

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİR BOYUTLU SIKIŞTIRILMIŞ SİLİNDİRİK NANO GEOMETRİLERİN,  
POLİPEPTİTLERİN YAPI VE DİNAMİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EYLÜL TUNCEL**

**Mikro ve Nano Teknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice DURAN**

**AĞUSTOS 2015**

**ANKARA**

Fen Bilimleri Enstitü onayı

---

Prof. Dr. Osman EROĞUL

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

---

Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Anabilim Dalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 121611101 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Eylül TUNCEL**'in ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“BİR BOYUTLU SIKIŞTIRILMIŞ SİLİNDİRİK NANO GEOMETRİLERİN, POLİPEPTİTLERİN YAPI VE DİNAMİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ”** başlıklı tezi **12/08/2015** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı :** Doç. Dr. Hatice DURAN .....  
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** Doç. Dr. Gökhan DEMİREL (Başkan) .....  
Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN .....  
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Eylül TUNCEL

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BİR BOYUTLU SIKIŞTIRILMIŞ SİLİNDİRİK NANO GEOMETRİLERİN, POLİPEPTİTLERİN YAPI VE DİNAMİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Eylül TUNCEL

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mikro ve Nano Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Hatice DURAN

Tarihi : Ağustos 2015

Sentetik polipeptitler, proteinlerle olan benzerlikleri ve hiyerarşik olarak kararlı, düzenli konformasyonlara sahip olabilmesi nedeniyle önemli bir polimer grubunu oluştururlar. Polipeptitlerin nanoboyutlu yüzeylerde birçok kullanım alanı olmasına rağmen, buldukları yüzeyin boyutuna bağlı değişen yapı ve dinamik özelliklerini inceleyen çok az rapor bulunmaktadır [1-4]. Nanoporlu alümina (AAO) içindeki makromoleküller, yığınınine göre farklı özelliklere sahip olabileceğinden dolayı bu çalışmada; kendiliğinden organize, hizalanmış, düzgün silindirik nanoporlu AAO membran içine sıkıştırılmış, farklı por çaplarına sahip poli(Z-L-lizin) (PZLL), poli-L-alanin (PA<sub>la</sub>) ve poli-glisin (PGly) nanoçubuklarının yapı ve dinamik özellikleri incelenmiştir. İncelemeler Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR), Katı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (<sup>13</sup>C CPMAS NMR), Geniş Açılı X-Ray Işını Saçılımı (WAXS), Dielektrik Spektroskopisi (DS) teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Nanoboyutta sıkıştırılmış polipeptitlerin yapısal karakterizasyonu sonucunda por çaplarından bağımsız olarak, çoğunlukla alfa-sarmal ikincil yapısına sahip nanoçubuklar (PZLL) ve hem alfa-sarmal hem de beta-tabaka ikincil yapısına sahip nanoçubuklar (PA<sub>la</sub>) gözlenmiştir. Yığın PZLL'nin camsı geçiş sıcaklığı 301 K civarında gözlenirken PZLL nanoçubukların camsı geçiş sıcaklıkları 294 K civarında olup yığınınine göre kısmen daha düşüktür. Sıkıştırılmanın, yerel ve genel polipeptit dinamikleri üzerindeki etkisini gözlemek için DS kullanılmıştır. DS, büyük dipol kuvvetlerini kullanarak yerel ve genel (alfa-sarmal) ikincil yapı gevşemelerine oldukça duyarlı bir araçtır. Sonuçlar; kırık hidrojen bağları ile ilişkili olan

yerel segmentel dinamiklerin nano sıkıştırma üzerinde hızlandırıcı etki yaptığını göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, sıkıştırılmış, bir boyutlu (1D) polimerik malzemelerin kendiliğinden organize olma özelliğinin, termodinamik ve dinamik davranışlarının anlaşılmasının; bu malzemelerden üretilen kontrollü-fonksiyonel cihazların (mekanik güçleri, üretilebilirlikleri, elektronik ve optik özelliklerinin ayarlanabilmesi) rasyonel dizaynı açısından büyük önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Polipeptit, Segmentel Dinamik Özellikleri, Alümina, Anodik Alüminyum Oksit, Nanopor, Sınırlandırılma

## **ABSTRACT**

Master of Science

### **EFFECTS OF ONE DIMENSIONAL CONFINED CYLINDRICAL NANOGEOMETRIES ON STRUCTURE AND DYNAMICS OF POLYPEPTIDES**

Eylül TUNCEL

TOBB University of Economics and Technology  
Institute of Natural and Applied Sciences  
Micro and Nano Technology Science Programme

Supervisor: Associate Professor Dr. Hatice DURAN

Date: August 2015

Synthetic polypeptides are kind of polymers which have a significant role due to their close relation to proteins so as their ability to assemble hierarchically stable ordered conformations. Even though there are many applications of nano-sized polypeptides, there are few reports [1-4] which indicate diameter size dependence on their structural and dynamic behaviors. Since macromolecules in nanoporous alumina (AAO) might have different segmental dynamics compared to bulk, in this thesis, the structural properties and the segmental dynamics of poly (Z-L-lysine) (PZLL), poly-L-alanine (PAla) and poly-glycine (PGly) confined in self-ordered AAO containing aligned and straight cylindrical nanopores as a function of pore size were investigated. This research study was carried out by using Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Solid-State NMR ( $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR), Wide-Angle X-Ray Scattering (WAXS) and Dielectric Spectroscopy (DS). The structural characterization of the nanoconfined PZLL and the nanoconfined PAla revealed the nanorods mostly consist of alpha-helix structure (PZLL) and the nanorods consist of both alpha-helix and beta-sheet structures (PAla) independent of pore diameter. Bulk PZLL exhibits a glass transition temperature ( $T_g$ ) at about 301 K, while PZLL nanorods showed slightly lower  $T_g$  at around 294 K. The dynamic investigation by DS also

revealed a small decrease ( $\sim 4$  K) in  $T_g$  between bulk and nanoconfined PZLL samples. Subsequently, DS have been employed to study the effect of confinement on the local and global polypeptide dynamics. DS is a very sensitive probe of the local and global (alpha-helical) secondary structure relaxation through the large dipole. The results revealed that the local segmental dynamics, associated with broken hydrogen bonds, speed-up on confinement. The results of this study is of paramount importance, since the understanding the self-assembly, thermodynamics and dynamics of soft materials under confinement will allow for their rational design as functional devices with tunable mechanical strength, processability, electronic and optical properties.

**Keywords:** Polypeptides, Segmental Dynamics, Alumina, Anodized Aluminum Oxide, Nanopores, Confinement

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, öğrencilerini her zaman düşünen ve destekleyen hocam Doç. Dr. Hatice Duran'a, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Mikro ve Nano Teknoloji Bölümü öğretim üyelerine ve destekleriyle her zaman yanımda olan anneme (Sema Tuncel), Zehra Oluz'a ve Semih Çetindağ'a çok teşekkür ederim. TOBB ETÜ'ye verdiği burstan dolayı teşekkür ediyorum. Ayrıca bu tez projesine maddi destekte bulunan Max-Planck-Gesellschaft kurumuna (TOBB ETÜ – MPG Partnerlik Projesinden), bu proje kapsamında beni 2 ay misafir edip, enstitüdeki tüm imkanlardan yararlanmamızı sağlayan ve engin bilgileriyle projeye katkı sağlayan Max-Planck Polimer Araştırma Enstitüsü (MPIP), Arayüzeylerin Fiziği bölüm başkanı Hans-Jürgen Butt'a ve University of Ioannina, Fizik bölümünden sayın Prof. Dr. George Floudas'a; MPIP'ye olan 2 aylık ziyaretimde bana destek ve yardımcı olan Dongsheng Wang ve Noemi Encinas Garcia'ya çok teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xiv
KISALTMALAR .....	xv
SEMBOL LİSTESİ .....	xvi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1.Anodik Alüminyum Oksit (AAO) Membranların Hazırlanması .....	3
2.1.1.AAO porlarının temizlenmesi.....	7
2.1.2.AAO por arayüzeylerinin fonksiyonlandırılması .....	8
2.1.3.AAO por infiltrasyonu .....	9
2.2.Polipeptitler .....	12
2.2.1. Polipeptitlerin sentezlenmesi.....	16
2.2.1.1.Yığın sentezi .....	16
2.2.1.2.Yüzeiden başlatmalı polipeptit sentezi .....	20
2.2.2.Sentetik polipeptitlerin nanoyapı oluşumları .....	21
2.2.3.Polipeptidlerin uygulamaları .....	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>28</b>
3.1.Kullanılan Kimyasalar.....	28
3.2.Karakterizasyonda Kullanılan Cihazlar.....	28
3.2.1. Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi .....	28
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	28
3.2.3. Katı-Hal Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi ( <sup>13</sup> C CPMAS NMR) .....	29
3.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	29
3.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC).....	29
3.2.6. Dielektrik Spektroskopisi (DS) .....	30

3.2.7. Geniş-Açı X-Ray Işını Saçınımı (WAXS).....	31
3.3.AAO'nun Hazırlanması.....	31
3.3.1.AAO membranın temizlenmesi.....	33
3.3.2.AAO membranın fonksiyonlandırılması.....	33
3.3.3.AAO membranın infiltrasyonu.....	36
3.4.Monomer Sentezi .....	37
3.4.1.Monomer karakterizasyonu.....	40
3.5.Nanoporlar İçinde Polipeptit Sentezi .....	44
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>47</b>
4.1.Porların İnfiltrasyonu ve Yüzey Morfolojisi .....	47
4.2.Polipeptitlerin Yapıları .....	48
4.3.Polipeptitlerin Termodinamik Özellikleri .....	54
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>63</b>
KAYNAKLAR .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	74

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1: Solda, elektrolit içindeki anodize olmamış Al film; sağda ise Al filmin anodizasyonu ve porların oluşumunun şematik gösterimi [22]. ..... 3
- Şekil 2.2: İki basamaklı anodizasyon yönteminin şematik gösterimi (a) yüksek saflıktaki Al filmin parlatılması (b) Birinci anodizasyon prosesi (c) İlk alumina tabakasının kaldırılması (d) İkinci anodizasyon prosesi [10]. ..... 5
- Şekil 2.3: Kalıp olarak, sıralanmış 2D Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> parçacıklar kullanılarak, iyi düzenlenmiş anodik porlu alüminanın üretilmesinin şematik gösterimi: 1) 2D sıralanmış Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> parçacıklar üzerine Al katman kaplanması, 2) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> /Si 'dan Al tabakanın ayrılması, 3) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> parçacıkların ayrılması, 4) Alüminyumun anodizasyonu a) Si üzerinde 2D sıralanmış Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> parçacıklar, b) Püskürtme ile kaplanmış Al tabakası, c) düzenli sıralanmış konkavlardan oluşan Al tabakası, d) Porlu anodik alümina [11]. ..... 6
- Şekil 2.4: Çok basamaklı anodizasyon ve aşındırma kullanılarak çok katmanlı porlu AAO üretiminin şematik gösterimi. Üç basamaklı anodizasyon ve aşındırma prosesiyle elde edilen üç-katmanlı porların yapısı [12]. ..... 6
- Şekil 2.5: Öncü film filtrasyonu şematik gösterimi ..... 10
- Şekil 2.6: Eriyik kapiler infiltrasyon şematik gösterimi ..... 11
- Şekil 2.7: a) İki ucu ve b) tek ucu açık membranlara uygulanan vakum ile infiltrasyonun şematik gösterimi [32]. ..... 12
- Şekil 2.8: Döndürme yöntemi ile infiltrasyon yönteminin şematik gösterimi ..... 12
- Şekil 2.9: Aminoasitlerin oluşturduğu ikincil yapıların şematik gösterimi: a) α-sarmal, b) anti-paralel β-pilili tabaka, c) paralel β-pilili tabaka [33]. ..... 13
- Şekil 2.10: a) Farklı molekül ağırlıklarında PBLG polipeptitlerinin <sup>13</sup>C CPMAS NMR spektrası [34], b) Farklı molekül ağırlıklarında PALa polipeptitlerinin <sup>13</sup>C CPMAS NMR spektrası [35]. ..... 14
- Şekil 2.11: PBLG, PALa homopolipeptitlerinin ve kopolipeptitlerinin <sup>13</sup>C CPMAS NMR spektrası [36]. ..... 15
- Şekil 2.12: Farklı yapıdaki polipeptitlerin <sup>13</sup>C CPMAS NMR spektrası: a) PBLG homopolimer b) PBLG-PZLL diblok kopolimer c) Kolları PBLG-PZLL diblok kopolimerden oluşmuş üç kollu yıldız kopolipeptit [37]. ..... 16
- Şekil 2.13: (A) NAM (B) AMM ile yüzey polimerizasyonunun şematik gösterimi [43]. ..... 21
- Şekil 2.14: Sıkıştırma yüzeylerinin geometrilerinin şematik gösterimi [51] ..... 22
- Şekil 2.15: a) Yığın PBLG ve b) 25 nm çapındaki PBLG nanoçubukların IR spektrumları. .... 23
- Şekil 2.16: Por çapına göre segmentel relaksasyon zaman değişimleri ..... 24
- Şekil 2.17: Protein yapılarının katlanması ve konformasyonel bozuklukların şematik gösterimi [62]. ..... 27

Şekil 3.1: AAO membran üstten SEM görüntüleri; a) ilk anodizasyon sonrası b) ikinci anodizasyon sonrası .....	32
Şekil 3.2: %3'lük H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> çözeltisinde, 40 V ve 15 °C'deki anodizasyon akım-zaman eğrisi (j-t) (sabit gerilim altında) [63].....	33
Şekil 3.3: AAO membran por yüzeyine (por çapı 60 nm) bağlanan APTES moleküllerinin zamanla değişimi [64].....	34
Şekil 3.4: 3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES) moleküllerinin AAO membran yüzeyine bağlanma aşamalarının şematik gösterimi .....	35
Şekil 3.5: SiO <sub>2</sub> yüzeyine bağlanmış APTES moleküllerinin; a) 15 dakika sonikasyon sonrası b) 30 dakika sonikasyon sonrası c) 45 dakika sonikasyon sonrası AFM görüntüleri ve yüzey pürüzlülük dağılımları.....	36
Şekil 3.6: Monomer sentezi için deney düzeneği.....	38
Şekil 3.7: a) NCA-monomer sentez basamakları, b)NCA-Z-lizin için R grubu ve c) NCA-alanin için R grubu d) NCA-glisin için R grubu .....	39
Şekil 3.8: NCA – Nε-benziloksikarbonil-L-lizin'in <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	41
Şekil 3.9: Nε –benziloksikarbonil-L-lizin – NCA'nın <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	42
Şekil 3.10: NCA –L-alanin'in <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	42
Şekil 3.11: NCA –L-alanin'in <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	44
Şekil 3.12: a,b) Polipeptit nanoçubuklarının polimerizasyonu c)Poli-Z-L-lizin için R gruplarının kimyasal yapısı d) Poli-alanin için R gruplarının kimyasal yapısı. ....	46
Şekil 4.1: PZLL ve PAa nanoçubuklarının farklı por çaplarındaki AAO membran içindeki üstten SEM görüntüleri; a) PAa-200 nm b) PAa-400 nm c) PZLL-35 nm d) PZLL-200 nm.....	47
Şekil 4.2: İçi kısmen polipeptitlerle dolmuş AAO membranlar .....	48
Şekil 4.3: 200 nm por çapına sahip AAO membran içinde PZLL nanoçubukların kesit görüntüsü .....	48
Şekil 4.4: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının <sup>13</sup> C CPMAS NMR spektrumları. ....	49
Şekil 4.5: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAa nanoçubuklarının <sup>13</sup> C CPMAS NMR spektrumları.....	50
Şekil 4.6: Polipeptit zinciri konformasyonunun şematik gösterimi [70]. ....	51
Şekil 4.7: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının IR spektrumları .....	52
Şekil 4.8: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAa nanoçubuklarının IR spektrumları.....	52
Şekil 4.9: Yığın PZLL, P-Ala ve P-Gly polipeptitlerinin IR spektrumu. ....	53
Şekil 4.10: 400 nm ve 25 nm por çapına sahip PAa nanoçubuklarının ekvatorial WAXS şiddet profili.....	54
Şekil 4.11: Yığın PZLL ve 400 nm por çapındaki PZLL nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları. ....	56

Şekil 4.12: Yığın PZLL ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları.....	56
Şekil 4.13: Yığın PAla ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAla nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları.....	57
Şekil 4.14: Farklı por çaplarındaki (400 nm, 65 nm, 35 nm ve 25 nm) AAO membran içinde PZLL nanoçubuklarına ait dielektrik kayıp eğrisi.....	59
Şekil 4.15: 400 nm por çapındaki AAO membran içinde PZLL nanoçubuklarına ait dielektrik kayıp eğrisi ve rahatlama eğrileri.....	59
Şekil 4.16: $\alpha$ -proses ve yavaş proses oluşum bölgeleri.....	60
Şekil 4.17: AAO içindeki PZLL polipeptit zincirlerinin relaksasyon zamanlarının sıcaklığa bağlı değişimi.....	61
Şekil 4.18: DS ölçümlerinden elde edilen $T_g$ 'nin por çaplarına göre değişimi.....	62

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1: Anodizasyon koşullarına göre membran yapı özelliklerinin değişimi.....	18
Çizelge 3. 1: DSC ölçümlerinde kullanılan prosedür.....	46
Çizelge 4. 1: Yığın PAla ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAla nanoçubuklarının erime sıcaklıkları.....	77

## KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
<sup>13</sup> C CPMAS NMR	Katı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
1D	1 boyutlu
2D	2 boyutlu
AAO	Anodik Alüminyum Oksit
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMM	Aktif Monomer ile Polimerleşme
APTES	3-Aminopropiltrietoksisilan
DOPA	3,4-dihidroksifenil-L-alanin
DS	Dielektrik Spektroskopisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektrometresi
HAP	Halka Açılma Polimerizasyonu
NAM	Normal Amin ile Polimerleşme
NCA	N-karboksianhidrit
PA <sub>la</sub>	Poli-L-alanin
PBLG	Poli-γ-benzil-L-glutamat
PE	Polietilen
PGly	Poli-glisin
PTFE	Politetrafloroetilen
PZLL	Poli(Z-L-lizin)
SAM	Kendiliğinden Düzenlenmiş Tekli Katmanlar
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
T <sub>g</sub>	Camsı geçiş sıcaklığı
THF	Tetrahidrofur
VFT	Vogel- Fulcher-Tamman
WAXS	Geniş Açılı X-Ray Işını Saçılımı
Z	N <sub>ε</sub> -benziloksikarbonil

## SEMBOL LİSTESİ

Semboller	Açıklama
$j$	Akım
$t$	Zaman
$T_0$	İdeal camsı geçiş sıcaklığı
$\alpha, \beta$	Geometriye bağlı sabitler
$\delta$	Kimyasal kayma
$\epsilon^*$	Kompleks dielektrik sabiti
$\epsilon'$	Kompleks dielektrik sabitinin reel kısmı
$\epsilon''$	Kompleks dielektrik sabitinin sanal kısmı
$\epsilon_0$	Frekansın sıfır olduğu durumdaki dielektrik sabiti
$\epsilon_\infty$	Frekansın sonsuz olduğu durumdaki dielektrik sabiti
$\lambda$	Dalga boyu
$\tau$	Relaksasyon zamanı
$\tau_0, B$	Polimere bağlı fit paeametresi
$\omega, F$	Frekans



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda metal, seramik ve polimer gibi farklı malzeme türleri kullanılarak nano malzemeler incelenmeye ve üretilmeye başlanmıştır. Nano boyuttaki malzemeler, makro boyuttaki yapılara göre çok daha farklı ve çoğu zaman da daha gelişmiş özellikler göstermektedirler. Bu özellikler sayesinde nanoyapılar; fotonik kristaller [5], biyomedikal uygulamaları [6], katalizör [7], sensör ve plazmon [8] gibi birçok uygulama alanına sahiptir.

Nanotüp, nanoçubuk, nanoküre gibi yapılar, mekanik yöntemler (öğütme, atomizör, ısıtma yöntemi vb.), sol-gel yöntemi, kimyasal buhar çökeltme, moleküler hüzme (beam) epitaksi, atom tabaka çökeltmesi, elektrolitik - elektriksiz çökeltme yöntemleri, kendinden oluşma (self-assembly), litografi yöntemleri, kalıptan sentez gibi birçok farklı teknik ile üretilebilirler. Bu yöntemlerin içinde kalıp kullanılarak nano malzeme sentezi; kullanım kolaylığı ve proses parametreleri değiştirilerek farklı şekillerde homojen nanoyapılar elde edilebilmesi yönüyle öne çıkar [9-17].

Teorik olarak, her türden malzemeden (metaller, polimerler, seramikler, vb.) nanoyapılar elde edilebilir. Ancak, elde edilecek nanoyapının kullanılacağı alandaki uygulamanın amacına uygun olarak malzeme seçimi yapılmalıdır. Polimerler; işleme kolaylığı, biyoyumumluluğu ve hafifliği nedeniyle bütün malzemeler arasında en çok tercih edilen malzemelerdendir. Birçok farklı uygulama alanında kullanılacak farklı özelliğe sahip polimerler vardır. Polipeptitler; kararlı, düzenli, hiyerarşik yapılar oluşturabilmeleri özellikleriyle proteinlere benzerler ve bu yüzden özel polimerlerdir.

Her nanomalzeme üzerinde olduğu gibi, nanoboyutta oluşumun polipeptitler üzerinde de etkileri vardır. Bu etkileri araştırmak, nanoboyutta polipeptitlerinin kullanım alanlarını belirlemek için önemli olmasının yanı sıra, doğal proteinlerin hücre içinde oluşumlarını incelemek için de önem taşımaktadır. Bilindiği üzere, proteinlerin hücre içinde

oluşumları üzerine, makromoleküllerin ve yan duvarların kalabalıklık ve sıkıştırma etkileri vardır. Literatüre bakıldığında, bu etkileri taklit edebilmek ve araştırabilmek için bazı yöntemler kullanıldığı görülür [1, 18-21].

