisi

### 3.2.3. Sitokrom c Adsorpsiyonuna pH Etkisi

Manyetik poli(EGDMA-MAH) ve  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı m-poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere pH'nın etkisi şekil 3.10'da görüldüğü gibidir ve bu iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, adsorplanan sitokrom c miktarı pH 8.0'de maksimum değeri gösterirken, daha düşük ve yüksek pH değerlerinde düşük değer gösterir (sitokrom c'nin izoelektrik noktası 10.6 dır). Sitokrom c molekülleri ve şelatlı  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları arasındaki pH 8.0 daki spesifik etkileşimler (elektrostatik ve koordinasyon): sitokrom c'nin amino asit yan zincirindeki birkaç grubun iyonlaşma basamağı ve bu pH'daki sitokrom c moleküllerinin konformasyonel durumundan dolayıdır. İkincisi ise, pH 8.0'den yüksek ve düşük pH değerlerinde ise, adsorplanan sitokrom c anlamlı şekilde azalmaktadır. Bunun nedeni ise, sitokrom c'nin iyonlaşma basamağı ve sitokrom c molekülleri ile şelatlı  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları arasındaki itici elektrostatik kuvvetlerdir. Konformasyonel boyuttaki artış ve adsorblanmış komşu sitokrom c molekülleri arasındaki lateral elektrostatik itmeler adsorpsiyon veriminde azalmaya neden olur. Aynı zamanda, yüksek ve düşük pH daki koordinasyon etkileşimlerindeki değişimin de büyük etkisi vardır.

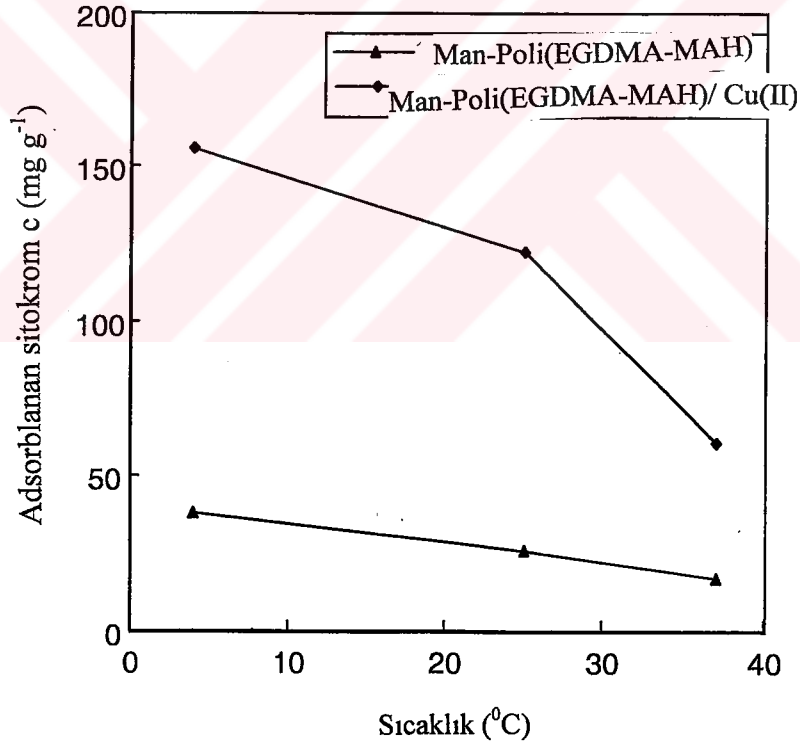


Şekil 3.10. Sitokrom c adsorpsiyonuna pH'nın etkisi

### 3.2.4. Sitokrom c Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi

Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-37 °C arasında çalışılmıştır. Bütün sıcaklıklarda, sitokrom c'nin manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorpsiyonu,  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorpsiyonundan düşüktür.

Sitokrom c'nin manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere olan fiziksel adsorpsiyonunun sıcaklıktan önemli derecede etkilenmediği gözlemlendi. Bununla birlikte, sitokrom c'nin manyetik poli(EGDMA-MAH) ve  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalır ve maksimum adsorpsiyona 4 °C'de ulaşır (şekil 3.11). 4 °C'den 37 °C'ye, manyetik mikrokürelere adsorpsiyon kapasitesi % 30 civarında azalır. Bunun nedeni ise adsorpsiyon prosesinin ekzotermik olmasıdır (Sarıkaya Yüksel, 2000).



Şekil 3.11. Sitokrom c adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

### 3.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi protein molekülünün adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bu, iki faz dengedeyken, protein derişimi ile desteğe adsorblanan metal iyonu miktarı arasındaki ilişkiyi gösterir.

Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin sabit sayıdaki, her biri sadece bir molekül tutabilen, belirli bölgelere adsorblandığını farzeder. Bu bölgeler aynı zamanda enerjice eşit ve her biri diğere eşit sayılır, böylece komşu bölgelerce adsorblanan moleküller arasında etkileşim yok sayılır.

Kesikli sistem çalışmaları süresince, adsorpsiyon izotermi adsorpsiyon özelliklerini görmek için kullanılır. Langmuir adsorpsiyon izotermi eşitlik 3.2 ile açıklanır. Sitokrom c'nin denge verilerinin ilgili transformasyonu lineer olarak artar, bu da Langmuir modelinin bu sisteme uygulanabileceğini gösterir:

$$Q = Q_{\text{mak}} \cdot b \cdot C_{\text{den}} / (1 + bC_{\text{den}}) \quad (3.2)$$

Q, adsorbente bağlı sitokrom c derişimi ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_{\text{den}}$  çözeltilde denge sitokrom c derişimi ( $\text{mg ml}^{-1}$ ), b langmuir sabiti ( $\text{ml mg}^{-1}$ ) ve  $Q_{\text{mak}}$  maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $\text{mg g}^{-1}$ ). Bu denklem doğrusallaştırılırsa şu formülü alır:

$$1/q = [(1/Q_{\text{mak}} \cdot b)] [1/C_{\text{den}}] + [1/Q_{\text{mak}}] \quad (3.3)$$

$1/C_{\text{den}}$ 'ye karşı  $1/Q$  uygulanırsa, grafikten kesim  $1/Q_{\text{mak}}$  ve eğim  $1/Q_{\text{mak}} \cdot b$  değerlerini verir.