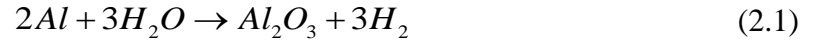
Bu tez çalışmasının amacı polipeptitler üzerine boyutsal sıkıştırmanın etkisini incelemektir. Bu doğrultuda; anodize alüminyum oksit (AAO) kalıp kullanılarak kendiliğinden oluşmuş polipeptit nanoçubuklar sentezlenmiş [poli-Z-L-lizin (PZLL) ve poli-alanin (PAla)], yapısal ve segmentel dinamikleri; nanoçubukların, AAO por çapı ve aminoasit değişimine bağlı olarak incelenmiştir. Termal, yapısal ve dinamik karakterizasyon teknikleri kullanılarak polipeptit nanoçubuklar incelenmiş ve dinamik değişikliklerdeki termodinamik etki, ikincil yapıları ve paketlenme özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

Bölüm 2.1’de; bu çalışmada sıkıştırma için kullanılan nanoporlu anodik alüminyum oksit (AAO) membranların oluşumu ve kullanımı hakkında bilgi verilmektedir. Bölüm 2.2’te polipeptitlerin proteinlerle benzerlikleri, yığın sentezleri, yüzeyden başlatmalı sentezleri, nanoboyutta sentezleri ve kullanım alanları hakkında bilgi verilmektedir. Bölüm 3’te polipeptit nanoçubuklar üzerinde yapılan ölçümlerden bahsedilmiş (yapısal özellikleri için <sup>13</sup>CPMAS NMR, sıvı NMR, FT-IR ve WAXS; termodinamik özellikleri için DSC ve DS ölçümleri) ve Bölüm 4’te de sonuçlar incelenmiştir.

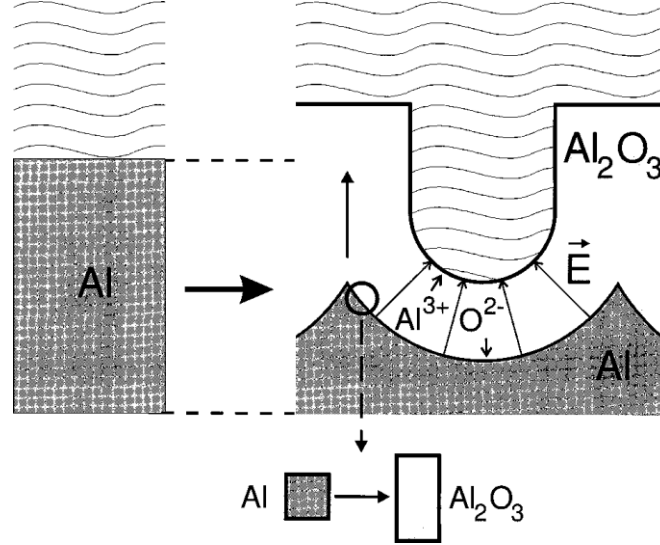
## 2. KURAMSAL BİLGİLER

### 2.1. Anodik Alüminyum Oksit (AAO) Membranların Hazırlanması

Yüksek saflıktaki alüminyumun bir asidik elektrolitik çözelti (sülfürik asit, fosforik asit, oksalik asit, vb.) içinde anodizasyonu ile kendiliğinden düzenlenmiş porlu alümina elde edilir. Alüminyumun anodizasyonu, bir elektrolitik hücre içinde Al'un alüminyum okside ( $Al_2O_3$ ) dönüşmesidir. Elektrolitik hücre içinde gerçekleşen tepkime şu şekildedir:



Oluşan alüminyum oksit, Al atomlarından 2 kat daha fazla hacme sahip olduğundan dolayı gerilim ve genleşme oluşur. Sistem, yüzey enerjisini en aza indirme eğiliminde olduğu için de altıgen dizilimde nanoporlar oluşur (Şekil 2. 1) [22].



Şekil 2. 1: Solda, elektrolit içindeki anodize olmamış Al film; sağda ise Al filmin anodizasyonu ve porların oluşumunun şematik gösterimi [22].

Membranın kalınlığı, por yoğunluğu ve por çapı gibi özelliklerin belirleyen ana parametreler; uygulanan akım, anodizasyon süresi, sıcaklık, kullanılan elektrolit türü ve

konsantrasyonudur. Optimum proses koşullarını belirlemek için, Shawaqfeh ve çalışma grubu [9] ana proses parametrelerine bağlı olarak yapısal özelliklerin nasıl değiştiğini deneysel ve teorik olarak göstermiştir (Çizelge 2. 1).

Çizelge 2. 1: Anodizasyon koşullarına göre membran yapı özelliklerinin değişimi.

Elektrolit tipi	Akım ( $i$ ) (mA/cm <sup>2</sup> )	Por yoğunluğu ( $n \times 10^{-9}$ ) (por/cm <sup>2</sup> )	Oksit film kalınlığı $h(\mu\text{m})$	$A_p/A_t$		Ortalama por çapı <sup>a</sup> , Porların silindirik olduğu varsayılarak ( $\mu\text{m}$ )	
Fosforik asit	10	1.21	36.0	0.3985 <sup>b</sup>		0.205 <sup>b</sup>	0.205 <sup>b</sup>
	15	0.92	66.6	0.3655 <sup>b</sup>		0.225 <sup>b</sup>	0.225 <sup>b</sup>
Sülfürik asit	15	71.0	66.0	0.3203 <sup>b</sup>	0.3287 <sup>c</sup>	0.024 <sup>b</sup>	0.024 <sup>c</sup>
	30	56.3	67.8	0.2243 <sup>b</sup>	0.2188 <sup>c</sup>	0.023 <sup>b</sup>	0.022 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Çap  $(4A_p A_t / (n\pi))^{1/2}$

<sup>b</sup> Değerler, örneklerin kütle ölçümlerinden ve  $\frac{A_p}{A_t} = \frac{m_t - m_p}{m_t}$  formülünden elde edilmiştir.

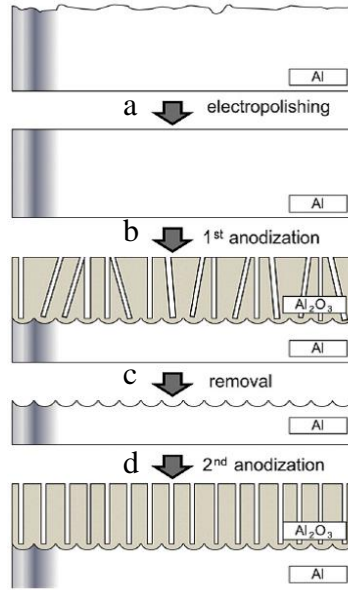
<sup>c</sup> Değerler,  $\frac{A_p}{A_t} = \frac{\pi}{4}(\beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2)$  denklemi kullanılarak elde edilmiştir. ( $\beta_0, \beta_1, \beta_2$  akım yoğunluğuna ve sıcaklığa bağlı parametreler.)

$A_p$ : porların alanı (cm<sup>2</sup>)       $A_t$ : anodize edilmiş alan (cm<sup>2</sup>)

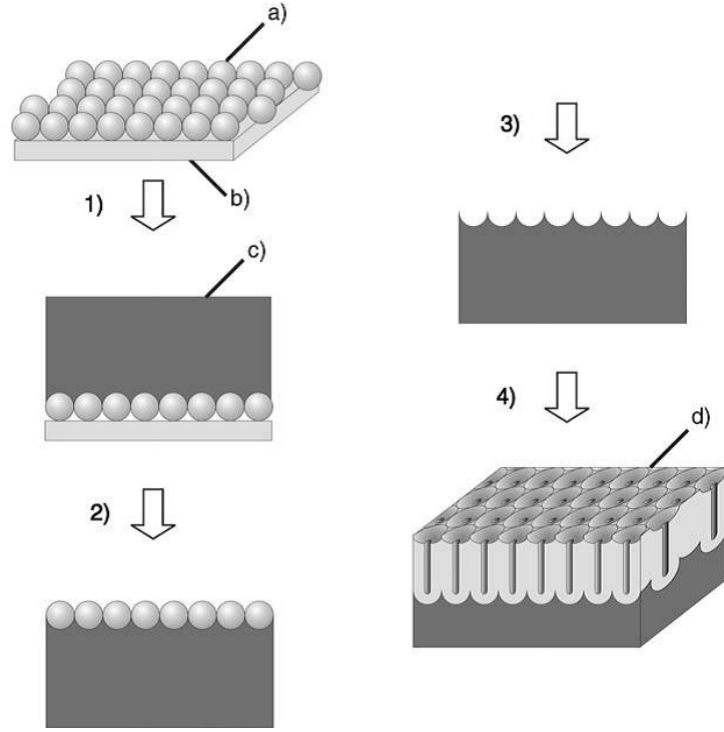
Çizelge 2. 1’de belirtildiği gibi, farklı elektrolitler kullanılarak, por çapları ve yoğunluğu kontrol edilebilmektedir. Diğer koşullar sabit tutulmak üzere; elektrolit olarak fosforik asit seçilirse, por çapı 225 nm olan bir membran elde edilirken, elektrolit olarak sülfürik asit kullanıldığında por çapı 24 nm olarak elde edilir. Uygulanan akım arttırılırsa; iki elektrolit tipi için de daha düşük por yoğunluğu ve daha kalın oksit film elde edilir.

Böylece bütün bu parametrelerin yarattığı değişimler göz önünde bulundurulduğunda, istenilen por çapı ve oksit film kalınlığı ayarlanabilir. Ancak, tüm pratikliğine rağmen bu teknik 20 – 400 nm por çaplarıyla sınırlıdır.

Anodizasyon ile nanoporlu membran üretimi yönteminde; parametrelerin değişiminin, istenilen özelliklerde membran üretmekte önemli bir rolü olmakla beraber, kullanılacak uygulamaya göre gerekli por şekillerinin elde edilebilmesi için doğru metodu seçmek de önemlidir. Şekil 2. 2, Şekil 2. 3, Şekil 2. 4; iki adımlı anodizasyon [10], kalıp olarak, sıralanmış 2D (iki boyutlu)  $Fe_2O_3$  parçacıklar kullanılarak elde edilmiş iyi düzenlenmiş anodik porlu alümina [11], çok basamaklı anodizasyon ve aşındırma kullanılarak çok katmanlı porlu AAO üretimi [12] gibi farklı anodizasyon metodlarını göstermektedir.



Şekil 2. 2: İki basamaklı anodizasyon yönteminin şematik gösterimi (a) yüksek saflıktaki Al filmin parlatılması (b) Birinci anodizasyon prosesi (c) İlk alumina tabakasının kaldırılması (d) İkinci anodizasyon prosesi [10].



Şekil 2. 3: Kalıp olarak, sıralanmış 2D  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  parçacıklar kullanılarak, iyi düzenlenmiş anodik porlu alüminanın üretilmesinin şematik gösterimi: 1) 2D sıralanmış  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  parçacıklar üzerine Al katman kaplanması, 2)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  /Si 'dan Al tabakanın ayrılması, 3)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  parçacıkların ayrılması, 4) Alüminyumun anodizasyonu a) Si üzerinde 2D sıralanmış  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  parçacıklar, b) Püskürtme ile kaplanmış Al tabakası, c) düzenli sıralanmış konkavlardan oluşan Al tabakası, d) Porlu anodik alümina [11].



Şekil 2. 4: Çok basamaklı anodizasyon ve aşındırma kullanılarak çok katmanlı porlu AAO üretiminin şematik gösterimi. Üç basamaklı anodizasyon ve aşındırma prosesiyle elde edilen üç-katmanlı porların yapısı [12].

Yukarıda bahsedilen metodlardan 2-basamaklı anodizasyon (Şekil 2. 2) ve AAO membran üretiminde kalıp olarak sıralanmış 2D Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> parçacıklar kullanımı (Şekil 2. 3) ile kendiliğinden hizalanmış, düzgün silindirik porlar elde edilir. Ancak AAO membran üretiminde kalıp olarak 2D parçacıkların kullanımında anodizasyon öncesinde 2D parçacık sentezi ve bu parçacıkların alt-taş üzerine düzgün olarak dizilmesi işlemleri prosesi uzatmakta ayrıca elde edilen AAO membranın por çaplarını 45 nm'ye sınırlandırmaktadır. Bu yüzden bu iki yöntem karşılaştırıldığında 2-basamaklı anodizasyon metodu daha çok tercih edilebilir durmaktadır.

AAO membran ile elde edilen malzemelerin kullanılacağı uygulamaya göre farklı şekillerde nanoçubuklar elde edilmek istenilebilir. Choi ve grup arkadaşlarının yansıma önleyici film sentezlemek amacıyla geliştirdiği çok basamaklı anodizasyon ve aşındırma tekniği (Şekil 2. 4) ile konik şeklinde nano yapılar elde edilebilmektedir [12].

### **2.1.1. AAO porlarının temizlenmesi**

Porlu membranın üretilmesinden sonra diğer aşamalara geçmeden porların yüzeyindeki istenmeyen safsızlıklardan (membranın üretim aşamasından gelen anyonlar veya diğer kirlilikler) kurtulmak için bir temizleme aşamasına ihtiyaç duyulur. Bunu gerçekleştirebilmek için sıvı kimyasalla temizlik ve kuru temizlik [23] olmak üzere iki ana proses vardır:

- i. Sıvı kimyasalla temizlikte herhangi bir karmaşık cihaza ihtiyaç yoktur, sadece organik kimyasal çözelti ile temizleme işlemi yapılır ve aynı anda çok fazla yüzey temizlenebilir. Bu amaçla kullanılan organik çözücüler, asidik veya bazik olmamalıdır. Alümina amfoterik bir malzeme olduğundan asidik ve bazik çözücülerde çözünürler. Bu yüzden çözücü olarak genellikle etanol, aseton, THF kullanılır. Bu yüzden kuru temizleme işlemine göre daha basit bir uygulaması vardır. Her yöntemde olduğu gibi, bu yöntemin de bazı olumsuz yanları vardır. Bunların başında, çok fazla kimyasal kullanımının gerek çevreye gerekse insan

sağlığına olan olumsuz etkileri gelir. Ayrıca, yüzeyden temizleme için kullanılan çözeltiyi arındırmak için birçok kez su ile durulama gerektirir ve sonrasında da bu suyun yüzeyden uzaklaştırılması gerekmektedir. Suyun kurutma ile uzaklaştırılması düz yüzeylerde sorun teşkil etmese de, bu çalışmada da kullanılmış olan nanoporlu membranlardan suyun tamamen uzaklaştırılması mümkün değildir. Kurutma işleminin süresine, kullanılan vakum basıncına veya sıcaklığa bağlı olmaksızın, kapiler kuvvetten dolayı porlarda mutlaka bir miktar su kalacaktır. Bu nedenlerden dolayı kimyasalla temizleme, nanoyapılı malzemeler için uygun bir yöntem değildir.

- ii. İkinci yöntem olan kuru temizleme yönteminde ise kimyasal buharı (susuz HF), gazlar ( $H_2$ , HCl), iyonlar ( $Ar^+$ ), atomlar (Si), fotonlar (UV) ve plazmalar ( $CF_4$ ,  $O_2$ ) kullanılır [23]. Sıvı kimyasalla temizlemeye göre daha kompleks cihaz kullanımı gerektirmesine rağmen, reaksiyon ürünlerinin yüzeyden uzaklaştırılmasının son derece verimli olması, durulama – kurutma proseslerine gerek olmaması gibi sebeplerden dolayı; özellikle nanoyapılı yüzeylerin temizliğinde daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Oksijen plazma yöntemi AAO membran yüzeyindeki organik kirlilikleri temizlerken aynı zamanda por yüzeyindeki –OH yoğunluğunu da arttırmaktadır. Daha sonra bu –OH grupları yüzey modifikasyon çalışmalarında başlatıcı moleküllerinin porlara daha etkin bağlanmasında önemli bir rol oynayacaklardır.

### **2.1.2. AAO por arayüzeylerinin fonksiyonlandırılması**

Genel olarak, malzemelerin arayüzey özellikleri, son ürün uygulamalarında büyük önem taşımaktadır. Su arıtımı [24], kan temizleme [25], kir tutmayı engelleyici yüzeylerin [26] üretimi, biyoyumlu malzeme üretimi [27] gibi birçok uygulama, malzemelerin arayüzey özelliklerinin değiştirilmesi ile yapılmaktadır.



Fonksiyonlandırma işlemi; yüzeylerin enerji, yük, pürüzlülük, yapışma, biyouyumluluk, hidrofiliklik/hidrofobiklik gibi özelliklerinin istenilen amaca göre yeniden düzenlenmesidir. Bu işlem; gaz (buharlaştırma, kimyasal buhar çökmesi, atom tabaka çökmesi, plazma) veya sıvı faz (kendiliğinden organize olma, polimer aşılama, sol-jel prosesi, elektrolitik ve elektriksiz çökeltme) teknikleri ile yapılabilir [28].

Ito ve çalışma arkadaşları amonyak plazması kullanarak politetrafloroetilen (PTFE)/polietilen (PE) membran yüzeyine amin gruplarını yerleştirerek membran yüzeyini fonksiyonlandırmışlardır [29]. Whitesell ve çalışma arkadaşları ise önce amino-tritriyol çözeltisi ile düz altın yüzeyini fonksiyonlandırmıştır [30]. Ancak fonksiyonlandırmadan sonra yaptıkları polimerleşme adımı; yüzeye bağlanan amin grupları arasındaki uzaklığın yeterli olmadığını ve daha uzun zincirli amino-nonatriyol kullanarak yüzey fonksiyonlandırıldığında polimerizasyonun da daha başarılı olduğunu raporlamışlardır. Bu yüzden fonksiyonlandırmada kullanılacak metodun seçilmesinde kullanılacak fonksiyonel grubun kimyasal yapısı ve boyutu oldukça önem taşımaktadır.

AAO membran kullanılmadan önce porların yüzeyleri Bölüm 2.1.1'de anlatıldığı gibi, temizleme işlemine tabi tutulmuş olursa da bu yeterli değildir. Por yüzeylerinin temizlenmesi, ayrıca monomerlerin por yüzeyine kolay bağlanabilmesi ve yüzey özelliklerinin kontrolü için arayüzeylerin fonksiyonlandırılması gereklidir. AAO membranların yüzeyindeki hidroksil grupları sayesinde bu işlem kolaylıkla yapılabilmektedir.

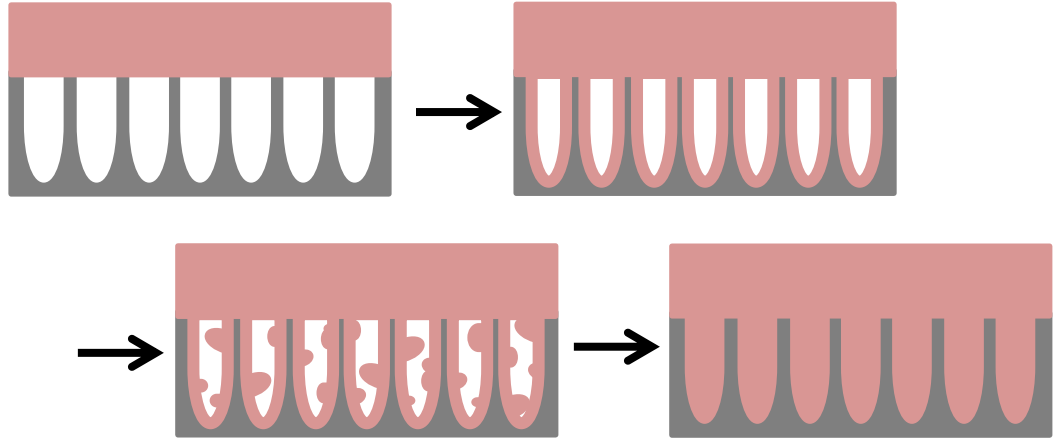
### **2.1.3. AAO por infiltrasyonu**

İstenilen şekillerde nano yapılar elde etmek için kullanılacak kalıbın özelliklerine (yüzey karakteri, iki tarafı açık porlar, tek tarafı açık porlar vb.) göre doğru infiltrasyon metodunu seçmek gerekir.

İnfiltrasyon metotları iki ana gruba ayrılabilir [10, 13] :

1. Por ıslatma ile infiltrasyon: Nanoyapıların oluşturulacağı kalıbın ıslanma özelliklerine dayanan bir yöntemdir. İki olası ıslanma davranışı vardır. Bunlardan biricisi; dolgu yapılacak malzemenin eritilerek bir akışkan damla haline getirilmesi ve damlanın bir denge konumuna gelene kadar yayıldığı, yüksek molekül hareketi olan kısmi ıslanma rejimidir. İkincisi ise; bütün öncü sıvı filmin katı yüzeyin tamamına yayılması ve düşük moleküler hareketliliğin olduğu tam ıslanma rejimidir. Bu infiltrasyon metodu da üçe ayrılabilir:

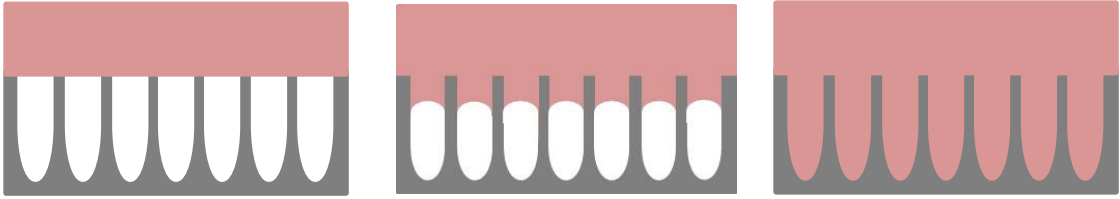
1.1. Öncü film infiltrasyonu: Ergimiş malzemenin kalıp üzerine belirli bir süre için camsı geçiş sıcaklığının<sup>1</sup> oldukça üstünde bir sıcaklıkta yerleştirilmesiyle nanoyapılar elde edilir. Öncü filmin kalınlığına göre, elde edilen malzemenin şekli değişir. Eğer öncü film, nanoporların çapından daha kalın ise katı nanoçubuklar elde edilir; daha ince ise nanotüpler elde edilir (Şekil 2. 5).