Diğere iyi bilinen izoterm ise, adsorpsiyonu açıklamada sıklıkla kullanılan Freundlich izotermidir. Bu izoterm heterojen yüzeylerin adsorpsiyonunu açıklayan Langmuir izotermi'nin diğere şeklidir. Adsorplanan protein miktarı, bütün bağlanma bölgelerine olan adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi, tersinir adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabaka oluşumuyla sınırlanmaz. Bunun basit ifadesi şu şekildedir:

$$Q_{\text{den}} = K_F (C_{\text{den}})^{1/n} \quad (3.4)$$

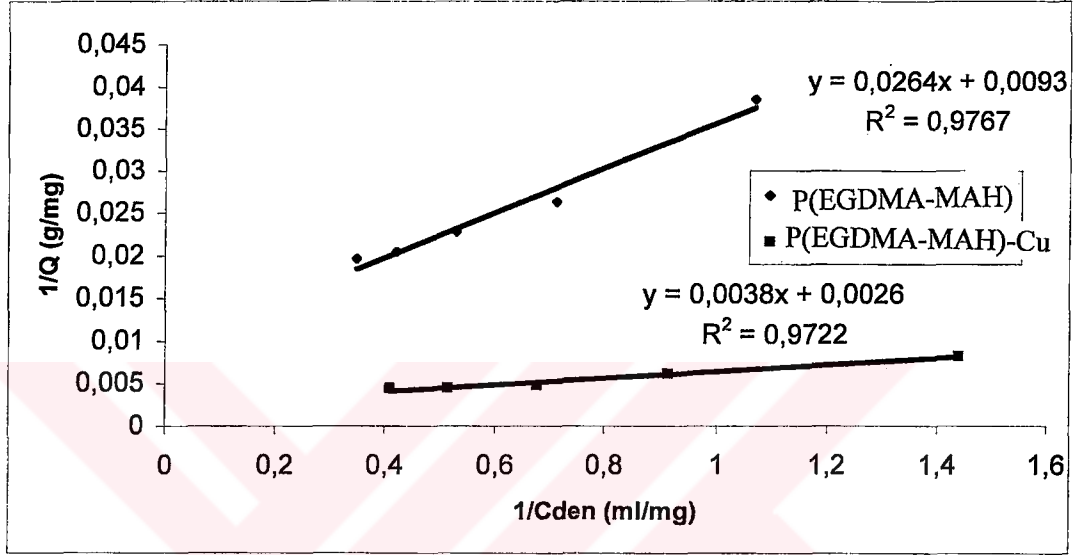
$K_F$  ve  $n$  Freundlich sabitleridir.

Sitokrom c'nin izotermi, bütün derişim çalışmaları boyunca lineer bulundu ve korelasyon sabiti de yüksekti. Tablo 4.1'de Freundlich sabitleri,  $n$  ve  $K_F$  ve korelasyon

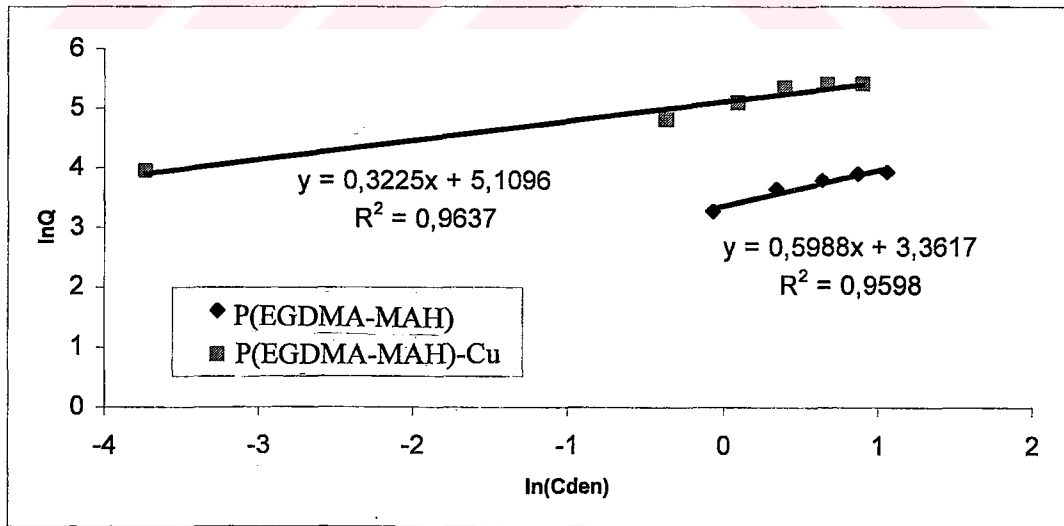


sabitlerini göstermektedir.  $K_F$  ve  $n$  değerleri, metal şelat afinite mikrokürelerin yüksek adsorpsiyon kapasitesiyle sitokrom c'nin sulu çözeltiden adsorpsiyonunun kolay olduğunu gösterir.

a)



b)



Şekil 3.12. Manyetik poli(EGDMA-MAH) ve  $Cu^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin a) Langmuir ve b) Freundlich izotermi

**Tablo 3.1.** Sitokrom c için Langmuir ve Freundlich sabitleri

	Langmuir		Freundlich	
	$Q_{max}$	$b$	$K_f$	$n$
P(EGDMA-MAH)	107.527	0.352	28.838	0.599
P(EGDMA-MAH)/Cu(II)	384.615	0.684	165.604	0.322

### 3.2.6. Kinetik Çalışmalar

Kütle transferi ve kimyasal tepkime gibi adsorpsiyon prosesinin kontrol mekanizmasına bakılmak istendiğinde, deneysel sonuçlara kinetik modeli uygulanır. Kinetik modeller (yalancı-birinci ve ikinci dereceden denklemler), ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimlerine eşit olduğu kabul edilerek bu sistemde kullanılır. Lagergen'in birinci dereceden hız denklemi, sıvı çözülden çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan denklemdir (Chaouk ve Hearn, 1999). Aşağıdaki şekilde gösterilebilir:

$$q_t/dt=k_1(q_{den}-q_t) \quad (3.5)$$

$k_1$  yalancı birinci dereceden kinetiğin hız sabitidir ve  $q_{den}$  ve  $q_t$  ise sırasıyla dengede ve  $t$  zamanında adsorplanan protein miktarıdır ( $mg\ g^{-1}$ ). Sınır koşulların uygulanmasıyla integrasyondan sonra  $t=0$ 'da  $q_t=0$ ,  $t=t'$ 'de  $q_t=q_t$  aşağıdaki sonuç bulunur:

$$\log[q_{den}/(q_{den}-q_t)]=k_1t/2.303 \quad (3.6)$$

3.6 denklemini lineer hale getirilmek için tekrar düzenlenirse;

$$\log(q_{den}-q_t)=\log(q_{den})-k_1t/2.303 \quad (3.7)$$

$\log q_{den}$ 'nin  $t$ 'ye karşı çizilen grafiği kinetik modelin kabuledilebilir olması için doğru çizgi verir. Doğru bir birinci derece sürecinde  $\log q_{den}$   $t$ 'den geçerek  $\log(q_{den}-q_t)$ 'yi kesen kesim noktasına eşit olmalıdır.

İlaveten, yalancı-ikinci dereceden denklem adsorpsiyon denge kapasitesine dayanır ve şu şekilde açıklanır:

$$q_t/dt=k_2(q_{den}-q_t)^2 \quad (3.8)$$

$k_2$  ( $gmg^{-1}dk^{-1}$ ) yalancı-birinci dereceden adsorpsiyon sürecinin hız sabitidir. Denklem y tamamlanıp yerine şu değerler konursa,  $t=0$ 'da  $q_t=0$ ,  $t=t'$ 'de  $q_t= q_t$ , şu sonuca ulaşılır

$$[1/(q_{den}-q_t)]=(1/q_{den})+k_2t \quad \text{veya}$$

$$(t/q_t)=(1/k_2q_{den})^2 + (1/q_{den})t \quad (3.9)$$

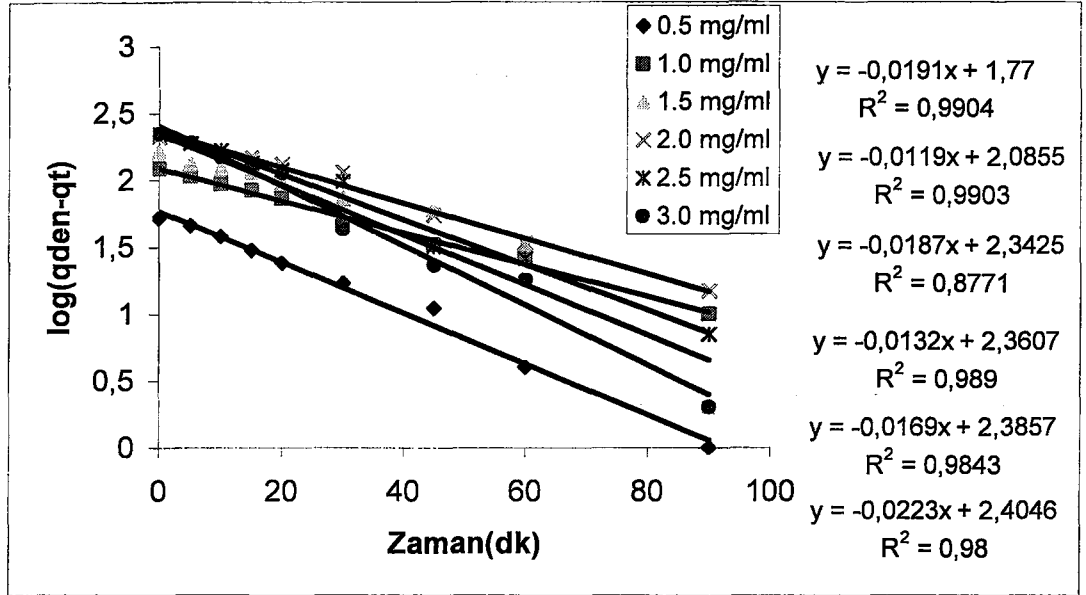
$t/q_t$ 'nin  $t$ 'ye karşı grafiğinin ikinci dereceden kinetiği sağlaması için doğru vermesi gerekir. Hız sabiti(  $k_2$ ) ve denge adsorpsiyonu ( $q_{den}$ ) sırasıyla kesim ve eğimden hesaplanabilir. Kinetik çalışmaların sonuçları Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.2.** Sitokrom c ( $1mg mL^{-1}$ ) adsorpsiyonu için kinetik sonuçlar

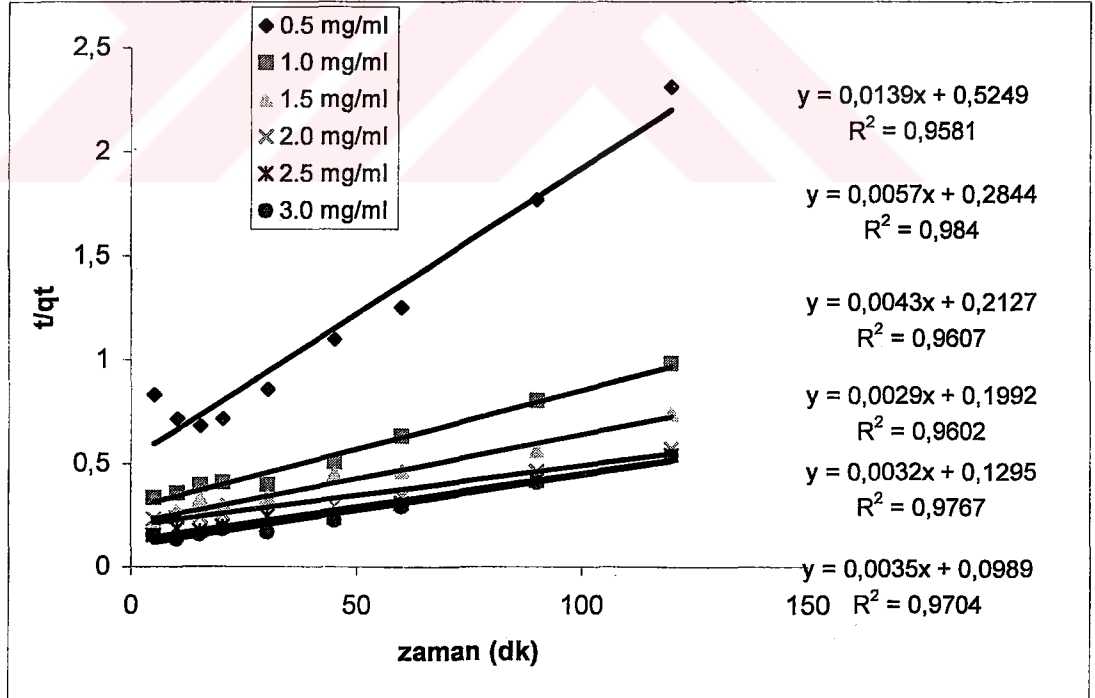
Polimer	Deneysel $q_{den}$ ( $mg g^{-1}$ )	Yalancı Birinci-derece kinetik			Yalancı İkinci-derece kinetik		
		$k_1$ ( $min^{-1}$ )	$q_{den}$ ( $mg g^{-1}$ )	$R^2$	$q_{den}$ ( $mg g^{-1}$ )	$k_2$ ( $g mg^{-1} min^{-1}$ )	$R^2$
I	25	$4.49 \times 10^{-2}$	26.0	0.94	34.0	$18.95 \times 10^{-4}$	0.99
II	122	$2.74 \times 10^{-2}$	121.7	0.99	175.4	$11.4 \times 10^{-5}$	0.98