Şekil 2. 5: Öncü film filtrasyonu şematik gösterimi

<sup>1</sup> Eriyik halindeki polimerlerde; uzun polimer zincirlerinin rastgele Brownian hareket yapmaları için termal enerjileri oldukça fazladır. Eriyik soğutuldukları, belirli bir sıcaklıkta uzun mesafeli segmentel hareketler durur. İşte bu noktadaki sıcaklık camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) olarak adlandırılır ve polimerin yapısına bağlı olarak değişir. [76]

1.2. Eriyik kapiler infiltrasyon: Bu yöntem, kısa nanoçubuklar elde etmek için kullanılır. Kullanılan malzemenin, kalıp üzerine belirli bir süre için camsı geçiş sıcaklığının çok az üstünde bir sıcaklıkta yerleştirilmesiyle olur. Kısmi ıslanma rejimi şartlarında da kullanılabilir (Şekil 2. 6).

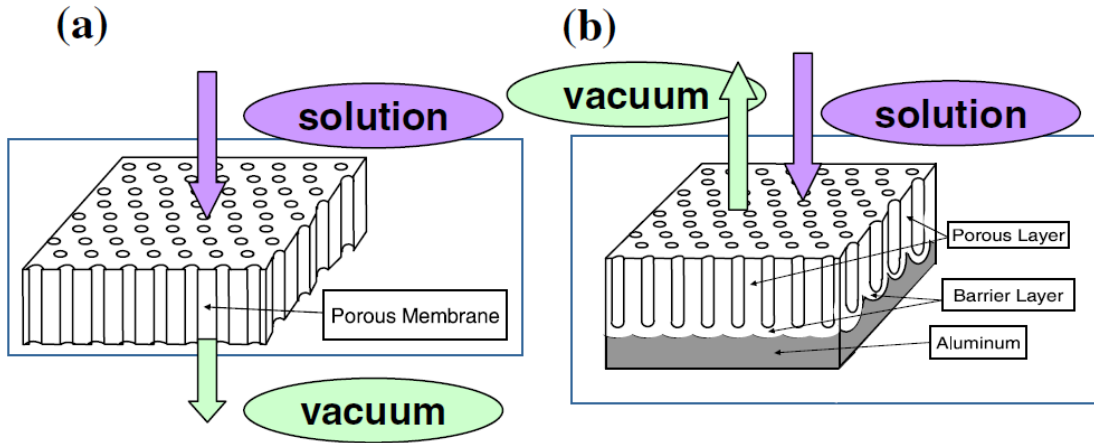


Şekil 2. 6: Eriyik kapiler infiltrasyon şematik gösterimi

1.2. Çözelti ile ıslatma: Nanoyapının elde edileceği malzemenin çözeltisi içine, kalıbın daldırılması ile yapılan bir yöntemdir. Çözeltinin konsantrasyonuna ve bekleme süresine göre nanoteller veya nanotüpler elde edilebilir [31].

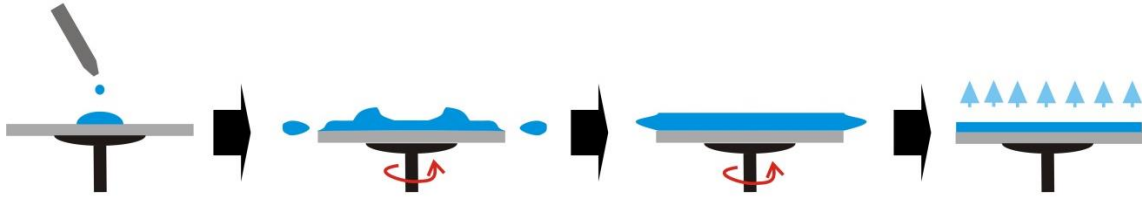
2. Kuvvet uygulanarak infiltrasyon: infiltre edilecek çözeltiliye dışarıdan bir kuvvet uygulanarak yapılan infiltrasyon yöntemidir. Bu dış kuvvetler vakum veya merkezkaç kuvveti olabilir. Malzemenin ıslanma özellikleri yerine; sıvının viskozitesine ve nanoparçacıkların boyutuna bağlıdır.

2.1. Vakum ile infiltrasyon: Dış kuvvet olan basınç değişimini temel alan bir yöntemdir. Avantajlarından biri; bazı büyük nanoparçacıkların bile porları içine filtre edilebilmesidir (Şekil 2. 7) [32]. Bir diğer avantajı ise; porların içerisinde hapsolmuş havayı uzaklaştırırken, eriyik halindeki polimerin, porların içerisine difüzyonu için gerek duyulan boş alanın oluşturulmasına olanak sağlamasıdır.



Şekil 2. 7: a) İki ucu ve b) tek ucu açık membranlara uygulanan vakum ile infiltrasyonun şematik gösterimi [32].

2.2. Döndürme ile infiltrasyon: Bu yöntemde bir dış kuvvet olan merkezkaç kuvveti kullanılır (Şekil 2. 8). Bu yöntem hızlı olmasına karşın porların içerisine doldurulmak istenilen malzemenin alttaş yüzeyinde homojen olmayan bir dağılım göstermesinden dolayı pek tercih edilmez. Ayrıca, çözelti viskozitesi çok iyi ayarlanmalıdır.



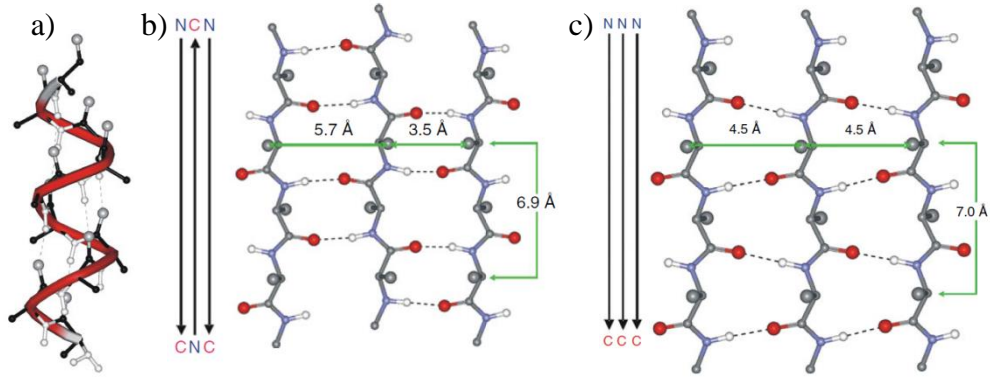
Şekil 2. 8: Döndürme yöntemi ile infiltrasyon yönteminin şematik gösterimi

## 2.2. Polipeptitler

Polipeptitler, proteinlere göre daha kısa zincirli ve doğal polimerler sınıfındadırlar. Proteinler, 20 farklı aminoasidin farklı dizilimleriyle oluşur. Aminoasitler bir araya geldiklerinde oluşturdukları yapıya ve hareketlerine göre proteinlerin biyolojik fonksiyonu da belirlenir. Proteinlerin yapılarıyla, biyolojik fonksiyonları arasındaki ilişkiyi incelemek; gen tedavisi için ilaç tasarımında kullanılacak moleküllerin sentezlenebilmesi için önemlidir.

Proteinlerin oluşturdukları yapılar 4 ana başlık altında incelenir:

1. Birincil yapı: Proteinin veya polipeptit zincirinin aminoasit dizilimlerini gösterir.
2. İkincil yapı: Bir aminoasidin ana zincirindeki karbonil grubuyla diğer aminoasidin ana zincirindeki amit grupları arasında oluşan H-bağlarının oluşturduğu yapılardır.  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -pilili tabaka aminoasitlerin oluşturduğu ikincil yapılardır.  $\alpha$ -sarmal molekül-içi H-bağları ile oluşurken,  $\beta$ -pilili tabaka moleküller-arası bağlar ile oluşur. Her bir aminoasidin oluşturabileceği ikincil yapı belirlidir, iki yapıdan birini veya ikisini de oluşturabilir. Örneğin; lizin aminosidi  $\alpha$ -sarmal ikincil yapısına, glisin  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapısına sahipken, alanin hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapısına sahiptir. İkincil yapı; NMR, IR ölçümleri ile amit bantlarının tayinin yapılmasıyla spesifik olarak belirlenebilir.



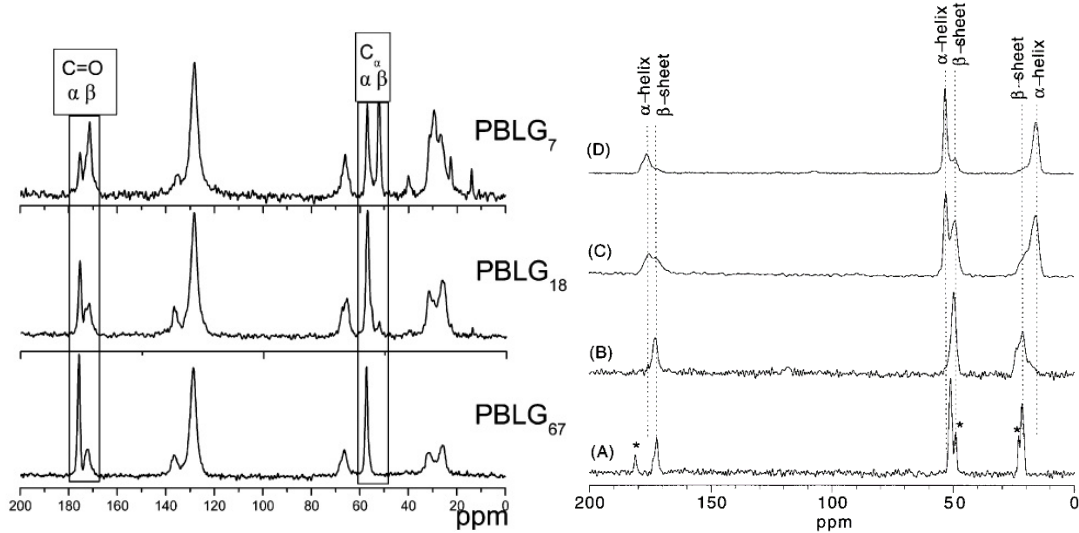
Şekil 2. 9: Aminoasitlerin oluşturduğu ikincil yapıların şematik gösterimi: a)  $\alpha$ -sarmal, b) anti-paralel  $\beta$ -pilili tabaka, c) paralel  $\beta$ -pilili tabaka [33].

3. Tersiyer yapı (üçüncül yapı): İkincil yapısını oluşturmuş proteinin veya polipeptitin katlanmasıyla oluşan üç boyutlu yapıdır. Tersiyer yapının oluşumunda H-bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları ve Van der Waals kuvvetleri etkilidir. Tersiyer yapı tayini X-ray kırınımı metotları ile yapılabilir.

4. Kuaterner yapı (dördüncül yapı): Üçüncül yapıdaki birkaç polipeptit zincirinin birleşerek oluşturduğu üç boyutlu heterojen yapıdır. Kuaterner yapıyı birarada tutan kuvvetler, tersiyer yapıdakiyle aynıdır. Hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, bu yapıyı birarada tutan ana kuvvetlerdir. Proteinin kuaterner yapısı, biyolojik fonksiyonlarını da etkilemektedir.

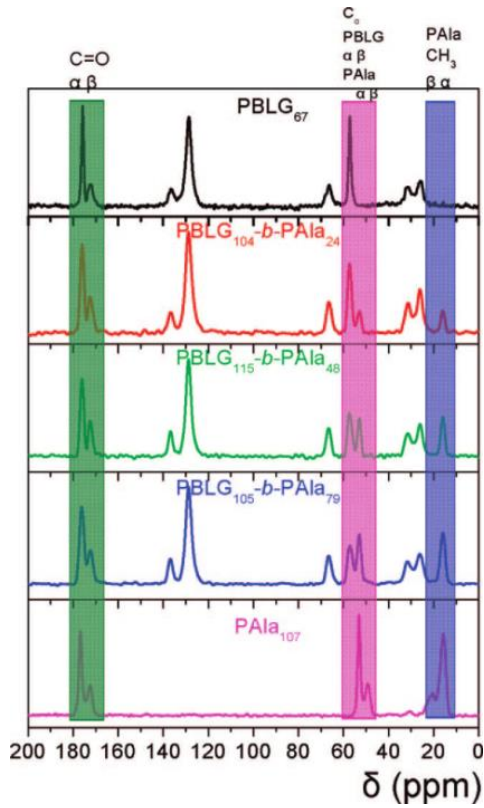
Bu incelemeler, daha küçük ve basit yapıli moleküller olan polipeptitler üzerinden yapılmaktadır. Yığın homo ve hetero-polipeptitlerin yapıları ve dinamik özellikleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır.

Farklı moleköl ağırlıklarında sentezlenen homopolipeptitler üzerinde yapılan araştırmalarda moleköl ağırlığına göre ikincil yapının da değiştii belirtilmiştir. Şekil 2.8.a'da görüldüğü gibi moleköl ağırlığının artması ile poli- $\gamma$ -benzil-L-glutamat (PBLG)'ın ikincil yapısındaki  $\alpha$ -sarmal /  $\beta$ -pilili tabaka oranı artarken [34], Şekil 2.8. b'deki poli-L-alanin (PALa)'ın ikincil yapısındaki  $\alpha$ -sarmal /  $\beta$ -pilili tabaka oranı azalmaktadır [35].



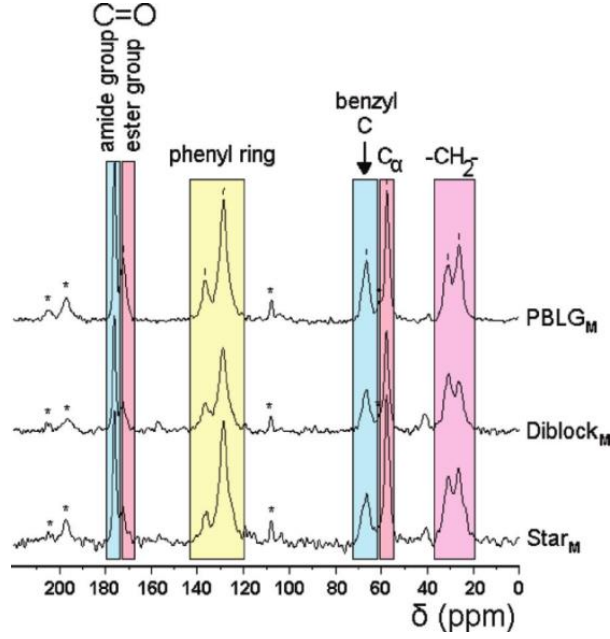
Şekil 2. 10: a) Farklı moleköl ağırlıklarında PBLG polipeptitlerinin  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrası [34], b) Farklı moleköl ağırlıklarında PALa polipeptitlerinin  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrası [35].

Literatürde; yapılan analizler sonucunda PBLG homopolipeptitinin ikincil yapısı  $\alpha$ -sarmal, PAla homopolipeptitinin ikincil yapısı  $\beta$ -pilili tabaka olduğu belirtilmiştir. PBLG-PAla kopolipeptidinin ikincil yapısı  $^{13}\text{C}$  NMR ile incelendiğinde de hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapıları görülmüş ve kopolipeptit içindeki PBLG/PAla oranına bağlı olarak baskın ikincil yapının belirlendiği gözlemlenmiş (Şekil 2.9) [36].



Şekil 2. 11: PBLG, PAla homopolipeptitlerinin ve kopolipeptitlerinin  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrası [36].

Polipeptitlerin zincir yapılarının, ikincil yapılar üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiş, homopolipeptit, diblok kopolipeptit ve üç kollu yıldız kopolipeptitlerin ikincil yapılarının gösterildiği  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarına bakıldığında amit bantları hemen hemen aynı kimyasal kayma değerinde ve şiddetinde olduğu görülmüş (Şekil 2.10) [37].



Şekil 2. 12: Farklı yapıdaki polipeptitlerin <sup>13</sup>C CPMAS NMR spektrası: a) PBLG homopolimer b) PBLG-PZLL diblok kopolimer c) Kolları PBLG-PZLL diblok kopolimerden oluşmuş üç kollu yıldız kopolipeptit [37]

## 2.2.1. Polipeptitlerin sentezlenmesi

### 2.2.1.1. Yığın sentezi

Katı-hal sentezi, çözelti-hal bağlama polimerizasyonu ve halka açılma polimerizasyonu (HAP) gibi birçok teknik polipeptit yığın sentezinde kullanılmıştır. Katı-hal sentezinde; peptit zinciri polimerik desteğe bağlanır ve bu yöntem ile istenilen dizilime sahip polipeptitler elde edilebilir. Ancak her bir monomerin eklenmesi için en az 4 basamak gerektiği için çok zaman gerektiren ve pahalı bir tekniktir, ayrıca bu teknikle düşük molekül ağırlıklı polipeptitler elde edilir [38].

Çözelti-hal bağlama polimerizasyonunda ise; basamaklı polimerizasyon tekniğidir. Önce kısa peptit zincirleri oluşur ve daha sonra da bu kısa zincirli peptitler birleşerek büyük polipeptitleri oluşturur. Kısa dizilimlerin tekrarlandığı polipeptit zincirlerinin

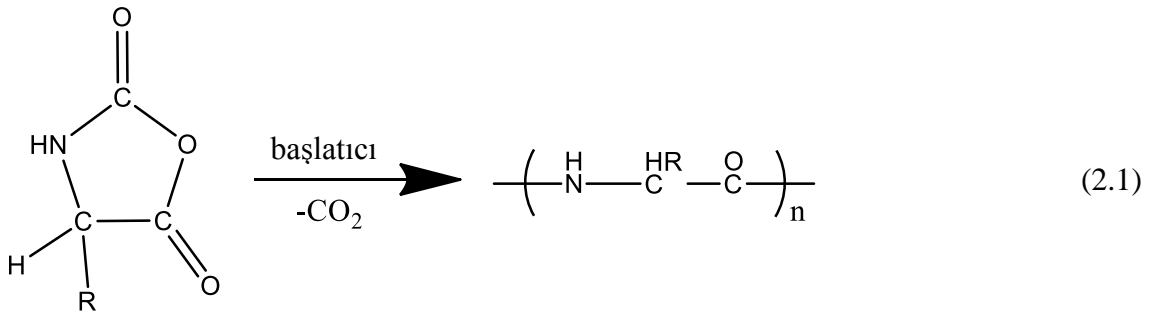


sentezlenmesinde kullanışlıdır. Katı-hal sentez yöntemi gibi bu da pahalı bir yöntemdir ve düşük molekül ağırlıklarında polipeptitler elde edilir [38].

Halka açılma polimerizasyonunda halka yapıda monomerler kullanıldığından polipeptit sentezi için  $\alpha$ -aminoasitlerin N-karboksianhidrit'leri (NCA) kullanılır. Halka açılma polimerizasyonu büyük ölçekli sentezler için kullanılabilir. Monomerler aktif olduğundan zincir büyümesi monomer tükenene kadar devam eder. Bu yüzden de HAP yaşayan polimerizasyonlar sınıfına girer ve molekül ağırlığı dağılımı dardır. Ancak, aminoasit dizilimini ayarlamak kolay olmadığından, daha çok homopolipeptit, rastgele kopolipeptit sentezlerinde kullanılır [39].

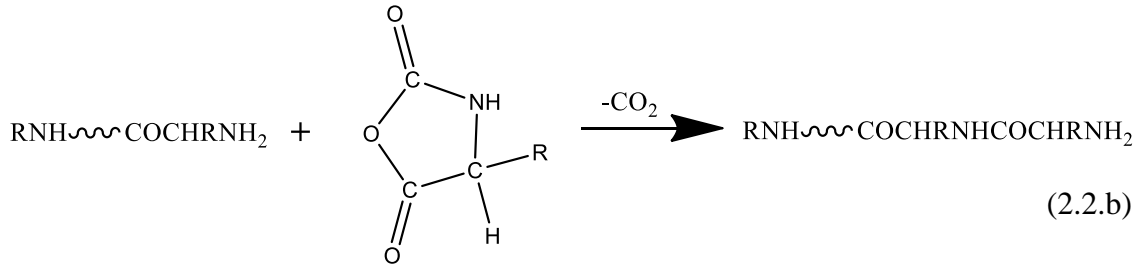
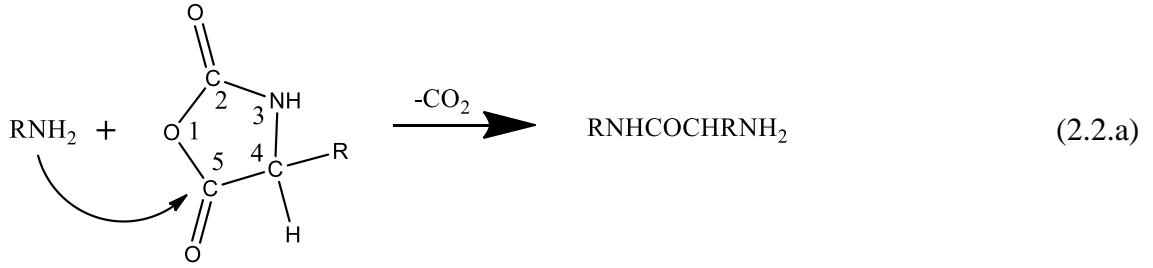
Halka açılma polimerizasyonu, birçok yönden katılma polimerizasyonuna benzemektedir. Ancak, monomerlerin yapısında çift bağ bulundurma zorunluluğu olmaması, polimerizasyonun son aşamalarına doğru yüksek molekül ağırlıklarına ulaşması ve polimerizasyonun denge tepkimeleri üzerinden ilerlemesi sebepleriyle halka açılma polimerizasyonu, katılma polimerizasyonundan ayrılır [40].