I Man-poli(EGDMA-MAH) mikroküreler

II Cu(II) şelatlı man-poli(EGDMA-MAH) mikroküreler



Şekil 3.13. Adsorbentin deneysel verilerinin yalancı birinci dereceden kinetiği



Şekil 3.14. Adsorbentin deneysel verilerinin yalancı ikinci dereceden kinetiği

### 3.2.7. Akış Hızı Etkisi

Şekil 3.15’de gösterildiği gibi 1 mL dk, 1.5 mL dk, 3 mL dk, 4.5 mL dk akış hızlarındaki adsorpsiyon kapasitesi (polimer başına adsorplanan sitokrom c miktarı) eşitlik 3.10 kullanılarak hesaplandı (Ölçümler 280 nm UV spektrofotometresinden alındı). Akış hızı arttıkça adsorpsiyon kapasitesi azaldı. Kolonda sitokrom c moleküllerinin alıkonma zamanı akış hızının artmasıyla azaldı, çünkü akış hızının artması protein moleküllerinin mikroküre yüzeyindeki MAH gruplarıyla etkileşmesine yeterli zaman tanımaz.

Kolonda adsorplanan sitokrom c miktarının hesaplanmasında ise aşağıdaki eşitlik 3.10 kullanıldı :

$$Q = (m_{\text{baş}} - m_{\text{son}}) V / m \quad (3.10)$$

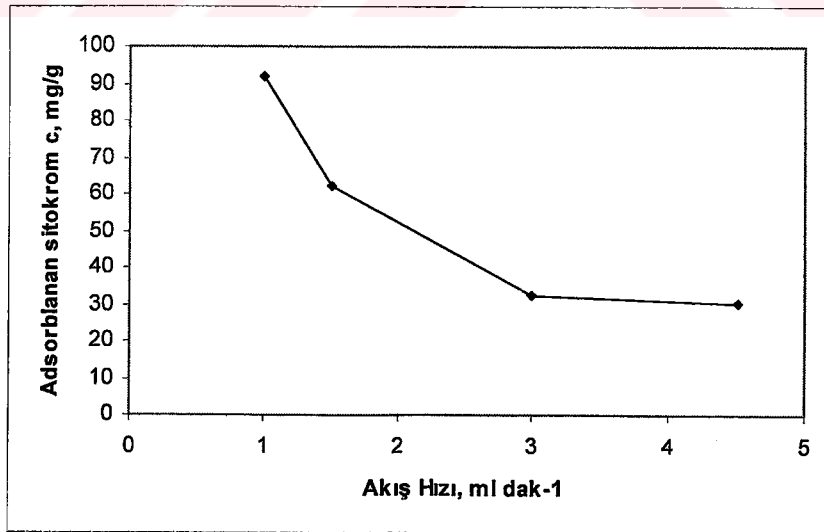
Q: adsorplanan sitokrom c  $g^{-1}$  polimer

$m_{\text{baş}}$ : başlangıç sitokrom c miktarı ( $mg mL^{-1}$ )

$m_{\text{son}}$ : adsorpsiyon sonrası sitokrom c miktarı ( $mg mL^{-1}$ )

V: beherdeki protein çözeltisi (mL)

m: kolondaki mikroküre miktarı (g)

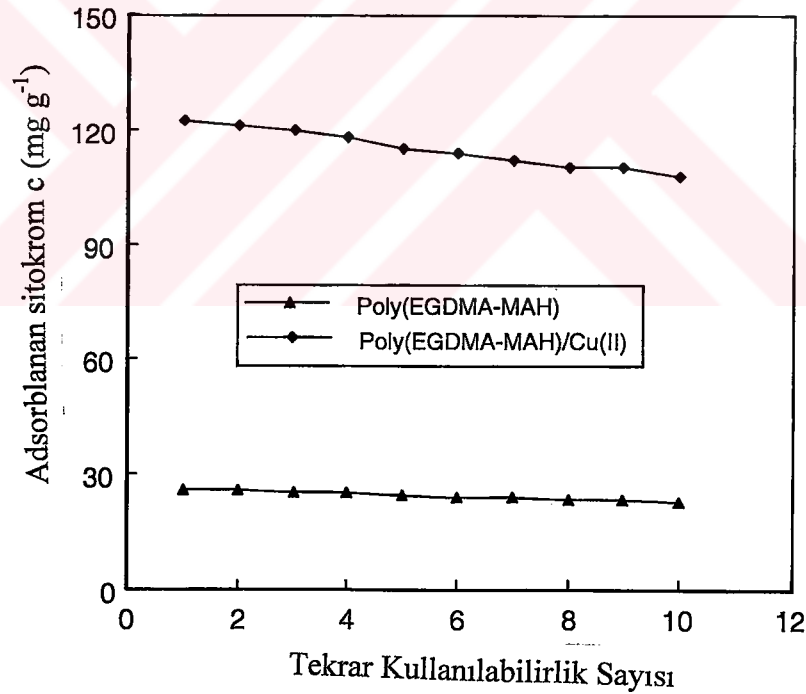


Şekil 3.15. Akış Hızı Etkisi

### 3.2.8. $\text{Cu}^{2+}$ Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelere Sitokrom c Desorpsiyonu

Biyoafinite ayırmasının son basamağında amaç, adsorplanan proteinin en kısa sürede ve mümkün olan en yüksek derişimde desorplanmasıdır. Bu, her döngüden sonra afinite adsorbentlerinin rejenerasyon veriminin belirlenmesi için gereklidir. Bu çalışmada, adsorblanan sitokrom c'nin %95'inden fazlası, desorpsiyon ajanı olarak NaCl kullanılarak 30 dakikada uzaklaştırılabildi.