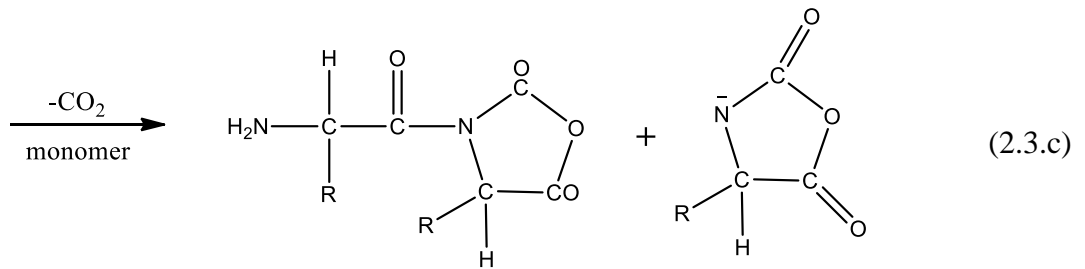
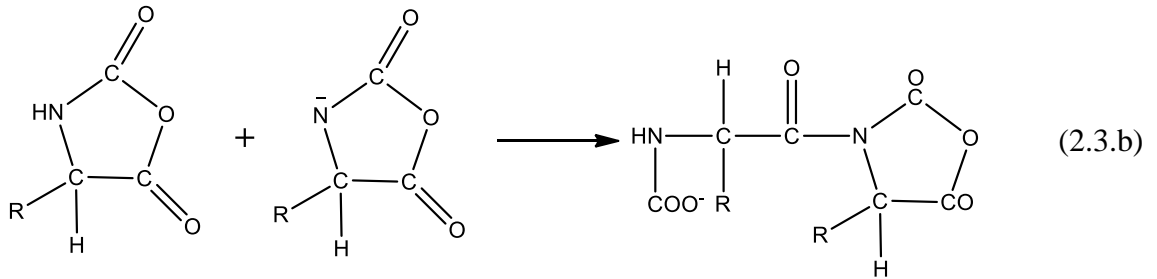
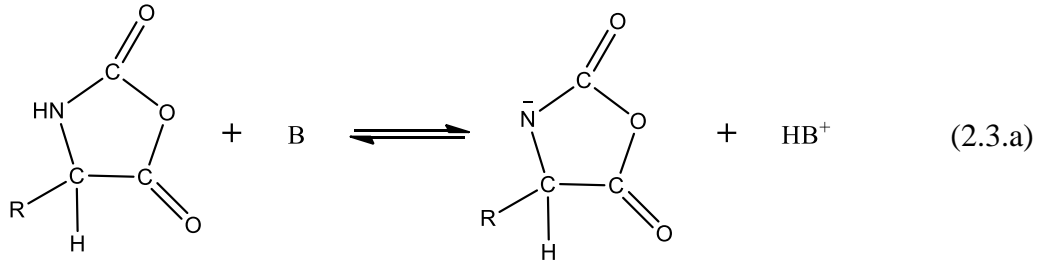
Halka açılma polimerizasyonu baz ya da geçiş metal kompleksleri ile başlatılır. Başlatıcıya bağlı olmadan polipeptitler genel olarak 2.1 nolu tepkimedeki gibi elde edilir. NCA monomerler birbirleriyle bağlandıkça CO<sub>2</sub> gazı açığa çıkmaktadır.



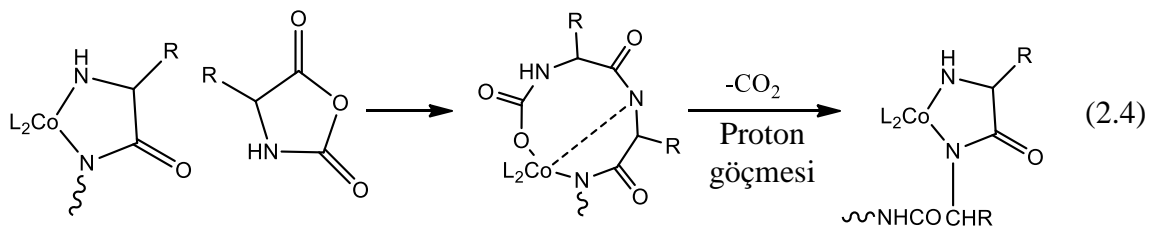
Baz; normal amin veya aktive edilmiş monomer olabilir. Bazın nükleofilikliğine göre ve bazlığına göre mekanizma da değişmektedir. Tepkime 2.2'de normal amin ile polimerleşme mekanizması (NAM), 2.3'te aktif monomer ile polimerleşme

mekanizması (AMM) gösterilmektedir [41]. NAM'da amin başlatıcıdaki azot NCA-monomerinin 5 numaralı karbona bağlanır ve 2 numaralı karbon koparak CO<sub>2</sub> açığa çıkarır (2.2.a) ve monomerlerin aynı şekilde birbirine bağlanmasıyla polimerizasyon devam eder (2.2.b). AMM'de ise; polimerizasyonda kullanılan baz molekülleri, monomerin N'una bağlı H atomunu koparır ve NCA-monomer anyonu oluşur (2.3.a). Böylece aktif monomer molekülleri oluşmuş olur. Aktif monomer molekülleri inaktif monomer moleküllerinin 5 numaralı C atomuna bağlanarak monomer halkasının açılmasına sebep olur (2.3.b). Daha sonra monomer molekülünün azotuna bağlı karboksil anyonu koparak CO<sub>2</sub> gazını açığa çıkarır ve karboksilik grubun koptuğu N atomuna proton transfer edilerek yeni bir monomer anyonu oluşur (2.3.c).





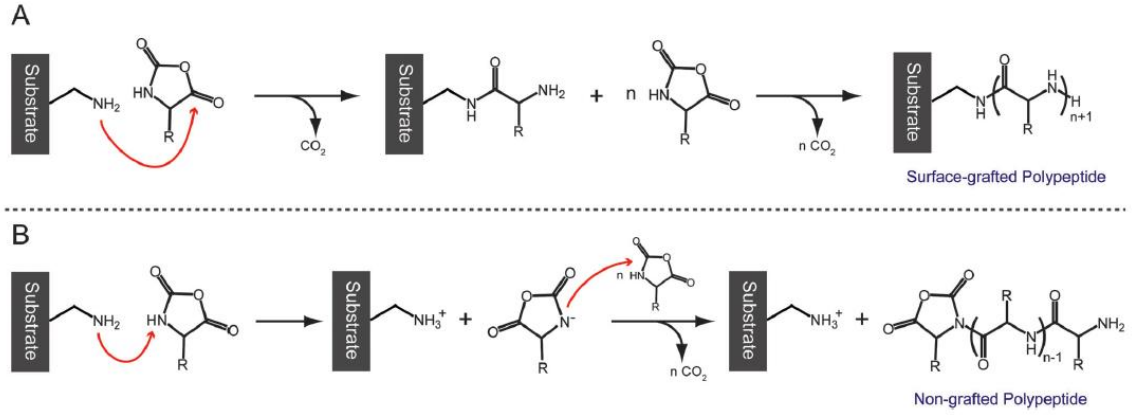
Başlatıcı olarak, geçiş metal elementlerinin kompleksleri kullanıldığında ise metal kompleksteki N, monomerin 5 numaralı C atomuyla tepkimeye girerek önce 10 üyeli, halka yapıda bir ara bileşik oluşturur ve proton yer değiştirmesi ile ucunda 5 üyeli halka yapı bulunan polimer zincirini oluşturur (Denklem 2.4) [41].



### 2.2.1.2. Yüzeyden başlatmalı polipeptit sentezi

Yüzey sentezi; başlatıcıların yüzeye, kendiliğinden düzenlenmiş tekli katmanlar (SAM), plazma uygulaması veya yüzey modifikasyonu ile yerleştirilmesi ve polimerleşmenin yüzeyden başlayarak ilerlemesi ile olur [42]. Çözelti içinde yapılan sentezde (yığın sentezi); fazla zincir transferi oluşması veya yan tepkimelerin sonlanması yüzünden, polimerleşme derecesi oldukça sınırlıdır. Bu yüzden son yıllarda yüzey sentezi daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca, yüzey sentezi ile moleküller yüzeye istenilen yoğunlukta ve düzenlemede bağlanabilir. Ancak başlatıcılar yüzeye yerleştirilirken, moleküller arasındaki mesafeye dikkat edilmelidir. Çünkü moleküller arasındaki mesafe, iki monomerin bağlanabilmesi için yeterli değilse; polimerleşmede beklenen verim elde edilemeyebilir. Bunun en büyük yan etkisi yüzeyde büyüyen polimer zincir yoğunluğunun çok düşük kalmasıdır.

Yüzeye amin başlatıcı yerleştirildiğinde de yığın sentezinde olduğu gibi polimerleşme iki farklı mekanizma üzerinden (NAM ve AMM) gerçekleşir (Şekil 2. 13) [43]. Şekil 2. 13'de de görüldüğü üzere; NAM ile yüzeyden büyüyen polipeptitler elde edilirken, AMM ile yüzeyden bağımsız polipeptitler elde edilir. Bu iki mekanizma aynı anda gerçekleşir. Bu yüzden, istenilen yapıya bağlı olarak kontrollü polimerizasyon yapılmaktadır. Kontrollü polimerizasyon için literatüre bakıldığında; organometalik kataliz ile HAP [44], yüksek vakum düzeneği ile HAP [45], amonyum tuzları kullanılarak HAP [46], ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen HAP [47] tekniklerinin kullanıldığı görülmüştür.



Şekil 2. 13: (A) NAM (B) AMM ile yüzey polimerizasyonunun şematik gösterimi [43].

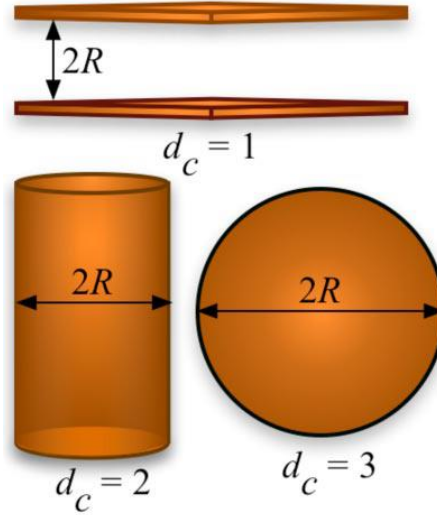
### 2.2.2. Sentetik polipeptitlerin nanoyapı oluşumları

Proteinlerin, doğal ortamlarında yani hücre içindeki konformasyonuna ve katlanma kinetiklerine etki eden başlıca iki etmen vardır. Bunlar; proteinlerin oluştukları çevre içindeki yağlar, karbonhidratlar ve diğer proteinler gibi makromoleküllerin konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan kalabalıklık (crowding) etkisi ve dar boşlukların duvarlarının alan daraltmasından dolayı proteinlerin oluşumu sırasında yaptıkları sıkıştırma etkisidir [48]. Hücre içindeki makromoleküller proteinlerden çok büyük olduğunda, kalabalıklık etkisi sıkıştırma etkisine benzer olabilir.

Yapılan araştırmalarda; bu etmenlerin, proteinlerin yapısı üzerindeki etkilerini taklit edebilmek için çeşitli yöntemler kullanılmış ve gerek teorik çalışmalarla (Moleküler Dinamik (MD) simülasyonlarıyla [49] ve termodinamik hesaplamalarla) [50] gerekse deneysel çalışmalarla [20] test edilmiştir. Yapılan deneylerde proteinlerin yanı sıra polipeptitler [1] de incelenmiştir.

Literatüre bakıldığında; kalabalıklık etkisini incelemek için, sentezlenecek polipeptitin monomer çözeltisine makro moleküller katılarak hücre ortamı sağlanmaya çalışılmıştır [18-20]. Sıkıştırma etkisi için ise; proteinlerin hücre içinde oluşturdıkları yapıları taklit

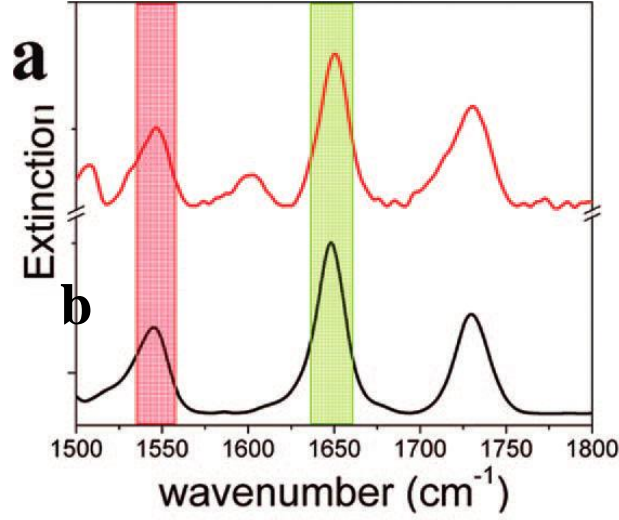
edebilmek adına polipeptitlere bir, iki ya da üç boyutta nano sıkıştırma uygulanmıştır. Bunlar Şekil 2. 14'de de gösterildiği gibi sırasıyla düz iki yüzey arasında sıkıştırma, silindirik yapı içinde sıkıştırma ve küresel olarak sıkıştırma [51] .



Şekil 2. 14: Sıkıştırma yüzeylerinin geometrilerinin şematik gösterimi [51]

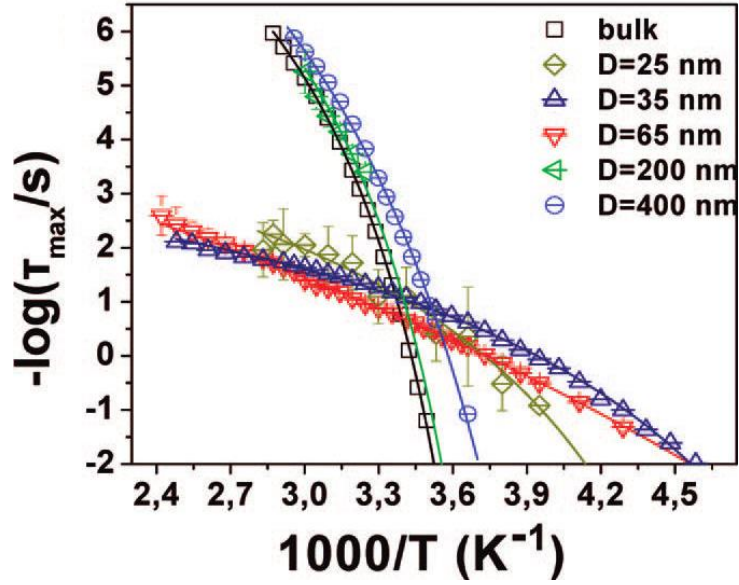
Bu çalışmalar sonucunda; sıkıştırma etkisinin proteinlerin ve polipeptitlerin termodinamik (camsı geçiş sıcaklığı, erime sıcaklığı) ve dinamik (viskozite, yayınlılık) özelliklerini önemli ölçüde etkilediği ve özellikle protein zincirlerinin katlanma kararlılığını arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır [52].

AAO membran içine sıkıştırılmış PBLG polipeptit nano-çubuklarının yapısı ve dinamikleri incelenmiş ve yığın PBLG ile aynı ikincil yapıya sahip olduğu fakat dinamik özelliklerinin değiştiği rapor edilmiştir [1]. Şekil 2. 15'de görüldüğü gibi IR spektrumlarına bakıldığında, yığın PBLG ile PBLG nanoçubuklarının ikicil yapısını gösteren amit bantları her iki spektrumda da  $1650$  ve  $1550 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda gözlenmiştir.



Şekil 2. 15: a) Yığın PBLG ve b) 25 nm çapındaki PBLG nanoçubukların IR spektrumları [1].

Sıkıştırılmış PBLG nanoçubukların segmentel dinamikleri Duran ve çalışma arkadaşları tarafından incelenmiş; yığın polipeptite göre nanoboyuta sıkıştırılmış polipeptitlerin dinamik davranışlarında radikal değişimler gözlemlenmiş ve segmentel relaksasyonlarının sıcaklıkla daha az değiştiğini raporlamışlardır (Şekil 2. 16) [1]. Bunun yanı sıra por çapları 65 nm'nin altına düşürüldüğünde, peptit zincirlerinin relaksasyonlarının sıcaklığa bağlı olarak iki farklı davranış gösterdiği gözlemlenmiştir. Yaklaşık 350 K'in altında peptit yan gruplarının daha mobil olduğu tespit edilirken, bu sıcaklığın üzerinde bazı segment gruplarının ise donmuş olduğu gözlemlenmiştir. Aynı molekül ağırlığındaki yığın ve 400- 200 nm por içerisindeki peptit zincirlerine nazaran 65 nm altına sıkıştırılan peptitlerin  $T_g$  sıcaklığının yaklaşık 50 °C düştüğü yine aynı çalışmada rapor edilmiştir.



Şekil 2. 16: Por çapına göre segmentel relaksasyon zaman değişimleri [1].

Bu tez çalışması kapsamında ise; daha önce rapor edilen nano sıkıştırmanın dramatik etkisinin sadece glutamat türü aminoasitlere mi özgü yoksa glisin, lizin ve alanin gibi aminoasitler için de geçerli olup olmadığını sistematik olarak incelemeyi hedefledik. Bu amaçla sentetik polipeptitler üzerinde sıkıştırma etkisi, nanoporlu AAO membran içine sıkıştırılmış, kendiliğinden organize poli-Z-L-lizin (PZLL), poli-alanin (PAla) ve poli-glisin (P-Gly) nanoçubuklar üzerinde incelenmiştir.

### 2.2.3. Polipeptidlerin uygulamaları

Biyomedikal uygulamalarında kullanılmak üzere proteinler, doğal kaynaklardan ekstrakte edilebilir. Ancak, proteinleri bu şekilde saf olarak elde etmek oldukça zordur ve çok dağılımlı molekül ağırlığı ile elde edilir. Bu yüzden sentetik polipeptitler üzerinde yoğunlaşmıştır. Fazla miktarlarda ve yüksek saflıkta sentezlenebilmeleri, zincir uzunluklarının, bileşimlerinin, yan zincirlerin fonksiyonlarının ayarlanabilmesi sayesinde biyomedikal uygulamalarda kullanımları oldukça avantajlıdır. Hidrojel, yapıştırıcı, gen taşıyıcı, ilaç taşıyıcı olarak ve immünoisitokimyasal belirleme gibi birçok yöntemde polipeptitler kullanılmaktadır.



Hidrojeller; porlu ve sulu yapılarından dolayı, yumuşak doku ve kemik mühendisliği için kullanılmaktadır [53]. Hidrojel sentezinde; jel dayanımı, yoğunluğu, yapışabilme kapasitesi, bozunum hızı gibi faktörlerin ayarlanabilmesi önemlidir. Sentetik polipeptitlerde bu özelliklerin kolaylıkla ayarlanabilmesinin yanında, yapılarının da dokuya uyumlu olarak sentezlenebilmesi açısından diğer polimerlere göre daha avantajlıdır.

Deniz organizmalarının dayanıklı yapıştırıcı bağlarına bakıldığında sadece neme değil, değişen tuzluluk oranına ve geniş sıcaklık aralığında da dayanıklı olduğu gözlemlenmiş ve bu organizmaların salgıları incelendiğinde çoğunlukla 3,4-dihidroksifenil-L-alanin (DOPA) aminoasidi bulunmuş. Literatüre bakıldığında, buradan yola çıkılarak DOPA içeren yapıştırıcılar sentezlendiği görülmüştür. DOPA ve L-lizin içeren kopolipeptitler sentezlenerek neme dayanıklı ve toksik olmayan kuvvetli yapıştırıcılar elde edilmiş [54]. Bu polipeptitlerde; DOPA'nın kimyasal tutunmadan ve kovalent çapraz bağlanmadan sorumlu olduğu, lizinin ise çapraz bağlanmada rol aldığı ve polipeptitlerin suda çözünürlüğünü arttırdığı belirtilmiştir.

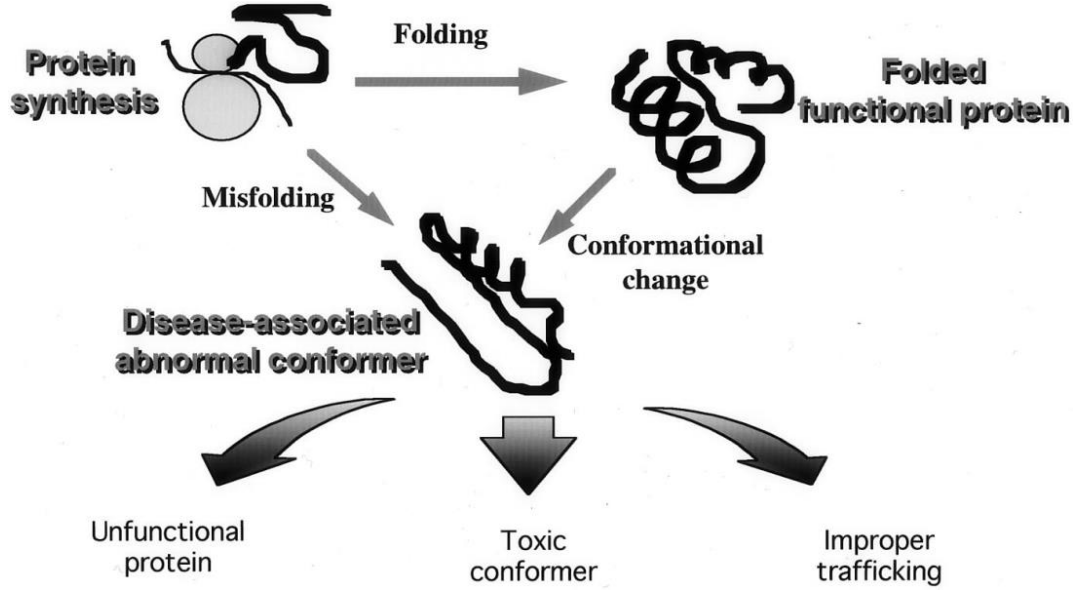
Birçok farklı hastalık için kullanılabilecek gen tedavisinin, reseptör aracılı gen transferi ile yapılabileceği belirtilmiştir. Bu tedavide polikasyon molekülleri ile DNA bir kompleks oluştururlar. Böylece DNA'nın negatif yükleri maskelenmiş olur ve nükleaz degradasyonundan korunur. Ayrıca oluşan kompleksin hücreye girerkenki spesifik bağlanma işlevini de bu poli-kasyon molekülleri yerine getirir. Literatürde, polikasyon molekülleri olarak çoğunlukla poli-lizin kullanılmıştır [55].