$\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı mikrokürelere kullanılarak 10 kez ardarda uygulanmıştır (Şekil 3.16). On döngüden sonra, kapasite %10 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarından sonra ise mikrokürelere şeklinde açık bir değişim gözlenmedi. Bu sonuçlar ise bize var olan metal şelat afinite sorbentlerin kararlılığını göstermektedir.



Şekil 3.16. Manyetik polimerik mikrokürelere ile  $\text{Cu}^{2+}$  Şelatlı Manyetik Polimerik Mikrokürelere tekrar kullanılabilirlikleri

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Poli(EGDMA) ve manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler çapraz bağlı jellerdir. Sulu ortamda çözünmezler, fakat çapraz bağlanma derecesine göre şişerler. Yaptığımız çalışma sonucunda Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin denge şişme oranı %40 olarak bulunmuştur. Bu değer %17.7'lik şişme oranına sahip olarak bulduğumuz poli (EGDMA) ile kıyaslandığında manyetik poli (EGDMA-MAH) polimerinde su alma oranı poli (EGDMA)'ya göre fazladır. Bu sonuç olası birkaç faktöre bağlıdır. Öncelikle, MAH'nin katılması polimer zincirine daha fazla hidrofilik fonksiyonel grup sağlar, böylece polimer daha fazla su molekülünü çekebilir. İkincisi, MAH'nin EGDMA ile tepkimesi, oluşan polimerin molekül kütlelerini etkili biçimde düşürür. Böylece, su molekülleri karışık polimer zincirine daha kolay girerler, bu da sulu çözeltide polimerin su alımını artırır.

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin yüzey morfolojisi, elektron mikrografı ile gösterilmiş ve burada açıkça görüldüğü gibi, partiküller, polimerizasyon prosedürü boyunca oluşan gözeneklerden dolayı pürüzlü ve küresel formdadır. Partiküllerin yüzeyindeki gözeneklerin varlığı açıkça bu fotografa görülmektedir. Sonuçta, manyetik poli(EGDMA-MAH) partikülleri, kuru halde, pürüzlü yüzeyden dolayı poroz iç yüzeye sahiptir. Yüzeyin pürüzlülüğü, yüzey alanını artırıcı faktör olarak kabul edilir. Dahası, bu gözenekler difüzyonal direnci azaltır ve kütle transferini artırır. Çünkü yüksek iç yüzey alanına sahiptir.

Polimerik yapıya MAH'nin katılma derecesini belirleyebilmek için, sentezlenen manyetik-poli (EGDMA-MAH) partiküllerin elementel analizi yapıldı. Katılan MAH; azot stokiyometrisi kullanılarak  $70 \mu\text{mol g}^{-1}$  polimer olarak bulundu. Maksimum  $\text{Cu}^{2+}$  şelasyonu ise  $68 \mu\text{mol g}^{-1}$  polimerdir.

Radikal süspansiyon polimerizasyon prosedürü ile genellikle 50-100  $\mu\text{m}$  boyut aralığında küresel formda çapraz bağlı manyetik poli (EGDMA-MAH) mikroküreler üretilir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelerin spesifik yüzey alanı  $80 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  olarak bulundu.

$^1\text{H}$  NMR spektroskopisi MAH'nin yapısı belirlemek için kullanılır. Belirli pikler şu şekildedir:  $^1\text{HNMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=1.99$  (t: 3H  $J=7.08$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.42 (m; 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.56 (t:3H, O- $\text{CH}_3$ ) 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil); 6.86 ( $\delta$ :1H,  $J=7.4$  Hz, NH); 7.82 ( $\delta$ :1H,  $J=8.4$  Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik).

Manyetik pikin manyetik alana olan şiddeti manyetik alana (Gauss) karşı şekil 3.7'de gösterildi.

Dış manyetik alanın uygulanması, örnekte, dış alanda çıkarılan ya da eklenen iç manyetik alan oluşturur. Elektronik manyetik momentle üretilen bölgesel manyetik alan, vektörel olarak dış manyetik alana ( $H_{dış}$ ) eklenir ve bu da bize etkin manyetik alanı verir( $H_{eff}$ ).

$$H_{eff}=H_{dış}+H_{böl} \quad (3.1)$$

Şekil 3.7’de de görüldüğü gibi, manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreler 125 manyetik relatif şiddete sahiptir. Bu değer, polimerik yapının, yapıdaki manyetitten dolayı bölgesel manyetik alana sahip olduğunu gösterir. Şekil 3’te verilen g faktörü, eşlenmemiş elektronlardan dolayı moleküle özgü olarak kabul edilir ve denklem 3.1’den hesaplanabilir. Bilinmeyen sinyal için g faktörünün ölçülmesi sinyalin başlangıcını tanımlamada önemli bir amaçtır. Literatürde  $Cu^{2+}$  için g faktörü (düşük spin ve yüksek spin kompleksi) sırasıyla 1.4-3.1 ve 2.0-9.7 arasındadır. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikroküreleri için g faktörü 2.56 olarak bulundu.

Akış hızı çalışmalarında, akış hızı arttıkça adsorblanan sitokrom c’nin azaldığı görüldü.

Kesikli sistem çalışmaları süresince, adsorpsiyon izotermi adsorpsiyon özelliklerini görmek için kullanılır. Langmuir adsorpsiyon izotermi eşitlik 3.2 ile açıklanır. Sitokrom c’nin denge verilerinin ilgili transformasyonu lineer olarak artar, bu da bize Langmuir modelinin bu sisteme uygulanabileceğini gösterir.

Kütle transferi ve kimyasal tepkime gibi adsorpsiyon prosesinin kontrol mekanizmasına bakılmak istendiğinde, deneysel sonuçlara kinetik modeli uygulanır. Kinetik modeller (yalancı-birinci ve ikinci dereceden denklemler), ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimlerine eşit olduğu kabul edilerek bu sistemde kullanılır. Yalancı birinci ve ikinci kinetik çalışmaların  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  sitokrom c protein derişimi için hesaplanan sonuçlara bakıldığında yalancı birinci dereceden sonuçların daha çok uyduğu görüldü.

Şelatlama prosedürünün zaman alması ve yüksek fiyatlı olması, düşük fiyatlı uygun adsorbentlerin aranmasına yol açmıştır. Basitliği, evrenselliği, kararlılığı ve şelatlayıcı desteğin ucuzluğu IMAK’ın başlıca avantajlarından. Buna ilaveten, IMAK destekleri proteinlere ılımlı koşullar sağlar, biyolojik aktivitelerini korur. Bu çalışmada, sitokrom c’nin saflaştırılmasında metakroilamidohistidin (MAH) içeren yeni metal-şelat afinite adsorbentler kullanılmıştır. Bu yeni metal şelat afinite adsorbentlerin hazırlanmasında kullanılan bu yeni tekniğin diğer geleneksel tekniklere göre birkaç üstünlüğü vardır. Metal



şelatlı adsorbentlerin hazırlanmasında pahalı ve kritik olan basamak şelatlayıcı ligandın adsorpsiyon matriksine bağlanmasıdır. Bu çalışmada, MAH komonomeri metal şelatlayıcı ligand olarak görev görür, dolayısıyla matriksin aktive edilmesine gerek olmaz. Bir diğer önemli olay ise bu kovalent bağlı şelatörlerin matriksten oldukça yavaş salınmasıdır. Adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya neden olan metal şelatlayıcı ligandın salınımı immobilize metal şelat afinite adsorpsiyon tekniğinde önemli bir problemdir. Çok iyi bilinirki adsorbentlerden metal-şelatlayıcı ligand sızması kirliliğe neden olur ve bu da saflaştırılan protein analiziyle girişimde bulunur. Metal şelatlayıcı ligand immobilizasyon basamağı bu yeni teknikte bulunmamaktadır. Metal şelatlayıcı ligand veya MAH komonomeri EGDMA ile polimerize ediliyor ve ligand sızması gibi bir sıkıntı da olmuyor. Manyetik poli(EGDMA-MAH) afinite adsorbentler ucuz, sert kimyasallara ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklıdır.

Manyetik poli(EGDMA-MAH) ve  $\text{Cu}^{2+}$  şelatlı manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorplanan sitokrom c miktarının denge derişimiyle ilişkisini gösteren Şekil 3.9'da görüldüğü gibi, sitokrom c derişiminin artmasıyla birlikte, birim kütle başına adsorplanan sitokrom c miktarı da artmaktadır.  $2.0 \text{ mg ml}^{-1}$ 'de ise doyunluğa ulaşmaktadır. Adsorpsiyon izotermindeki eğimin başlangıç parçası sitokrom c ve  $\text{Cu}^{2+}$  gruplar arasındaki yüksek afiniteyi gösterir. Protein derişimi  $2.0 \text{ mg ml}^{-1}$ 'nin üzerine çıktığında ise eğim sabitlenir. Manyetik poli(EGDMA-MAH) mikrokürelere adsorplanan sitokrom c molekülleri yaklaşık  $51 \text{ mg g}^{-1}$ 'dir. Sitokrom c'nin adsorpsiyon kapasitesi protein molekülleri ve mikrokürelere arasındaki hidrofobik etkileşimden dolayıdır.  $\text{Cu}^{2+}$  şelasyonu, mikrokürelere adsorpsiyon kapasitesini  $222 \text{ mg g}^{-1}$ 'a çıkarır. Bu artışın nedeni şelatlanmış  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları ve sitokrom c arasındaki spesifik etkileşimlerden dolayıdır. Bu etkileşimi sağlayan ise sitokrom c yapısındaki histidin amino asitinin imidazol uzantısıdır. At kalbi sitokrom c'si; 29. konumunda tekli yüzey histidin'e sahiptir ve 33. pozisyonda ilaveten kabul gören histidin vardır (Abudiab ve Beitle, 1998).

Sonuçlarımız, immobilize metal afinite kolon kromatografisinde kullanılan diğer ticari materyallerden elde edilen sonuçlarla ve sitokrom c adsorpsiyonu için kullanılan diğer adsorbentlerle elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında çok iyi bir adsorpsiyonun olduğu bulunmuştur.

O'Brien ve arkadaşları, mikron boyutlu gözenekli olmayan süper paramanyetik aminoalkiltrimetoksisilanlı iminodiasetik asit taşıyan destek/ $\text{Cu}^{2+}$  ile maksimum adsorpsiyon kapasitesini  $35.4 \text{ mg at kalbi sitokrom c g}^{-1}$  polimer olarak bulurken (O'Brien ve ark., 1996), diğer bir çalışmalarında ise  $\text{Cu}^{2+}$  taşıyan poliglutaraldehit kaplı BioMag® süperparamanyetik

demir oksit partiküllerini kullanarak 8.4 mg at kalbi sitokrom c g<sup>-1</sup> polimer sonucuna ulaşmışlardır (O'Brien ve ark., 1997).

Diğer bir araştırmacı grubun yaptığı çalışmada taşıyıcı matriks olarak manyetik agaroz ve immobilize diasetikasit/Cu<sup>2+</sup>'ı metal-şelat biyoligandı olarak kullanmış. At kalbi adsorpsiyon kapasitesini yaklaşık olarak 6 mg g<sup>-1</sup> polimer olarak bulmuşlardır (Abudiab ve Beitle, 1998). Ticari şelatlayıcı sefroz 6B metal-şelat afinite matriks ve kimyevi şekil değiştiren cam taşıyan IDA içeren farklı destekler kullanıldığında ise adsorpsiyon kapasitesini IDA/Cu<sup>2+</sup> cam şekilli adsorbentler için 2-38.2 mg at kalbi sitokrom c g<sup>-1</sup> polimer aralığında bulunmuş. Ticari şelatlayıcı sefroz 6B için 48 mg g<sup>-1</sup> maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır (Seráfica ve ark., 1994).

Zeng ve Ruckenstein (1998); iyi mekanikal özellikte olan ve gözenek boyutu kontrollü, çapraz bağlı makrogözenekli kitosan anyon değiştirici membran kullanmışlar, sonuçları ise 15.5 mg at kalbi sitokrom c ml<sup>-1</sup> sorbent olarak bulmuşlardır. Poliakrilamid fonksiyonlu oldukça gözenekli polisitren kaplı silika katyon değiştirici materyalini kullanıldığında ise ve polimer başına 105 mg bovin kalbi sitokrom c adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır (Lewus ve Carta 1999). Todd ve arkadaşları sitokrom c adsorpsiyonunu TSK Guardjel şelat-5PW makrogözenekli mikrokürelerle yapmışlar ve adsorpsiyon kapasitesini 3.4-12.3 mg ml<sup>-1</sup> jel aralığında bulmuşlardır (Todd ve ark., 1999). Bir başka çalışmada ise, Cu<sup>2+</sup> yüklü poli(2-hidroksietil metakrilat-N metakroil-(L)-histidin metil ester) mikroküreler kullanılmış, maksimum sitokrom c adsorpsiyon kapasitesini 31.7 mg g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur (Emir ve ark., 2004).