Geleneksel immünohistokimyasal belirleme yöntemlerinde; örnekler birçok kez yıkama işlemine maruz kaldığından dolayı hücre sayısında önemli ölçüde azalma olduğu belirtilmiştir. Kranz ve arkadaşları slayt üzerine poli-L-lizin kaplayarak hücreleri sabitlemiş, bir kez yapılan yıkama işlemiyle örnekler safsızlıklardan arındırılmıştır [56].

Böylece hücrelerdeki kaybın azaltıldığı ve ayrıca zamandan da tasarruf edildiği öne sürülmektedir.

Birçok grup tarafından çeşitli polimerler kullanılarak ilaç taşınımı sistemleri tasarlanmıştır. İlaç taşınımında kullanılmak üzere sentezlenen kapsül / jel öncelikle biyouyumlu olmak zorundadır. Polipeptitler, biyouyumlu olmalarının yanı sıra oluşturdukları kararlı ikincil yapılar sayesinde de diğer polimerlere göre kullanımları tercih edilmektedir. Ayrıca, oluşturdukları ikincil yapılar, nano boyutta sentezlenen moleküllerin yapılarının kontrolünü de kolaylaştırmaktadır. Bu doğrultuda birçok grup farklı aminoasitler kullanarak ilaç taşınımı için polipeptitler sentezlemişlerdir [57] [58].

Polipeptitlerin ikincil yapılarının içerisinde buldukları ortama göre ne tür değişiklikler gösterdiğinin araştırılması önemlidir. Örneğin; Alzheimer [59], Parkinson's [60], Huntington's [61] hastalığı gibi nörolojik temelli hastalıklarda sebep olan en önemli etmen olarak; kararlı, çözünür alfa sarmallı peptit zincirlerinin ortam şartlarına (pH, sıcaklık, çözücü, vb.) bağlı olarak çözünmez beta plakalı konformasyonuna dönüşmesi gösterilmektedir (Şekil 2. 17). Bu hastalıklara neden olan protein moleküllerinin safsızlaştırılması ve amorf oldukları için karakterizasyonlarının yapılması oldukça zordur. Bu yüzden hastalıklara neden olan bu proteinler ve buldukları doğal ortamlar sentetik olarak taklit edilerek çalışmalar yapılabilir. Bu tez çalışması da bu tür nörolojik hastalıkların nedenlerinin araştırılabilmesi için gerekli bir ön çalışmadır.



Şekil 2. 17: Protein yapılarının katlanması ve konformasyonel bozuklukların şematik gösterimi [62]

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasalar**

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Tetrahidrofuran (THF) ( $\geq 99,9\%$ ), n-hekzan ( $\geq 95\%$ ), N<sub>e</sub> –benziloksikarbonil-L-lizin (99%), L-alanin (99,5%), bis(triklorometil)karbonat (trifosgen) (99%), sodyum bikarbonat ( $\geq 99,7\%$ ), magnezyum sülfat (99,5%), (3-Aminopropil)trioksilan (APTES) (99%), etanol (absolute,  $\geq 99,8\%$ ), aseton (ACS reagent,  $\geq 99,5\%$ ), hidroklorik asit (ACS reagent, 37%), bakır klorür pentahidrat.

#### **3.2. Karakterizasyonda Kullanılan Cihazlar**

##### **3.2.1. Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (NMR)**

Bu karakterizasyon yöntemi ile polipeptit sentezinde kullanılan N-karboksi anhidrit monomerlerin kimyasal yapılarını doğrulayıp safsızlık analizi yapmak için kullanılmıştır. Ölçümler Bruker AVANCE (300 MHz) cihazı ile yapılmıştır.

##### **3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

AAO membran porlarının içlerinde sentezlenen polipeptit nanoçubuklarına ait görüntüler, LEO Gemini 1530 marka SEM cihazı ile 3,5 nm çözünürlükte, 0,75 – 6 kV elektron hızlandırma voltajı ile alınmıştır. Elde edilen görüntülerle, öncelikle porların polipeptitler ile dolu olup olmadığına bakılmıştır. Serbest polipeptit nanoçubuklarının SEM görüntüleri ise yüzey morfolojisi hakkında bilgi vermektedir.

### **3.2.3. Katı-Hal Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (<sup>13</sup>C CPMAS NMR)**

<sup>13</sup>C CPMAS NMR ölçümleri, Bruker Avanche Spektrometresi ile 125.76 MHz frekansında, oda sıcaklığında yapılmıştır. Bu teknik kullanılarak sentezlenen nanoyapılı polipeptitlerin ikincil yapılarının tespit edilmesi hedeflenmiştir.

AAO membranların arkasındaki alüminyum tabakası CuCl<sub>2</sub> ile aşındırıldıktan sonra geriye kalan alüminyum oksit porlar içindeki polipeptitler toz haline getirilmiştir. Elde edilen yaklaşık 15mg'lık toz örnekler üzerinden analizler yapılmıştır.

### **3.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)**

Toplam Yansıması Azaltılmış Kızılötesi spektroskopisi (Nicolet 730 ATR-FT-IR) ile PZLL ve PAa nanoçubukların ikincil yapı oluşumu incelenmiştir. FT-IR tekniği ile hem polipeptitlerin kimyasal yapısını aydınlatmak, hem ikincil yapıları tespit etmek, hem de peptit zincirlerinin yönelimini ölçmek için kullanılmıştır.

NMR analizleri için yapılan örnek hazırlama prosedürü aynen uygulanmıştır. Elde edilen toz örnek içine KBr katılarak analizler yapılmıştır.

### **3.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)**

Yığın polipeptitlerin ve nano polipeptit çubukların termal davranışlarını analiz etmek için Mettler Toledo Star marka Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) tekniği kullanılmıştır.

Örnekler NMR ve FTIR ölçümlerinde olduğu gibi hazırlanmıştır. Çizelge 3.1'deki prosedür kullanılarak, 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL ve PAa nanoçubukları ve yığınları için ölçümler yapılmış ve DSC termogramları elde edilmiştir.

Ölçümler için 150 µL hacimli Al hermetik kaplar kullanılmıştır. Boş membranlar (membranların silanlamadan sonraki hali) ve polipeptit ile dolu membranlar (membranların polimerizasyondan sonraki hali) tartılarak aradaki kütle farkından porlar

içindeki polipeptit miktarları hesaplanmış ve DSC termogramlarının normalizasyonu için kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1: DSC ölçümlerinde kullanılan prosedür.

	Başlangıç sıcaklığı (°C)	Bitiş sıcaklığı (°C)	Isıtma / soğutma Hızı (°C / dk)
1. Soğutma	25	-140	10
1. Isıtma	-140	150	10
2. Soğutma	150	-140	10
2. Isıtma	-140	150	10
3. Soğutma	150	25	10

### 3.2.6. Dielektrik Spektroskopisi (DS)

Dielektrik Spektroskopisi (DS) ölçümleri polipeptit nanoçubukların elektriksel ve termal özelliklerini ölçmek için kullanılmıştır. Ölçümler 223,15 K'den 413,15 K'e kadar 5'er K arayla, atmosferik basınçta,  $10^{-2}$  –  $10^6$  Hz frekans aralığında; frekans cevap çözümleyicili (Solartron Schlumberger FRA 1260) ve genişbant dielektrik çeviricili Novocontrol BDS sistemi ile yapılmıştır.

Dielektrik Spektroskopisi tekniği; içinde örnek malzemenin bulunduğu kapasitörün boş ve dolu haldeki kapasitansı ölçülerek kompleks dielektrik sabitnin hesaplanmasına dayanır. Sabit sıcaklıkta, değişen frekanslarda uygulanan elektrik alana göre dielektrik sabiti de değişir. Bu ölçümler farklı sıcaklıklarda tekrarlanarak malzemenin elektriksel özelliklerinin yanı sıra termal özellikleri hakkında da bilgi edinilebilir.

Değişen frekansla birlikte; polimer zincirlerinin segmentsel hareketleri, moleküller arası etkileşimler ve ana zincirdeki yan grupların titreşim hareketleri gözlemlenir. Bu hareketlere;  $\alpha$ -rahatlama (düşük frekanslarda) veya  $\beta$ - rahatlama (yüksek frekanslarda), oluşma frekanslarına ise rahatlama frekansı denir. Değişen sıcaklıkla yapılan ölçümler

sonucunda; rahatlama zamanının 100 saniye olduğundaki sıcaklık polimerin camsı geçiş sıcaklığını verdiği saptanmıştır.

### **3.2.7. Geniş-Açı X-Ray Işını Saçınımı (WAXS)**

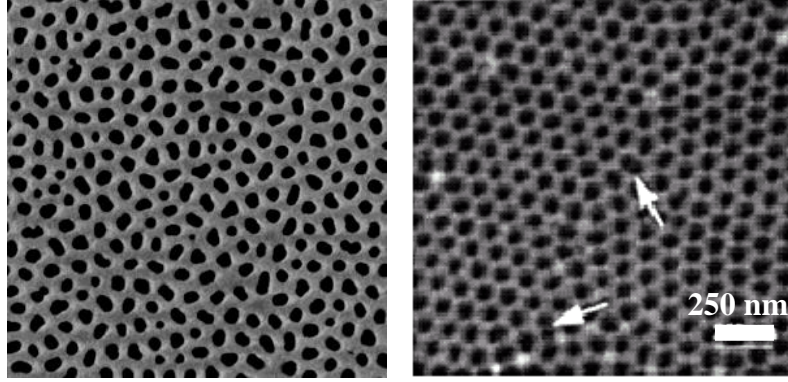
Polipeptitler çoğunlukla amorf bölgelerden oluşsa da bu bölge arasında düzenlenmiş haldeki polipeptit zincirleri de bulunmaktadır. Geniş-Açı X-Ray Işını Saçınımı (WAXS) metodu ile düzenlenmiş polipeptit zincirlerinin kristal yapıları ve paketlenmesi incelenmiştir. Ölçümler iki-boyutlu Siemens A102647 detektörü ve grafit monokromatör ( $\lambda=0.154$  nm) kullanılarak yapılmıştır.

### **3.3. AAO'nun Hazırlanması**

Bu tez çalışmasında sıkıştırılmış polipeptit nanoçubuklarının sentezinde kullanılan 25 nm, 35 nm, 65 nm, 200 nm ve 400 nm por çaplarına ve 100  $\mu$ m por uzunluklarına sahip AAO membranlar; iki basamaklı anodizasyon yöntemi ile Prof. Dr. Martin Steinhart ve grubu tarafından üretilmiştir. Bu yöntemin uygulanmasının amacı daha homojen dağılmış ve tüm kalınlık boyunca düzenli bir şekilde oluşmuş nanoporların elde edilmesidir. Çünkü anodizasyonun ilk basamağında nanoporlar düzgün bir şekilde oluşmaya başlamaz, daha sonraki aşamada daha düzenli (por uzunluğu boyunca aynı genişliğe sahip) olmaya başlar. İlk aşamada bir membranın kalınlığı boyunca farklı şekilde dağılmış, hatta bazı yerlerde kesişmiş nanoporların elde edilmesine neden olur. Bu yüzden ilk anodizasyonda oluşan yeterli düzgünlükte olmayan silindirik nanoporlar yüzeyden uzaklaştırılır, ancak uçları alüminyum tabaka üzerinde kalır. İkinci kez anodizasyon yapıldığında ise nanoporlar bu uçlar üzerinden oluşmaya başlar ve yukarıdan aşağıya aynı düzlükte nanoporlar elde edilir.

İki basamaklı anodizasyonu üzerinde yapılan yapısal incelemelere baktığımızda ilk basamakta elde edilen porlar ile ikinci anodizasyondan sonra elde edilen porlar arasındaki fark oldukça nettir (Şekil 3. 1). İkinci anodizasyondan sonra da porların

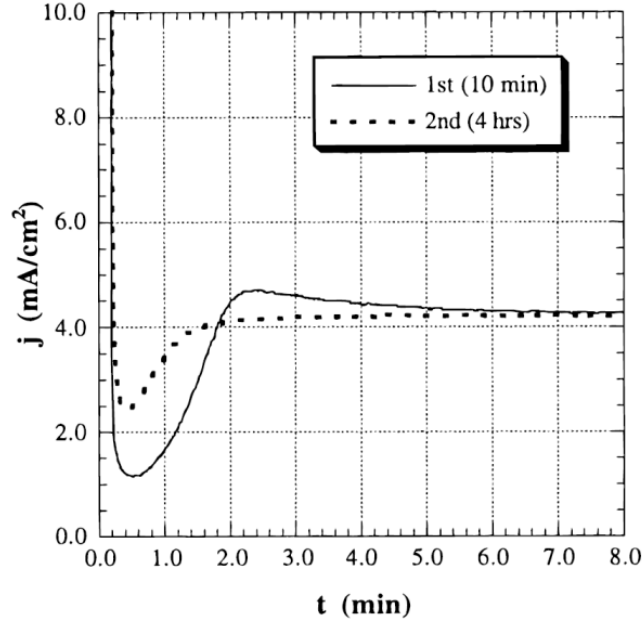
diziliminde bazı hatalar olduğu gör÷lmektedir ancak bu hatalar, tek basamakta anodizasyon ile elde edilen AAO membran porlarındaki gibi oldukça az oranda olmuştur.



Şekil 3. 1: AAO membran üstten SEM görüntüleri; a) ilk anodizasyon sonrası b) ikinci anodizasyon sonrası

Feiyue Li ve çalışma arkadaşları, AAO membran üretimi için kurdukları elektrokimyasal hücre içinde, sabit gerilim altında akımın değişimini incelemiştir (Şekil 3. 2). Sabit gerilim altındaki anodizasyon eğrisinden gör÷ldüğü üzere başta bariyer oksit tabakanın oluşmasıyla zamanla akımda bir düşüş olur. Bu düşüş ilk anodizasyonda daha fazla olur ve artış ikinci anodizasyondakine göre daha geç olur. Bunun sebebi; ilk anodizasyon sonrasında oluşan porların dibinde oluşan oksit tabakanın daha ince olması bu yüzden de direncin daha az olmasından dolayı ikinci anodizasyonda por oluşumunun daha hızlı olmasına bağlamışlardır [63].





Şekil 3. 2: %3'lük  $H_2C_2O_4$  çözeltisinde, 40 V ve 15 °C'deki anodizasyon akım-zaman eğrisi (j-t) (sabit gerilim altında) [63].

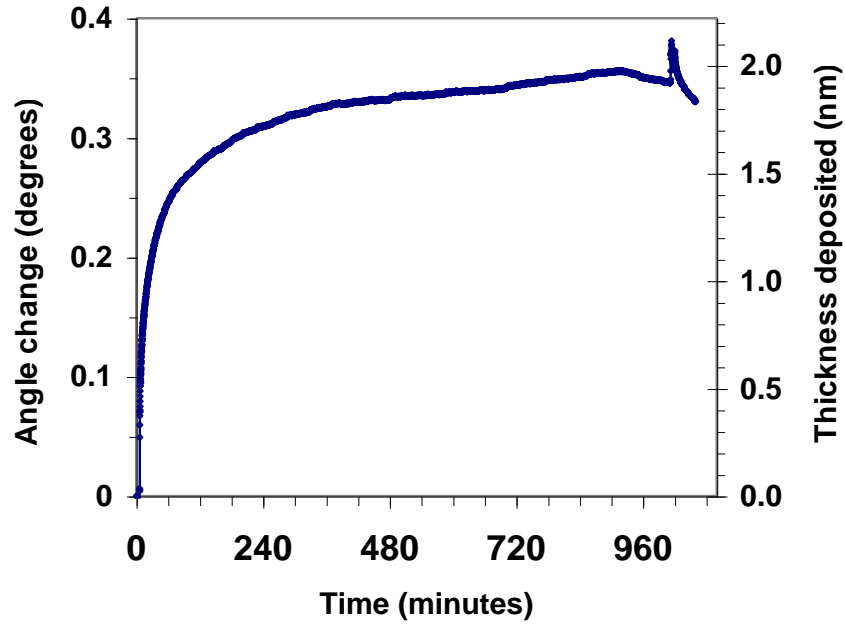
### 3.3.1. AAO membranının temizlenmesi

AAO membran porlarının yüzeyini temizlemek için kuru temizleme yöntemi olan oksijen plazma kullanılmıştır. Tüm boyutlardaki AAO membranlar, 2 dakika boyunca 300 W gücünde, 0,2 mbar vakum altındaki oksijen plazmada bekletilmiştir.

### 3.3.2. AAO membranının fonksiyonlandırılması

Bu tez çalışmasında, yüzey fonksiyonlandırılması için silanlama prosesi seçilmiştir. Silanma için 3-Aminopropiltrioksilan (APTES) kullanılmıştır. Burada; silanın etoksi grupları alüminanın oksit yüzeyine bağlanırken yüzeyin temizliği sağlanmış ve silanın açık ucundaki (yüzeğe bağlanmayan uç) amin grupları da polimerizasyon aşaması için başlatıcı olarak yerleştirilmiştir.

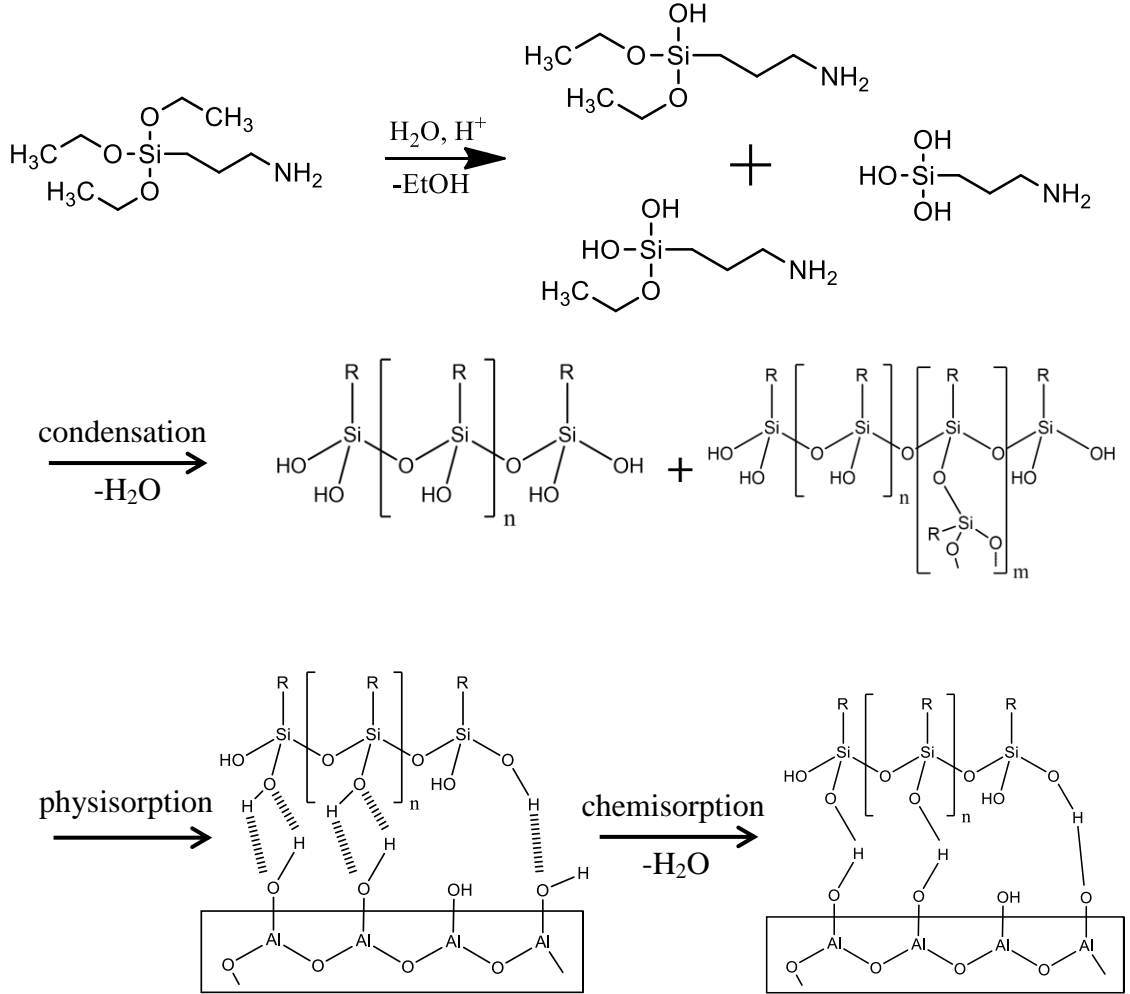
Hazırlanan, etanol içindeki %1'lik (hacimce) APTES (Sigma-Aldrich) çözeltisi 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 0,2 µm por çapına sahip politetrafloroetilen (PTFE) şırınga filtresi kullanılarak filtre edilmiştir. Böylece topaklanmış APTES molekülleri çözeltiden uzaklaştırılır. AAO membranlar hazırlanan APTES çözeltisi içine konularak 6 saat boyunca bekletilmiştir. Silanlama süresi; SPR-OWS (Yüzey Plazmon Rezonans - Optik Dalga Klavuzu) ile in-situ olarak AAO membran porlarına APTES / etanol çözeltisi doldurularak tespit edilmiş ve 6 saatin optimum süre olduğu belirlenmiştir (Şekil 3. 3) [64].