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, m-poli(EGDMA-MAH) metal şelatlı afinite mikrokürelerin IMAK desteği olarak kullanılmasında yeterli olduğunu göstermektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Abudiab, T., Beitle, R.R., 1998. Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins. *J. Chromatogr.*, 795: 211-217.
- Akgol, S., Turkmen, D., Denizli, A., 2004. Cu(II)-incorporated histidine-containing, magnetic-metal-complexing beads as specific sorbents for the metal chelate affinity of albumin. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93: 2669-2677.
- Al-Mashikhi, SA., Nakai, S., 1988. Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *J Dairy Sci.* 71: 1756-63.
- Al-Mashikhi, SA., Li-Chan, E., Nakai, S., 1988. Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *J Dairy Sci.* 71: 1747-55.
- Arica, Y., Yavuz, H., Patır, S., Denizli, A., 2000. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *J. Molecular Catalysis B.*, 11: 127-138.
- Bal, W., Kozłowski H., Kasprzak, K.S., 2000. Molecular models in nickel carcinogenesis. *J. Inorg. Biochem.* 79: 213-218.
- Belew, M., Porath, J., 1990. Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography - Effect Of Solute Structure, Ligand Density And Salt Concentration on The Retention of Peptides. *Journal Of Chromatography* 516: 333-354.
- Belew, M., Yip, T.T., Andersson, L., Ehrnstrom, R., 1987. A)High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 164 : p. 457.
- Belew, M., Yip, TT., Andersson, L., Porath, J., 1987. B)Interaction of proteins with immobilized Cu<sup>2+</sup>. Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis. *J Chromatogr.* 403:197-206.
- Bowden, E.F., Hawkridge, F.M., Blount, H.N., 1984. Interfacial Electrochemistry Of Cytochrome-C At Tin Oxide, Indium Oxide, Gold, And Platinum-Electrodes *J. Electroanal. Chem.*, 161: 355- 376.
- Caffrey, M.S., Daldal, F., Holden, H.M., Cusanovich, M.A., 1991. Importance Of A Conserved Hydrogen-Bonding Network In Cytochromes-C To Their Redox Potentials And Stabilities. *Biochemistry.*, 30: 4119-4125.

- Chaouk, H., Hearn, M.T.W., 1999. Examination of the protein binding behaviour of immobilised copper (II)-2,6-diaminomethylpyridine and its application in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of several human serum proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39 (3): 161-177 .
- Cocker, T.M., Fee, C.J., Evans, R.A., 1997. Preparation of magnetically susceptible polyacrylamide/magnetite beads for use in magnetically stabilized fluidized bed chromatography. *Biotechnol. Bioeng*: 53 79-87.
- Davankov, Va., Semechkin, Av., 1977, Ligand-Exchange Chromatography *Journal Of Chromatography* 141 (3): 313-353
- Dickerson, R.E., Timkovich, R., The Enzymes. 1975.(P. Boyer Ed.) Academic Press,. New York. 235-285
- Dunnill, P., Lilly, MD., 1974. Purification Of Enzymes Using Magnetic Bio-Affinity Materials. *Biotechnology And Bioengineering* 16: 987-990.
- El-Rassi, Z., Horvath, C., 1986. Metal Chelate-Interaction Chromatography Of Proteins With Iminodiacetic Acid-Bonded Stationary Phases On Silica Support. *Journal Of Chromatography* 359: 241-253.
- Emir, S., Say, R., Yavuz, H., Denizli, A., 2004. A new metal chelate affinity adsorbent for Cytochrome c. *Biotechnology Progress* 20: 223-228.
- Funk, W.D., Lo, T.P., Mauk, M.R., Brayer, G.D., MacGillivray, R.T.A., Mauk, A.G., 1990. Mutagenic, Electrochemical, And Crystallographic Investigation Of The Cytochrome-B5 Oxidation Reduction Equilibrium - Involvement Of Asparagine-57, Serine-64, And Heme Propionate-7 *Biochemistry.*, 29: 5500-5508.
- Gaberc-Porekar, V., Menart, V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* .,49: 335-360,
- Grisshammer, R., Tucker, J., 1997. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography. *Protein Expression Purif.* 11: 53-60.
- Hansen, P., and Lindeberg, G., 1995. Importance of The Alpha-Amino Group In The Selective Purification of Synthetic Histidine Peptides By Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography. *J. Chromatogr. A* 690: 155-159.
- Hemdan, ES., Porath, J. 1985. Development Of Immobilized Metal Affinity-Chromatography .1. Compariison of 2 Iminodiacetate gels. *Journal of Chromatography* 323 (2): 247-254

- Hochuli, W., Bannwarth, H., Doebeli, R., Gentz and D. Stueber., 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology*, 25: 1321–1325.
- Janson-C., Ryden L., 1997, New York Press. Protein Purification, New York, 375–679.
- Kato, Y., Kitamura, T., Hashimoto, T., 1986. New resin-based hydrophilic support for high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr.* 6: 360-260
- Khossravi, M., Borchardt, R.T., 1998. Chemical pathways of peptide degradation: IX. Metal-catalyzed oxidation of histidine in model peptides. *Pharm. Res.* 15: 1096–1102.
- Krishnamurthy, R., Madurawe, R.D., Bush, K.D., Lumpkin, J.A., 1995. Conditions promoting metal-catalyzed oxidations during immobilized Cu-iminodiacetic acid metal affinity chromatography. *Biotechnol. Prog.* 11: 643–650.
- Leo, C., Nelson, P., Kain, S., Yang, T., 1996. Talon resin offers 6xHis protein purification under native conditions using  $\beta$ -mercaptoethanol as a reducing agent. *Clontec Hniques* 19: 25-37.
- Lewus, R.K., Carta, G., 1999. Binary protein adsorption on gel-composite ion-exchange media. *Aiche Journal*, 45: 512-522.
- Liesiene, J., Racaityte, K., Morkeviciene, M., Valancius P. and Bumelis, V., 1997. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone—effect of ligand density. *J. Chromatogr., A.* 764. 27–33.
- Lindner, P., K. Bauer, A., Krebber, L., Nieba, E., Kremmer, C., Krebber *et al.*, 1997. Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *Biotechniques* 22: 140–149.
- Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brink-Nilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1989. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur. J. Biochem.* 18: 563–569.
- Marchon, J.C., Mashiko, T., Reed, C.A., 1982. Electron-Transport and Oxygen Utilization. (C.H.O. Ed.) North Holland, Elsevier, New York.
- Mezarosova, K., Tishchenko, G., Bouchal K., Bleha, M. 2003. Immobilized-metal affinity sorbents based on hydrophilic methacrylate polymers and their interaction with immunoglobulins. *React. Funct. Polym.*, 56: 27-35.