Şekil 3. 3: AAO membran por yüzeyine (por çapı 60 nm) bağlanan APTES moleküllerinin zamanla değişimi [64].

Şekil 3.1'te gösterildiği gibi APTES molekülleri önce hidroliz olur, kendi aralarında kondanse olurlar ve yüzeye kimyasal veya fiziksel olarak birkaç tabaka olarak bağlanırlar. Fiziksel çekim ile bağlanmış kararlı olmayan moleküller ultrasonikasyon yardımı ile yüzeyden koparılır ve geriye 1-2 nm kalınlığında birkaç tabakadan oluşan, yüzeye Si – O kimyasal bağı ile bağlanmış APTES molekülleri kalır. Daha sonra

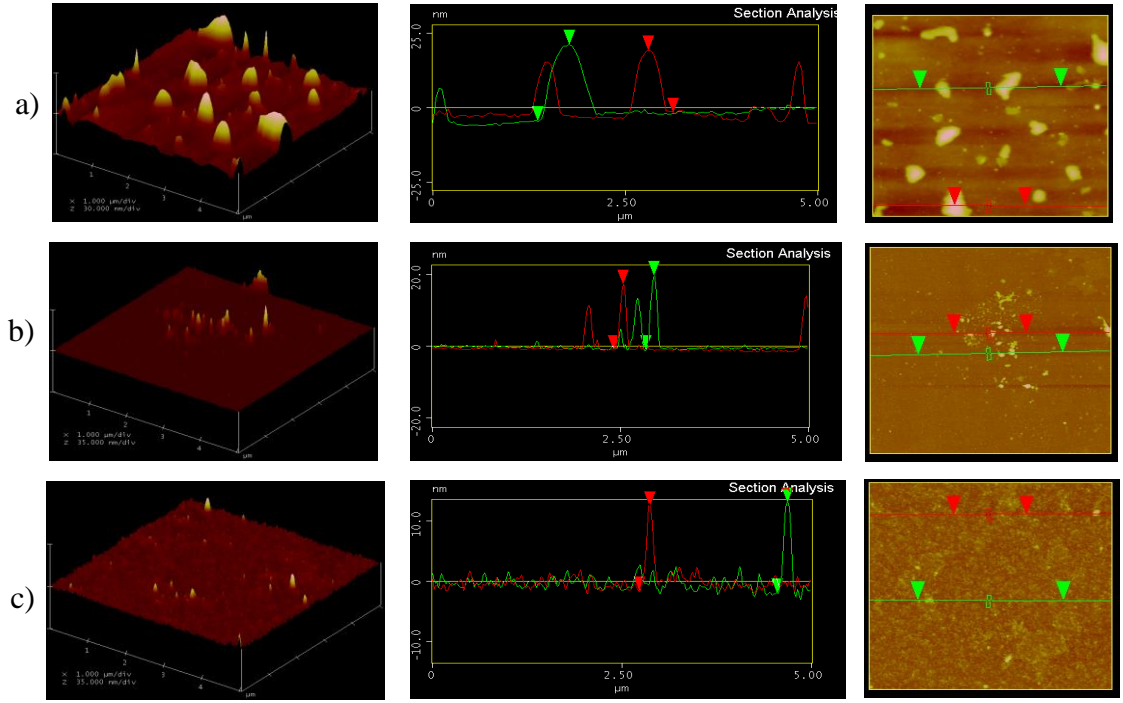
çözücüden tamamen kurtulmak ve yapıların bir şekilde kimyasal bağlanma ile yüzeye sabitlendiğinden emin olmak için AAO membranlar 120°C’de 20 dakika bekletilmiştir.



Şekil 3. 4: 3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES) moleküllerinin AAO membran yüzeyine bağlanma aşamalarının şematik gösterimi.

Kimyasal bağ yapmamış APTES moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılmasındaki sonikasyonun etkisi; SiO<sub>2</sub> yüzeyine bağlanmış APTES moleküllerinin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile incelenmiştir. 15 dakika sonikasyondan sonra moleküllerin hala büyük kitleler halinde yüzeyde bulunduğu, sonikasyon süresi arttırıldığında ise (30

15 dakika ve 45 dakika) yüzeyde toplanmış halde bulunan, fiziksel olarak bağlanmış APTES moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırıldığı görülmüştür (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5: SiO<sub>2</sub> yüzeyine bağlanmış APTES moleküllerinin; a) 15 dakika sonikasyon sonrası b) 30 dakika sonikasyon sonrası c) 45 dakika sonikasyon sonrası AFM görüntüleri ve yüzey pürüzlülük dağılımları.

### 3.3.3. AAO membranının infiltrasyonu

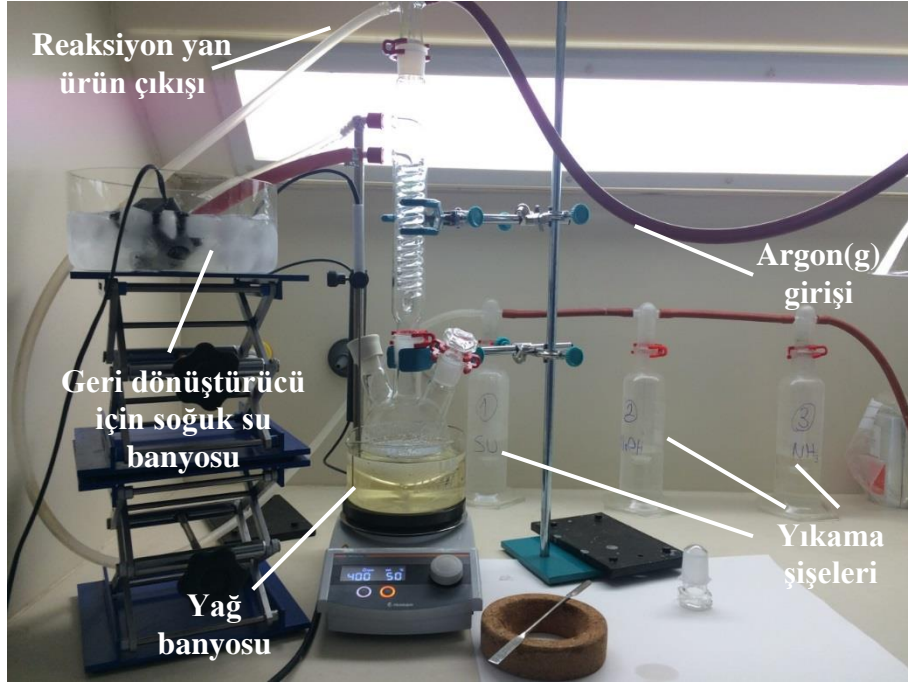
AAO membranlarının üstüne şırınga yardımıyla monomer çözeltisi (125 mM konsantrasyonunda NCA-lizin ve 200 mM konsantrasyonunda NCA-alanin) damlatılmış, çözeltinin porların içine difüz etmesi için birkaç dakika beklendikten sonra buharlaşmayan çözücü vakum ile uzaklaştırılmıştır. Porlar tamamen dolana kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Porların etkin bir şekilde dolduğunu anlamak için iki farklı yöntem kullanıldı.

- a. Doldurulma işleminden önce boş membranlar hassas (0,1 mg hassaslıkta) bir terazide tartıldı. Her doldurma işleminden sonra membran yüzeyleri temizlenip tekrar tartıldı. Ağırlık sabit kalana kadar bu işleme devam edildi. Dolu ve boş membranların arasındaki ağırlık farkından da içinde ne kadar polipeptit olduğu saptanmıştır.
- b. SEM ile membranların üst yüzeylerinden ve kesit görüntülerinden polarin dolu olup olmadığına bakılmıştır.

### **3.4. Monomer Sentezi**

Başlangıç maddeleri ve elde edilen monomer çok reaktif olduğu için tüm sentez Ar(g) ortamında yapıldı. Kullanılan tüm cam malzemeler gece boyunca 160°C sıcaklıkta bekletilerek nemin uzaklaştırılması sağlandı ve Ar(g) altında oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Ayrıca, reaksiyonda çözücü olarak kullanılan THF, bir gece önce 160°C'de bekletilerek aktiveleştirilen moleküler elek yardımıyla kurutuldu. Böylece, hem nemin, hem de O<sub>2</sub>(g)'in kimyasallarla verebileceği olası reaksiyonlar önlenmeye çalışıldı.

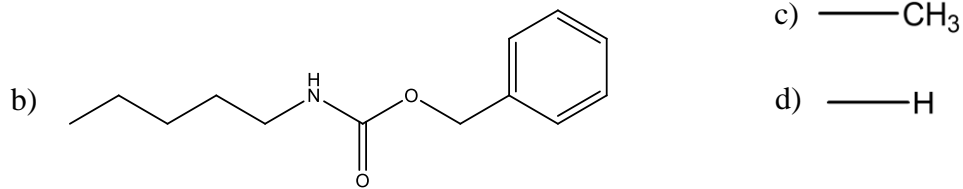
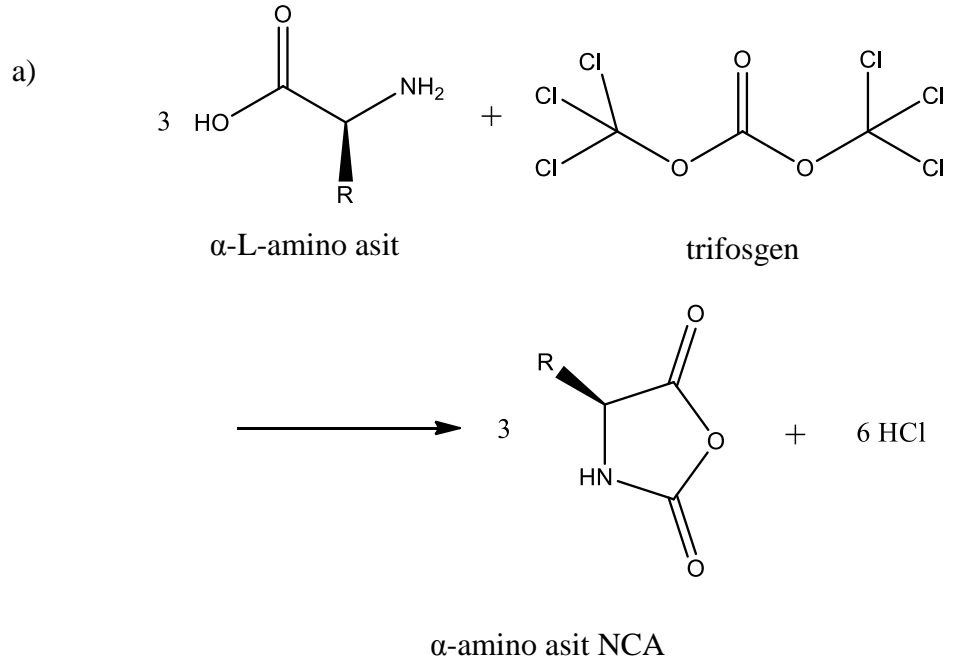
Reaksiyon; geri yoğunlaştırıcı bağlı 3-boyunlu balon içinde, Ar(g) altında yapıldı. Reaksiyon düzeneğine sürekli Ar(g) verilirken bir yandan çıkan gazın sırasıyla su, sodyum hidroksit çözeltisi ve amonyak çözeltisi dolu yıkama şişelerinden geçirilerek HCl ve fosgen'in tutulması sağlandı (Şekil 3. 6).



Şekil 3. 6: Monomer sentezi için deney düzeneği.

Halka Açılma Polimerizasyonu (HAP) kullanılarak yapılan polipeptit sentezi için N-karboksianhidrit (NCA) – aminoasit monomerler sentezlenmiştir. Bu tez çalışmasında; Daly ve Poche'un raporladığı yöntem ile [65] N<sub>ε</sub>-benziloksikarbonil-L-lizin ve L-alanin sentetik aminoasitlerinin N-karboksianhidrit'leri sentezlenmiştir.

150 mL kuru THF içinde 5 g başlangıç maddesi (N<sub>ε</sub>-benziloksikarbonil-L-lizin veya L-alanin) çözülene kadar karıştırılmış, 50°C'ye gelince reaksiyon ortamına 1:3 oranında trifosgen (Z-L-lizin için 1,8 g; L-alanin için 5,55 g; glisin için 6,6 g) eklenmiştir. Çözelti şeffaf hale gelene kadar (3-5 saat) reaksiyon sürdürülmüştür. Başlangıç maddesi; trifosgen ile tepkimeye girerek NCA-aminoasitleri oluşturmuştur (Şekil 3. 7), bu sırada HCl açığa çıkmaktadır.



Şekil 3. 7: a) NCA-monomer sentez basamakları, b)NCA-Z-lizin için R grubu ve c) NCA-alanin için R grubu d) NCA-glisin için R grubu.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra safsızlaştırma için reaksiyon çözeltisi, önce su sonra sodyum bikarbonat çözeltisi (0,75 g NaHCO<sub>3</sub> / 150 mL su) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi öncesi hem monomer çözeltisi hem de yıkama çözeltileri 0°C' in altına kadar soğutulmuştur. Su ile reaksiyon sonucu açığa çıkan HCl ve tepkimeye girmemiş başlangıç maddesinin; sodyum bikarbonat çözeltisi ile de tepkimeye girmemiş trifosgen ve trifosgenin bozunmasıyla oluşmuş olabilecek fosgenin çözeltden yıkanması amaçlanmıştır. Hem monomerin saf elde edilmesi açısından, hem de monomerin su ile etkileşimde olduğu tek basamak olduğu için tüm sentez boyunca dikkat edilmesi gereken en önemli basamaktır. Sentez sırasında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri olan yıkama sırasında faz ayırımının net olarak gözlemlenememesi problemi oluşmuştur. Monomer çözeltisi ve yıkama çözeltisi karışımına, su tutucu özelliği olduğu bilinen

magnezyum sülfat eklenerek bir miktar faz ayrımı gözlemlenmiş, bir miktar suyun da magnezyum sülfat ile tutulması sağlanmıştır. Ancak bu aşamada harcanan zaman boyunca monomerin su ile etkileşimde olması ve magnezyum sülfat ile bir miktar monomerin de atılması hem verimi düşürmüştür, hem de monomerin bozunma riskini arttırmıştır.

Yıkanan monomer çözeltisi berrak olarak elde edildikten sonra çözücünün bir kısmı (1/3'ü kalacak şekilde) dönen buharlaştırıcıda 40°C'de basınç adım adım düşürülerek buharlaştırılmıştır. Daha sonra n-hekzan ile kristalizasyon yapılarak gece boyunca buzlukta bekletilmiştir. Ertesi gün, nuçe erleni yardımıyla kristaller çözeltiden toplanmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanıp en son elde edilen toz monomer gece boyunca vakum altında kurutulmuştur.

NCA – L-alanine sentezi sırasında oluşan başka bir sorun ise Sigma-Aldrich'ten satın alınan L-alanin'in THF içindeki çözünürlüğünün az olması idi. Bu problemi çözebilmek için seramik havan yardımı ile iri kristaller halindeki L-alanin katı parçacıkları toz haline getirilmiştir. Bu şekilde çözünürlükte gözle görülür bir artış elde edilmiştir.

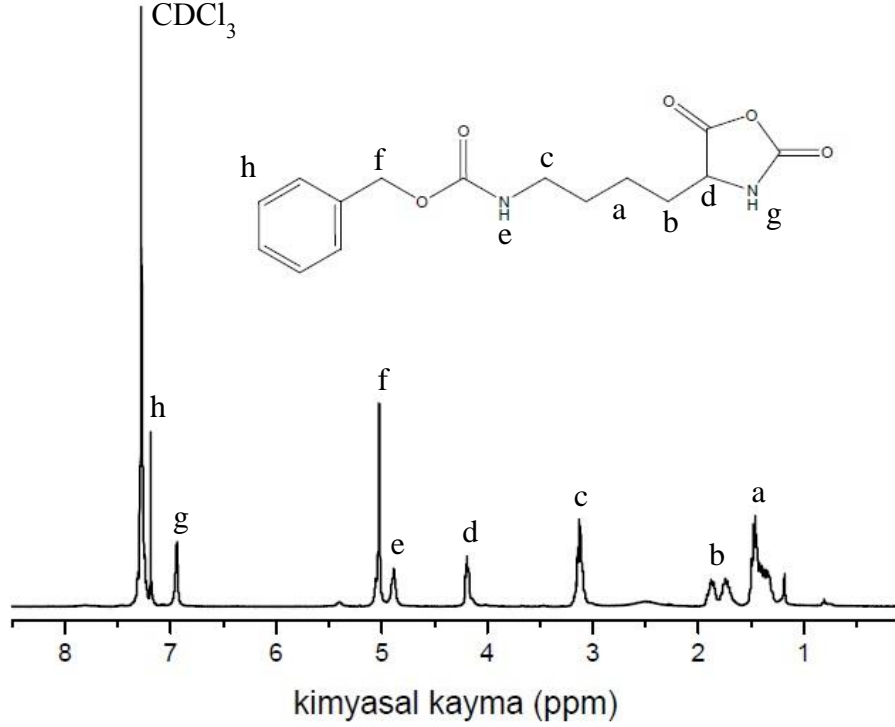
NCA-Glisin sentezi laboratuvarımızda başarılı bir şekilde gerçekleştirilememiştir. Glisin polipeptit sentezinde yaygın olarak kullanılan hiçbir çözücüde (THF, DMF, etilasetat) çözünmemiştir. Literatüre baktığımızda ağırlıklı olarak bu çözücülerin kullanıldığı görülmüştür. Bunun yerine, NCA-Glisin monomeri Isochem S.A.S (Lavoisier, Fransa) firmasından yüksek saflıkta satın alınmıştır.

### **3.4.1. Monomer karakterizasyonu**

Elde edilen monomerlerin  $^{13}\text{C}$  ve  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarına bakılarak, dönüşümün tamamlandığı ve saf olarak elde edildikleri gösterilmiştir. NCA-N-Z-L-lizin'in  $\text{CDCl}_3$ 'de alınan proton NMR'ına (Şekil 3. 8) bakıldığında genel kimyasal yapısındaki tüm protonların pikleri gözlemlenmiştir ( $^1\text{H NMR (CDCl}_3 \text{ 400 MHz): } \delta \text{ (ppm) 1.58}$

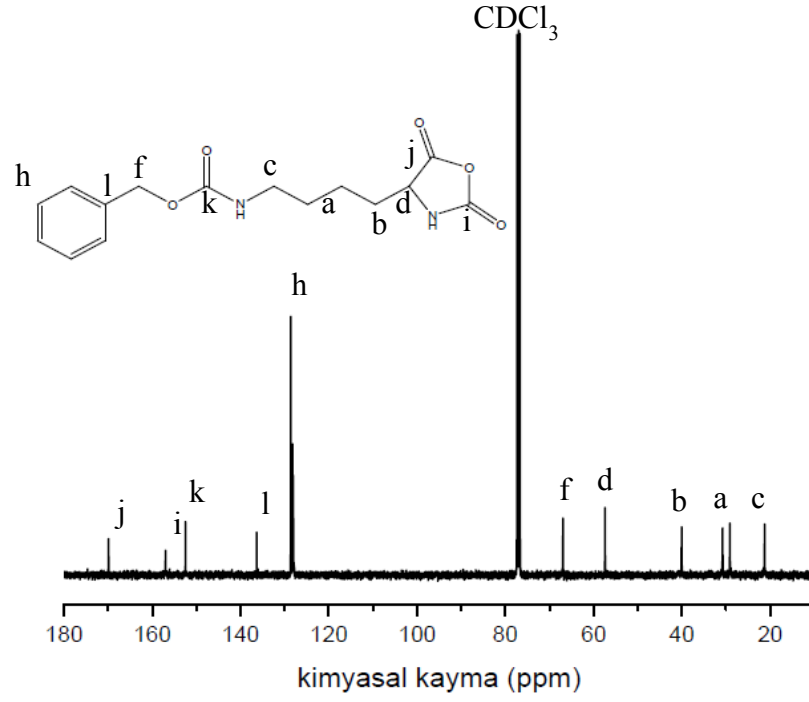


(4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.88 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.13 (2H, CH<sub>2</sub>), 4.19 (1H, CH), 4.99 (1H, NH), 5.13 (2H, CH<sub>2</sub>O), 6.94 (1H, NH), 7.26 (m, 5H, ArH)). Burada halka yapının oluştuğunu gösteren belirleyici pikler N-karboksianhidrit halkasındaki –NH (6.94 ppm) ve –CH (4.19 ppm) gruplarına aittir.

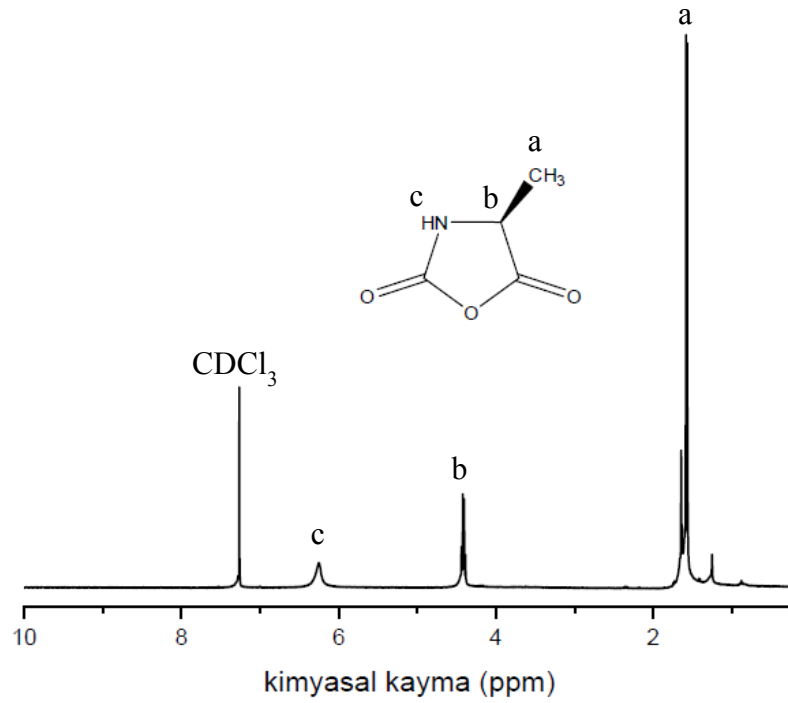


Şekil 3. 8: NCA – Nε-benziloksikarbonil-L-lizin'in <sup>1</sup>H NMR spektrumu.

NCA-N-Z-L-lizin'in CDCl<sub>3</sub>'de alınan karbon NMR'ına (Şekil 3. 9) bakıldığında genel kimyasal yapısındaki tüm protonların pikleri gözlemlenmiştir (<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 169.88 (OC(O)CH), 156.96 (C(O)NH), 152.46 ((CO)NH), 136.35 – 128.05 (Ar), 66.94 (CH<sub>2</sub>O), 57.44 (CH), 40.06 (CH<sub>2</sub>), 30.78 (CH<sub>2</sub>), 21.25 (CH<sub>2</sub>)). Burada halka yapının oluştuğunu gösteren belirleyici pikler N-karboksianhidrit halkasındaki OC(O)CH (169.88 ppm), C(O)NH (156.96 ppm), (CO)NH (152.46 ppm), gruplarına aittir. Bu senteze 5 g Z-L-lizin ile başlanılmış olup sentez sonunda % 76 verim ile 4,15 g NCA-Lys elde edilmiştir.



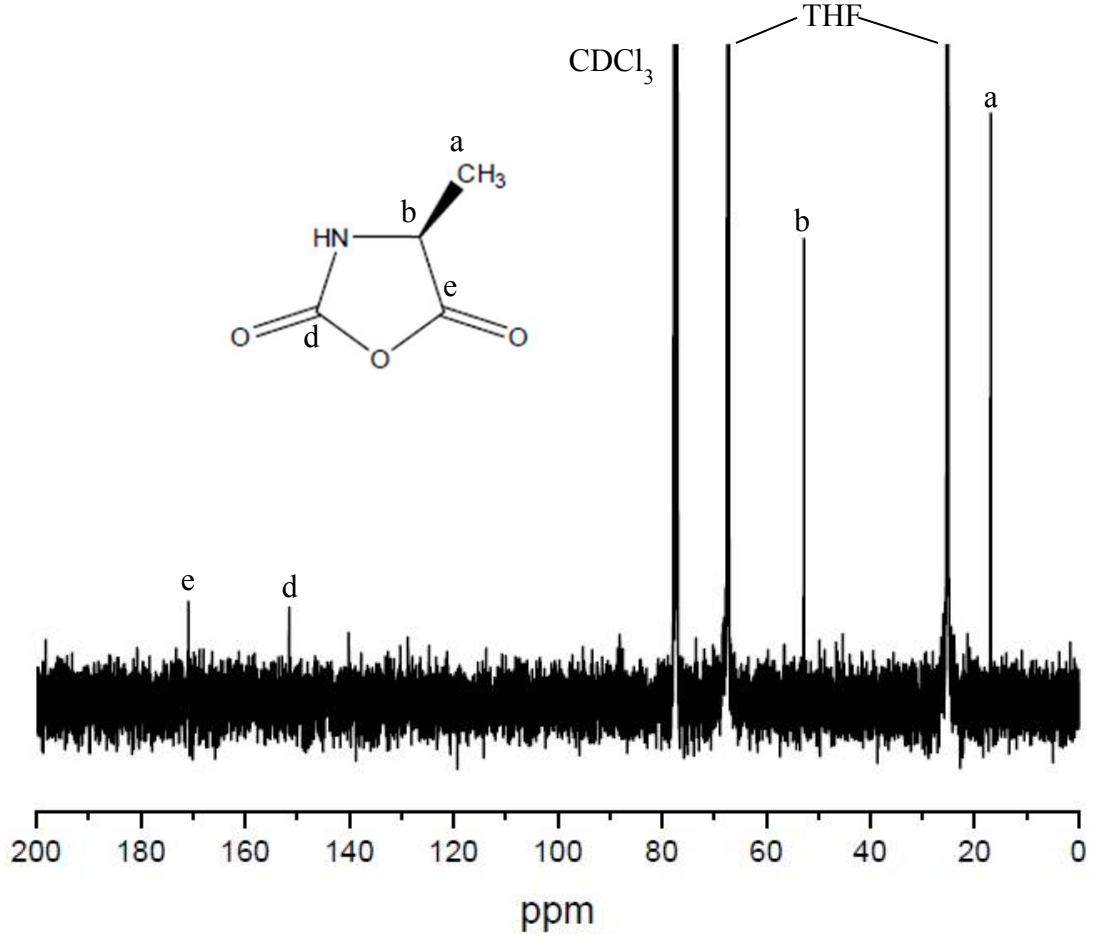
Şekil 3. 9: N $\epsilon$ -benziloksikarbonil-L-lizin – NCA'nın <sup>13</sup>C NMR spektrumu.



Şekil 3. 10: NCA –L-alanin'in <sup>1</sup>H NMR spektrumu.

NCA -L-alanin'in  $\text{CDCl}_3$ 'da alınan proton NMR'ına (Şekil 3. 10) bakıldığında 1.41 ppm'de  $-\text{CH}_3$ , 4.35 ppm'de  $-\text{CH}$ , 6.25 ppm'de  $-\text{NH}$  gruplarının varlığı gözlemlenmiştir. NCA -L-alanin'in  $\text{CDCl}_3 + \text{THF}$  karışımında alınan  $^{13}\text{C}$  NMR'ına (Şekil 3. 11) bakıldığında 16.93 ppm'de  $-\text{CH}_3$ , 52.76 ppm'de  $-\text{CH}$ , 151.49 ppm'de  $(\text{NHC}(\text{O})\text{O})$ , 171.04 ppm'de ise  $(\text{CHC}(\text{O})\text{O})$  gruplarının varlığı gözlemlenmiştir. 77.70, 77.38, 77.05 ppm'lerdeki pikler  $\text{CDCl}_3$ , 67.34 ve 25.21 ppm'lerdeki pikler ise THF çözücülerine aittir. Bu senteze 4,06 g L-alanine ile başlanılmış olup sentez sonunda % 61 verim ile 3,22 g NCA-Ala elde edilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında oldukça iyi bir verim ile sentezin tamamlandığı görülmüştür [65]. Sentez verimi en düşük NCA-monomerlerden biri olan NCA-Ala'ninde verimin düşmesi başlangıç maddesindeki çözünürlük problemlerinden kaynaklanmaktadır.

Yapılan tüm monomer sentez denemelerinin  $^{13}\text{C}$  ve  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarına bakıldığında safsızlık olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, birkaç sentez denemesinde yaşanan, yıkama basamağındaki ürün kaybı dolayısıyla yeterince monomer elde edilememesi ve çözünürlük problemleri nedeniyle bu sentezler başarısız sayılmıştır. Bu nedenle kullanılan sentez yönteminin genel olarak etkin olduğu söylenebilir.



Şekil 3. 11: NCA –L-alanin’in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

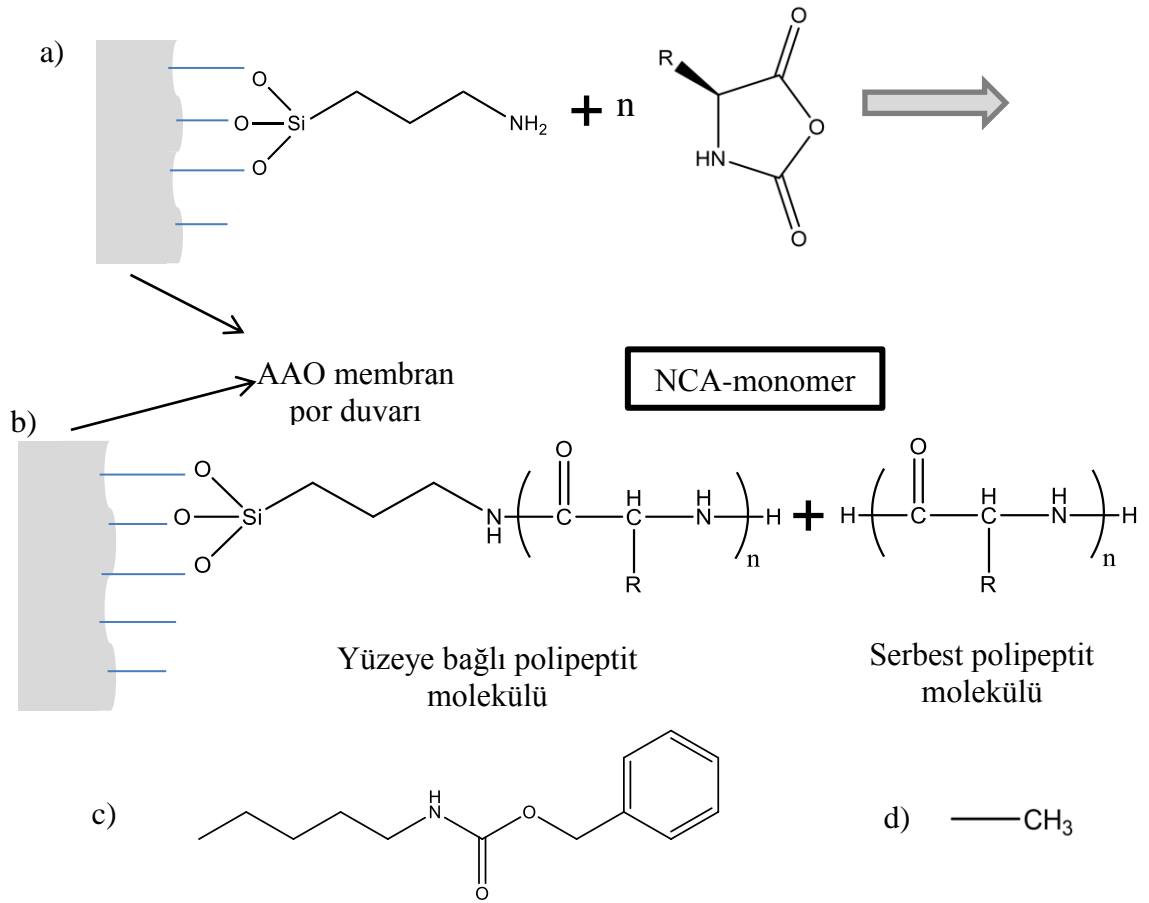
### 3.5. Nanoporlar İçinde Polipeptit Sentezi

Polimerizasyon basamağından önce, Bölüm 3.1.1 ve 3.1.2’de anlatıldığı gibi AAO membran porlarının yüzeyi temizlenmiş ve silanlama ile fonksiyonlandırılmıştır. NCA monomerler ise Bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi sentezlenmiştir.

Tetrahidrofuran (THF) (Sigma-Aldrich) çözücüsü ile hazırlanan 125 mM’lık NCA-lizin ve 200 mM’lık NCA-alanin monomer çözeltileri, 5 farklı por çapına sahip AAO membranlarına infiltre edilmiştir. İnfiltrasyon işlemi, oda sıcaklığında, vakum (1-2 mbar) altında ve Ar gazı ortamında; membran üzerine monomer çözeltisinin

damlatılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Membran yüzeyi tamamen NCA-monomer çözeltisi ile kaplanana kadar bu işlem birkaç kez (5-10 kez) tekrar edilmiştir. Polimerizasyonun gerçekleşmesi için, NCA-lizin ve NCA-alanine çözeltileri infiltre edilmiş AAO membranlar, PZLL için 60 °C’de, PAAla için 50 °C’de vakum (100 mbar) altında bir gece bekletilmiş ve yine sırasıyla 110 °C ve 100 °C’de vakum (~ 0 mbar) altında 6 saat bekletilerek kür edilmiştir. Polimerizasyon işleminden sonra; jilet, THF ile namlendirilmiş ince kâğıt ve yumuşak parlatma kâğıdı (Buehler GmbH, VerduTex) yardımıyla membran yüzeyinde yığın halinde oluşmuş polipeptit tabakası uzaklaştırılmıştır. Çözücünün tamamen porlardan uzaklaştığından emin olmak ve polipeptitlerin oryantasyonunun tamamlanması için, PZLL içeren membranlar 150 °C, PAAla içeren membranlar 140 °C’de vakum altında gece boyunca fırında bekletilmiştir.

Şekil 3. 12; uygulanan her adımdan sonra AAO membran porlarının içinde oluşan kimyasal yapıları ve tepkimeleri hem PZLL hem de PAAla için göstermektedir. Şekil 3. 12.a silanlama basamağından sonra APTES’in por duvarlarına bağlanmış halini ve NCA-monomerin genel kimyasal yapısını; Şekil 3. 12.b oluşabilecek polipeptitlerin (PZLL ve PAAla) yapılarını; Şekil 3. 12.c ve d ise bu deneylerde kullanılan monomerlerin (NCA-lizin ve NCA-alanin) R gruplarını göstermektedir.

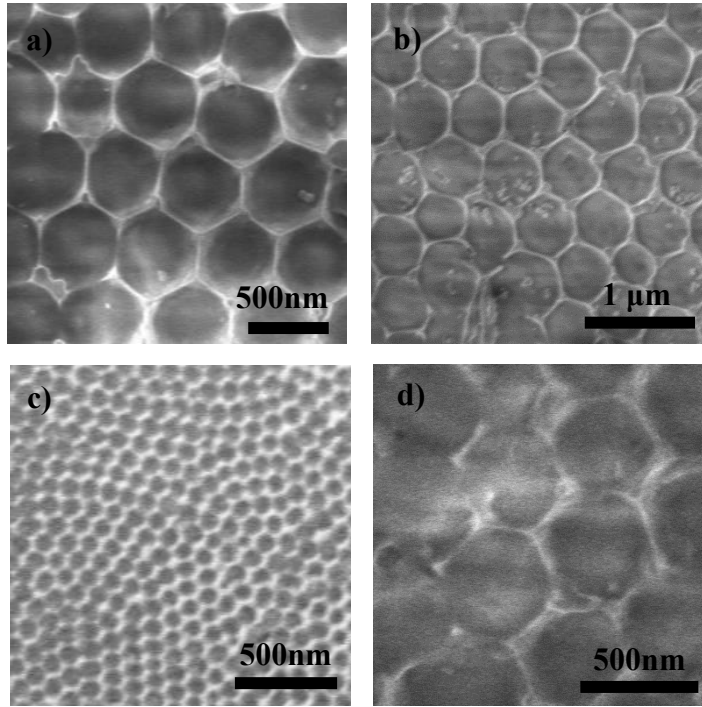


Şekil 3. 12: a,b) Polipeptit nanoçubuklarının polimerizasyonu c) Poli-Z-L-lizin için R gruplarının kimyasal yapısı d) Poli-alanin için R gruplarının kimyasal yapısı.

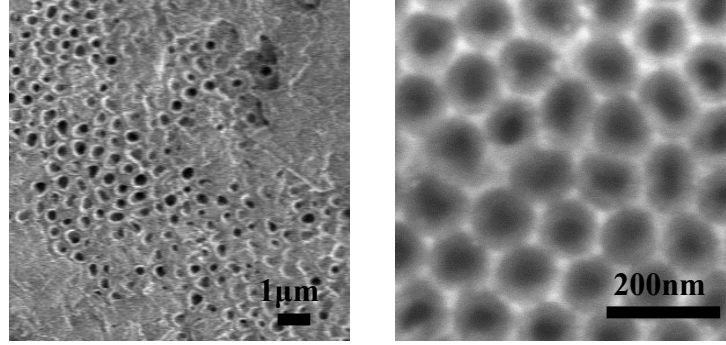
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Porların İnfiltrasyonu ve Yüzey Morfolojisi

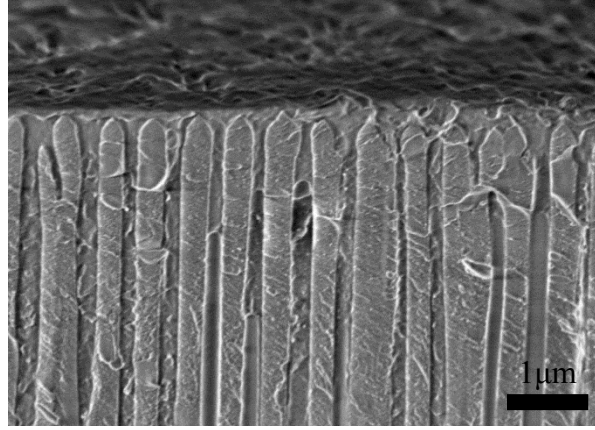
Şekil 4. 1’de içleri tamamen dolu, Şekil 4. 2’de ise içleri kısmen dolmuş farklı por çapında PZLL ve PALa içeren AAO membranlarının üstten çekilmiş SEM görüntüleri bulunmaktadır. Şekil 4. 3’de içi tamamen dolu 200 nm por çapında PZLL içeren AAO membranının kesit görüntüsü bulunmaktadır. Görüntüler sonucunda, AAO membran porlarının tamamen dolu olduğu örnekler sonraki ölçümlerde kullanılmıştır.



Şekil 4. 1: PZLL ve PALa nanoçubuklarının farklı por çaplarındaki AAO membran içindeki üstten SEM görüntüleri; a) PALa-200 nm b) PALa-400 nm c) PZLL-35 nm d) PZLL-200 nm.



Şekil 4. 2: İçi kısmen polipeptitlerle dolmuş AAO membranlar.



Şekil 4. 3: 200 nm por çapına sahip AAO membran içinde PZLL nanoçubukların kesit görüntüsü.

#### 4.2. Polipeptitlerin Yapıları

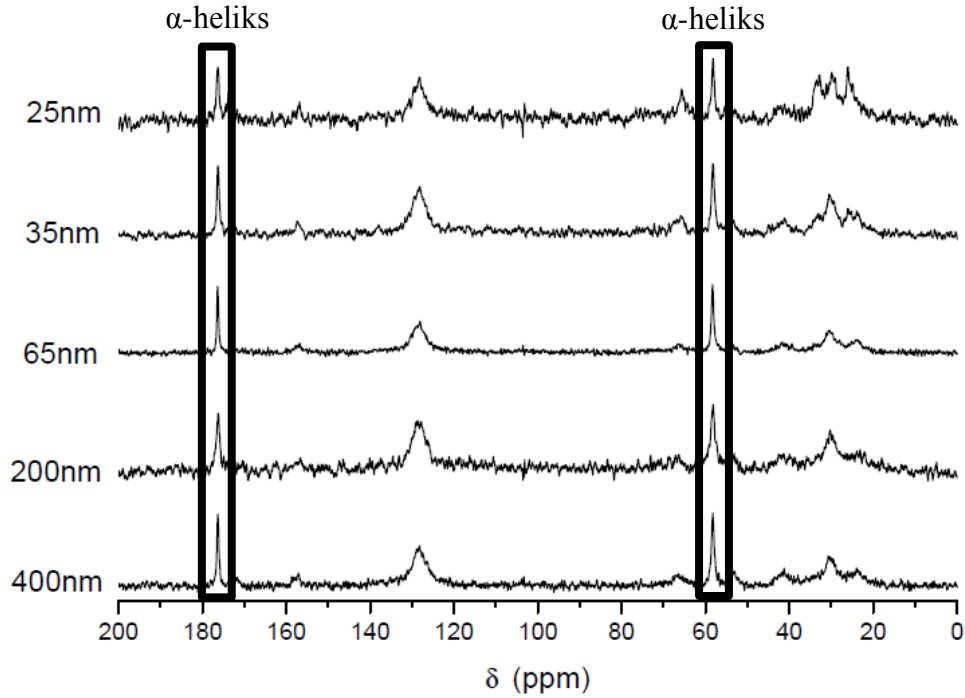
$^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR ile alınan ölçümlerle kimyasal yapı tayini yapılabilmektedir. Ancak  $^1\text{H}$  NMR geniş bant aralığına sahip olduğundan katı hal  $^{13}\text{C}$  NMR tercih edilir. Çünkü bant aralığı, kimyasal kayma değeri ve  $^{13}\text{C}$  spin-kafes gevşeme zamanı sayesinde katı hal  $^{13}\text{C}$  NMR’ında kristalin ve amorf kısımların ayrımı daha rahat yapılmaktadır.