- Min, C., and Verdine, G.L., 1996. Immobilized metal affinity chromatography of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 3806–3810.
- Mosbach, K., Andersson, L., 1977. Magnetic Ferrofluids For Preparation Of Magnetic Polymers And Their Application In Affinity Chromatography. *Nature* 270: 259-261.
- Munro, PA., Dunnill, P., Lilly, MD., 1977. Non-Porous Magnetic-Materials As Enzyme Supports - Studies With Immobilized Chymotrypsin. *Biotechnology And Bioengineering.*, 19: 101-124.
- Murphy, J.C., White K.I., Willson, R.C., 2000. Nucleic acid separation using immobilized metal affinity chromatography. In. London Press
- Odabasi, M., Uzun, L., Denizli, A., 2004. Porous magnetic chelator support for albumin adsorption by immobilized metal affinity separation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93: 2501-2510.
- O'Brien, S.M., Thomas, O.R.T., Dunnill, P. 1996. Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption. *J. Biotechnol.*, 50: 13-32.
- O'Brien, S.M., Sloane, R.P., Thomas, O.R.T., Dunnill, P., 1997. Characterisation of non-porous magnetic chelator supports and their use to recover polyhistidine-tailed T4 lysozyme from a crude E. coli extract. *J. Biotechnol.*, 32: 54 - 53.
- Oswald, T., Hornbostel, G., Rinas, U., Anspach, F.B. 1997. Purification of (His)<sub>6</sub>EcoRV [recombinant restriction endonuclease EcoRV fused to a (His)<sub>6</sub> affinity domain] by metal-chelate affinity chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25: 109–115.
- Özkara, S., Akgöl, S., Çanak, Y., Denizli, A., 2004. A novel magnetic adsorbent for immunoglobulin-G purification in a magnetically stabilized fluidized bed. *Biotechnol. Prog.*, 20: 1169-1175.
- Porath, J., and Olin, B., 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 22: 1621–1630.
- Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression Purif.* 3: 263–281.
- Raphael, A.L., Gray, H.B., 1991. Semisynthesis of Axial-Ligand (Position-80) Mutants of Cytochrome-C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1038-1040.
- Roskoski, R., Biochemistry. 1996. A Division of Harcourt Brace Company. London



- Sarıkaya, Y., Fizikokimya, 2000. Gazi Kitabevi, Ankara.
- Schäfer, F., Blümer, J., Römer, U., Steinert, K., 2000. Ni-NTA for large-scale IMAC processes—systematic investigation of separation characteristics, storage and CIP conditions, and leaching. *qiagen News*. 11–15.
- Senn, H., Wuthrich, K., 1985. Amino acid sequence, haem-iron co-ordination geometry and functional properties of mitochondrial and bacterial c-type cytochromes. *Q Rev Biophys.*, 18:111-34.
- Serafica G.C., Pimbley, J., Belfort, G., 1994. Protein Fractionation Using Fast-Flow Immobilized Metal Chelate Affinity Membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 21-36.
- Smith, E.L., Hill, R.L., 1985, Cytochromes Principles of Biochemistry, 367-369
- Smith, M.C., Furman, T.C., Ingolia T.D., Pidgeon C., 1988. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography: a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 7211–7215.
- Sulkowski, E., 1985. Purification of Proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* 3: 1-7.
- Sulkowski, E., 1996. A) Immobilized metal-ion affinity chromatography: imidazole proton pump and chromatographic sequelae: I. Proton pump. *J. Mol. Recognit.* 9: 389–393.
- Sulkowski, E., 1996. B) Immobilized metal-ion affinity chromatography: imidazole proton pump and chromatographic sequelae: II. Chromatographic sequelae. *J. Mol. Recognit.* 9: 494–498.
- Todd, R.J., Johnson, R.D., Arnold, F.H., 1994. Protein-Binding To Metal-Affinity Chromatography Supports Involves Coordination At Multiple Sites. *J. Chromatogr. A.*, 662: 13-35
- Tong, X.D., Xue, B., Sun, Y. A., 2001. novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification. *Biotechnol. Progress.*, 17 134-139.
- Tsai, YH., Wang, MY., Suen, SY., 2002. Purification of hepatocyte growth factor using polyvinylidene fluoride-based immobilized metal affinity membranes: equilibrium adsorption study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical and Life Sciences* 766 (1): 133-143.
- Ueda, EKM., Gout, PW., Morganti, L., 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A* 988: 1-23.
- Williams, D.R., 1971. *The Metals of Life: The Solution Chemistry of Metal Ions in Biological Systems*, Van Nostrand Reinhold, London. 86-193.

- Wong, J.W., Albright, R.L., Wang, N.H., 1991. Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography (Imac) Chemistry And Bioseparation Applications: *Sep. Purif. Methods* 20: 325-330.
- Wunderwald, P., Schrenk, W., Port, H., 1982. Removal Of Endoproteinases From Biological-Fluids By Sandwich Affinity-Chromatography With Alpha-2macroglobulin Bound To Zn-Chelate Sepharose. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 363 (9): 948-948
- Zeng, X., Ruckenstein, E., 1998. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *J. Membr. Sci.*, 148: 195-205.
- Zoroddu, M.A., Kowalik-Jankowska, T., Kozłowski, H., Molinari, H., Salnikow, K., Broday L., 2000. Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4, a model of the H4 tail. *Bba. Gen. Subj.* 1475: 163–168.





## 6.ÖZGEÇMİŞ

10.11.1978 yılında Belçika'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Belçika'da lise öğrenimini ise Sivas'ta tamamladı. 1997 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne hazırlık eğitimiyle başlayıp 2002 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2002 yılından beri Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. 2003 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.