Bu çalışmada  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR kullanılarak polipeptitlerin genel kimyasal yapısının tayininin yanı sıra ikincil yapılarına özellikle dikkat çekilmiştir. PZLL nanoçubuklarının

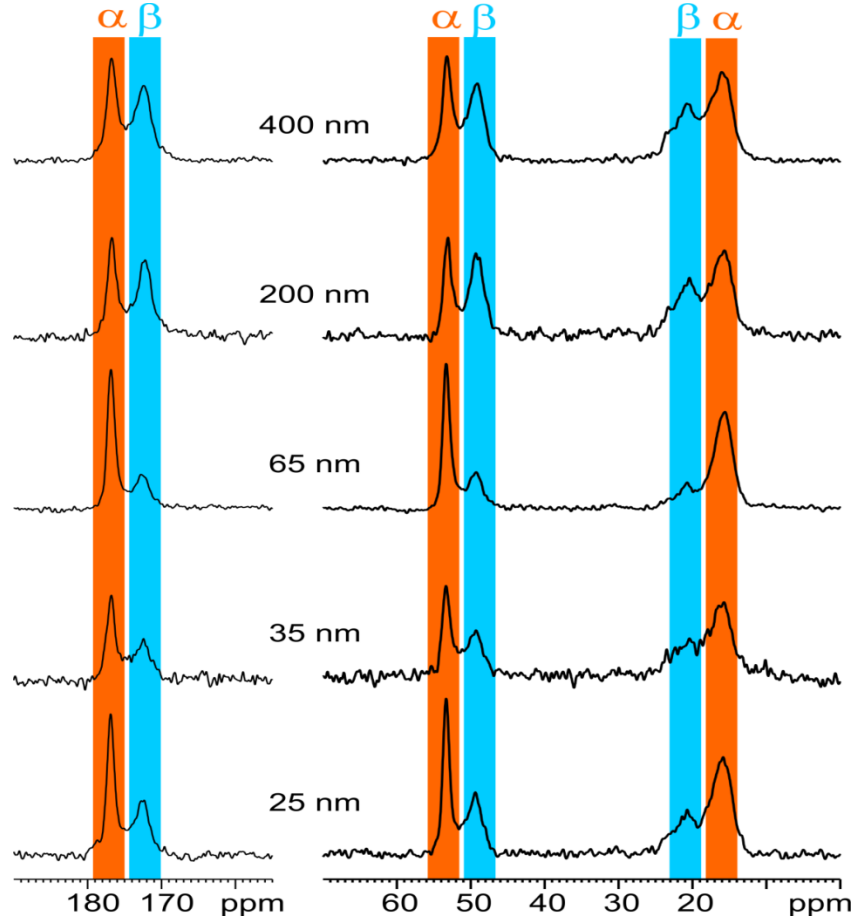


$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrumlarında (Şekil 4. 4),  $\delta \approx 176$  and 58 ppm'deki rezonanslar  $\alpha$ -sarmal ikincil yapıyı [66]; PAla nanoçubukların spektrumlarında (Şekil 4. 5) ise  $\delta \approx 176$ ; 53 and 15 ppm'deki rezonanslar  $\alpha$ -sarmal ikincil yapıyı,  $\delta \approx 172$ ; 49 and 20 ppm'deki rezonanslar  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapıyı [35] göstermektedir.

Keskin ve dar pikler kristalize fazı gösterirken geniş pikler amorf fazların varlığını, geniş pikler ve ikili pikler ise birden farklı yapı oluşumunu göstermektedir [67]. Buna dayanarak; Şekil 4. 4'deki bazı piklerin geniş gözlenmesinin sebebi de, PZLL nanoçubuklar için beklediğimiz  $\alpha$ -sarmal ikincil yapının yanı sıra  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapının da oluşması olabilir.



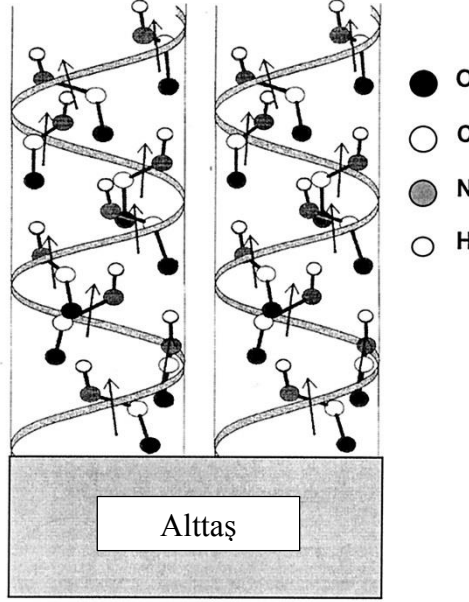
Şekil 4. 4: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrumları.



Şekil 4. 5: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PALa nanoçubuklarının  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektrumları.

Proteinlerin veya polipeptitlerin ikincil yapıları, bir FTIR spektrumundaki amit I ve amit II absorpsiyon pikleri ile karakterize edilir. Amit I bantları; amit grubunun C – N gerilme titreşimleri ve baskın olarak C=O gerilme titreşimlerini içerirken amit II bantları; N – H eğilme ve C – N gerilme titreşimlerini içerir (Şekil 4. 6). Genel olarak; amit I bandında  $1652 - 1657 \text{ cm}^{-1}$  aralığı  $\alpha$ -sarmal ikincil yapıyı,  $1628 - 1635 \text{ cm}^{-1}$  aralığı  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapıyı ve  $1640 - 1650 \text{ cm}^{-1}$  aralığı ise rastgele sarmal oluşumunu gösterir [68]. Amit II bandında ise;  $1545 - 1551 \text{ cm}^{-1}$  aralığı  $\alpha$ -sarmal ikincil yapıyı,  $1521 - 1525 \text{ cm}^{-1}$  aralığı ise  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapıyı gösterir.  $1610 - 1628$

$\text{cm}^{-1}$  aralığındaki bant, açık, denatüre polipeptit bağlarındaki güçlü moleküller arası hidrojen bağlarının varlığını gösterir [69].



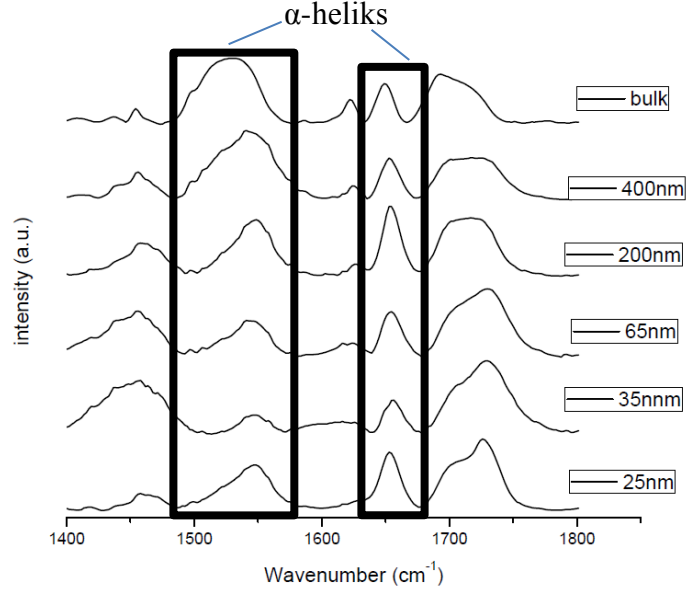
Şekil 4. 6: Polipeptit zinciri konformasyonunun şematik gösterimi [70].

Bu çalışmada ise, Şekil 4. 7’te görüldüğü gibi  $\sim 1545$  ve  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  dalga boylarındaki pikler PZLL nanoçubuklarının  $\alpha$ -sarmal ikincil yapısını belirtmektedir [71]. Şekil 4. 8’te ise;  $\sim 1539$  ve  $\sim 1658 \text{ cm}^{-1}$  dalga boylarındaki pikler PAIa nanoçubuklarının  $\alpha$ -sarmal ikincil yapısını [71] gösterirken  $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki pik  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapı konformasyonunu göstermektedir [72].

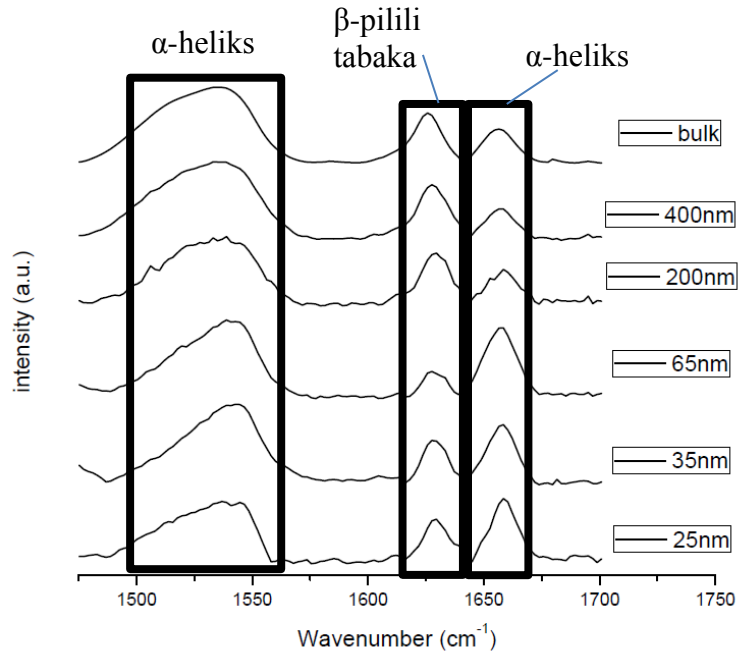
Geniş pikler ve çiftli piklerin oluşumu birden fazla spektrumu içerdiğinden olabileceği gibi polipeptit zincirlerinin ikincil yapı oluşumu sırasındaki katlanmasından da olabilir.  $1700 \text{ cm}^{-1}$  dalgaboyu civarındaki geniş pik,  $\beta$ -dönüş ve anti-paralel  $\beta$ -pilili tabaka oluşumlarından olabilir [73].

Şekil 4. 9’te ise yığın PZLL, PAIa ve poli-glisin (PGly) polipeptitlerinin IR spektrumları gösterilmektedir. Bu üç polipeptit için de  $\sim 1530$  ve  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  dalgaboylarındaki pikler

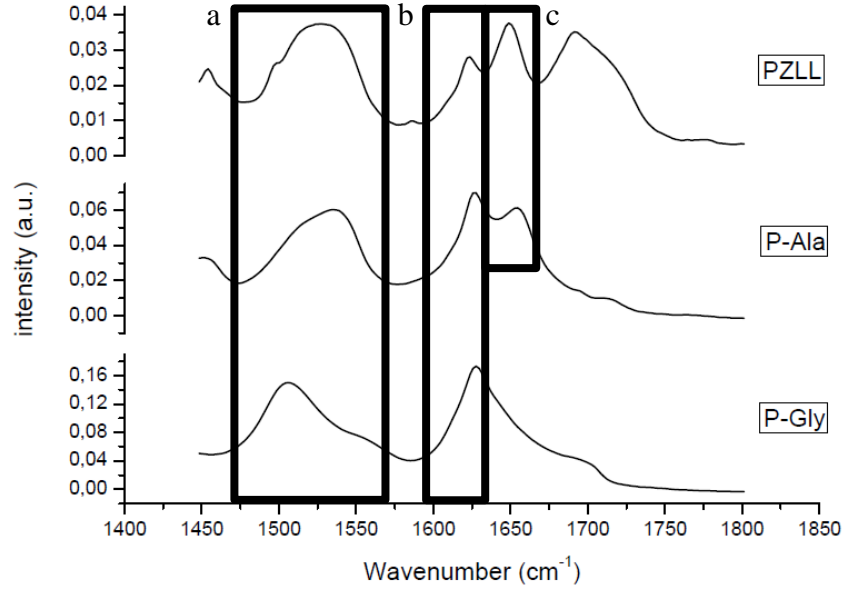
$\alpha$ -sarmal ikincil yapıyı [71] gösterirken  $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$  dalgaboyundaki pik  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapı konformasyonunu göstermektedir [72].



Şekil 4. 7: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının IR spektrumları.

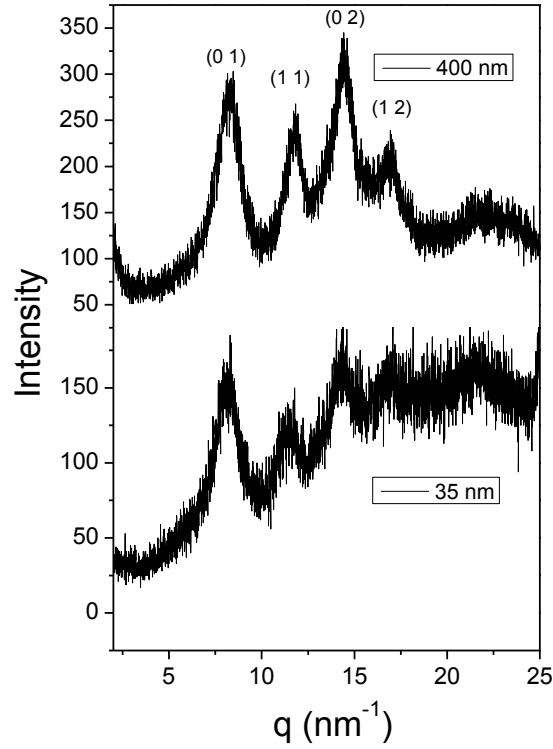


Şekil 4. 8: 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki Pala nanoçubuklarının IR spektrumları.



Şekil 4. 9: Yığın PZLL, P-Ala ve P-Gly polipeptitlerinin IR spektrumu. a ve c dikdörtgenleri içinde kalan pikler  $\alpha$  heliks yapıları gösterirken, b dikdörtgeni içindeki pikler  $\beta$ - pilili tabaka ikincil yapısını göstermektedir.

İkincil yapıları NMR ve FTIR yöntemleriyle incelenen polipeptit nanoçubukların zincirlerinin oluşturduğu kristal yapılar WAXS ile incelenmiştir. 400 nm ve 35 nm por çapına sahip PAla nanoçubuklarının ekvatoryal WAXS şiddet profiline bakıldığında varlığı tespit edilen (0 1), (1 1), (0 2) ve (1 2) yapısal düzlemleri hekzagonal paketlenmeyi göstermektedir. Buna göre  $\alpha$ -sarmal ikincil yapıya sahip PZLL ve hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapısındaki PAla nanoçubukların por çapından bağımsız olarak hekzagonal paketlenme yaptıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4. 10: 400 nm ve 25 nm por çapına sahip PAIa nanoçubuklarının ekvatorial WAXS şiddet profili.

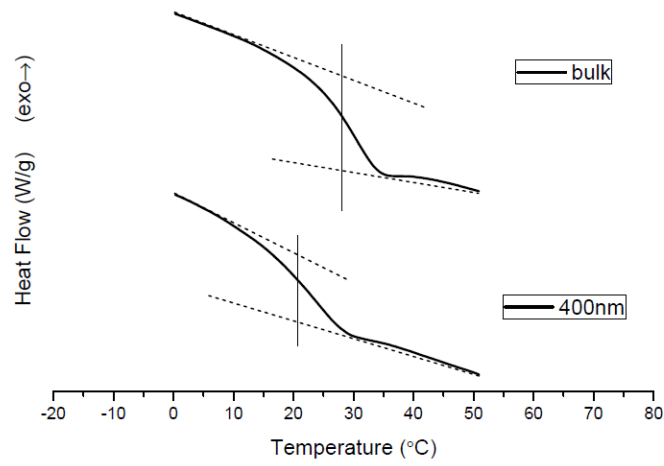
### 4.3. Polipeptitlerin Termodinamik Özellikleri

Şekil 4. 11’da, DSC ölçümlerinden elde edilen termogramları gösterilen yığın PZLL polipeptidinin camı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) 28 °C (301 K), por çapı 400 nm olan PZLL nanoçubuklarının  $T_g$ ’si 21 °C (294 K) olarak ölçülmüştür. Yığın PZLL polipeptitlerinin  $T_g$ ’si literatürde [71] 305 K olarak belirtilirken bu çalışmada da DSC ile yapılan ölçümlerle buna yakın bir sonuç elde edilmiştir. Por çapı 400 nm olan PZLL nanoçubuklarıyla yapılan DSC ve bu bölümde daha sonra anlatılacak olan Dielektrik Spektroskopisi (DS) ölçümlerinde  $T_g$  aynı bulunmuştur. Yığın PZLL polipeptit ile por çapı 400 nm olan PZLL nanoçubuğun  $T_g$ ’sine bakıldığında yaklaşık 7 °C’lik bir düşüş gözlenmektedir ki bu da sıkıştırma etkisinden kaynaklanan beklenen bir durumdur.

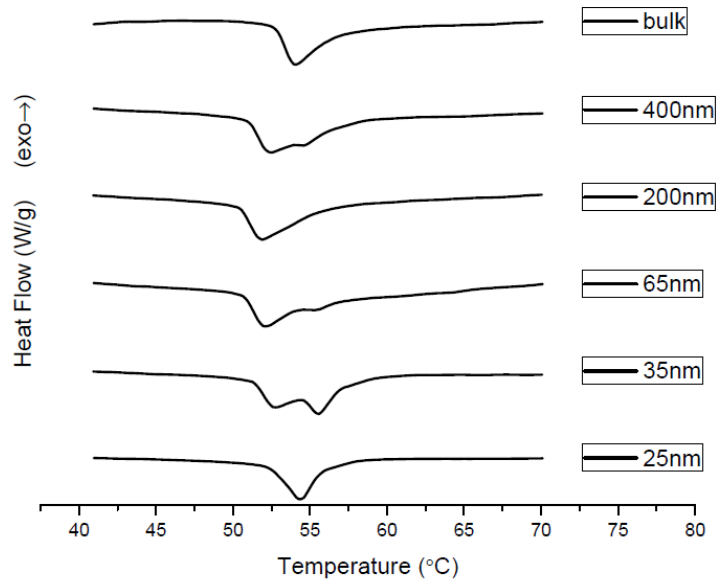
Poli-( $\gamma$ -benzil-L-glutamat) (PBLG) üzerinde sıkıştırma etkisinin incelendiği çalışmada ise [1]; DS ölçümleri sonucunda yığın PBLG'nin  $T_g$ 'si 288 K, por çapı 400 nm olan PBLG nanoçubukların  $T_g$ 'si 277 K olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere PBLG polipeptidinin camsı geçiş sıcaklığı PZLL polipeptidine göre oldukça düşüktür. PBLG ve PZLL polipeptitleri aynı ana zincir yapısına sahiptir ve iki polipeptit zincirinin de sonunda benzen halkası vardır, ancak PBLG, PZLL'e göre daha kısa zincirli yan gruplara sahiptir. Bu yüzden PBLG'nin camsı geçiş sıcaklığının PZLL'e göre düşük olması teorik olarak da beklenen bir durumdur.

Şekil 4. 12 ve Şekil 4. 13'teki termogramlar; yığın PZLL, PAAla ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL, PAAla nanoçubuklarının erime sıcaklıklarının por çapına göre değişimini göstermektedir. Por çapı artarken PZLL nanoçubuklarının erime sıcaklıklarında düşüş gözlenirken; Çizelge 4. 1'de de görüldüğü gibi; PAAla nanoçubuklarının erime sıcaklıklarının arttığı gözlemlenmiştir. Yığın PZLL'in erime sıcaklığı PZLL nanoçubuklardan yüksek iken yığın PAAla polipeptidinin erime sıcaklığı PAAla nanoçubuklarınınkinden düşüktür. Erime sıcaklıklarındaki bu yükseliş, sıkıştırma etkisinin PAAla polipeptit zincirlerinin kararlılığını arttırdığını göstermektedir.

Termogramlardaki çiftli pikler, örnek içinde hem yığın hem de nanoçubuk PZLL olduğundan gözlemlenmiş olabilir. Yüzeyde az da olsa polipeptit film kalabilmektedir.

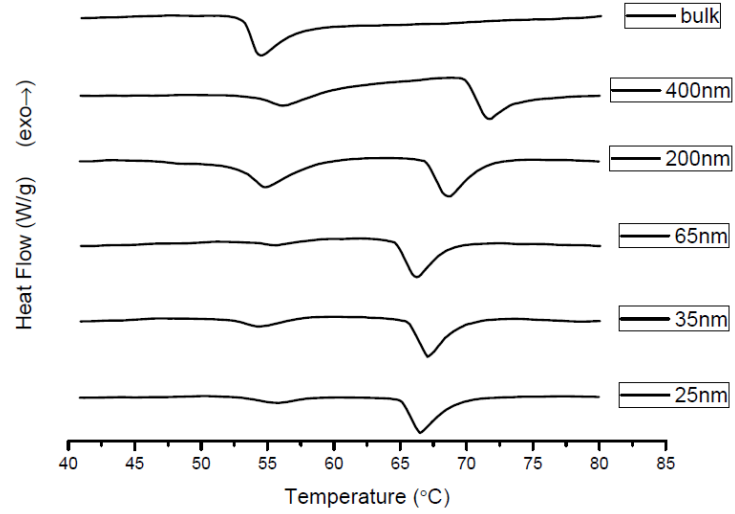


Şekil 4. 11: Yığın PZLL ve 400 nm por çapındaki PZLL nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları.



Şekil 4. 12: Yığın PZLL ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PZLL nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları.





Şekil 4. 13: Yığın PAla ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAla nanoçubuklarının ikinci kez ısıtılması sırasında elde edilen DSC termogramları.

Çizelge 4. 1: Yığın PAla ve 25 nm'den 400 nm'ye değişen por çaplarına sahip AAO membran içindeki PAla nanoçubuklarının erime sıcaklıkları

P-Ala nanoçubuk çapı	Yığın	400 nm	200 nm	65 nm	35 nm	25 nm
Erime Sıcaklığı (°C)	54	71	68	66	67	66

DSC tekniği ile ölçülen  $T_g$  değerleri, Dielektrik Spektroskopisi kullanılarak da hesaplanmıştır. Dielektrik Spektroskopisi ile sabit sıcaklıkta, farklı çaplara sahip polipeptit nanoçubukların ölçülen dielektrik kayıp değerleri logaritmik olarak, frekansa ( $10^{-2}$ - $10^6$  Hz) karşı grafiğe (Şekil 4. 14) geçirilip; elde edilen eğriler Debye (Eşitlik 4.1), Cole – Cole (Eşitlik 4.2), Davidson – Cole (Eşitlik 4.3) veya Havrilak – Negami (Eşitlik 4.4) eşitliklerine uygun şekilde eğrilere ayrılır (Şekil 4. 15).

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau} \quad (4.1)$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad ; \quad 0 \leq \alpha < 1 \quad (4.2)$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{(1 + i\omega\tau)^\beta} \quad (4.3)$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{[1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}]^\beta} \quad (4.4)$$

$\varepsilon^*$  : Kompleks dielektrik sabiti ( $\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon''$ ;  $\varepsilon'$  : reel kısmı,  $\varepsilon''$  : sanal kısım)

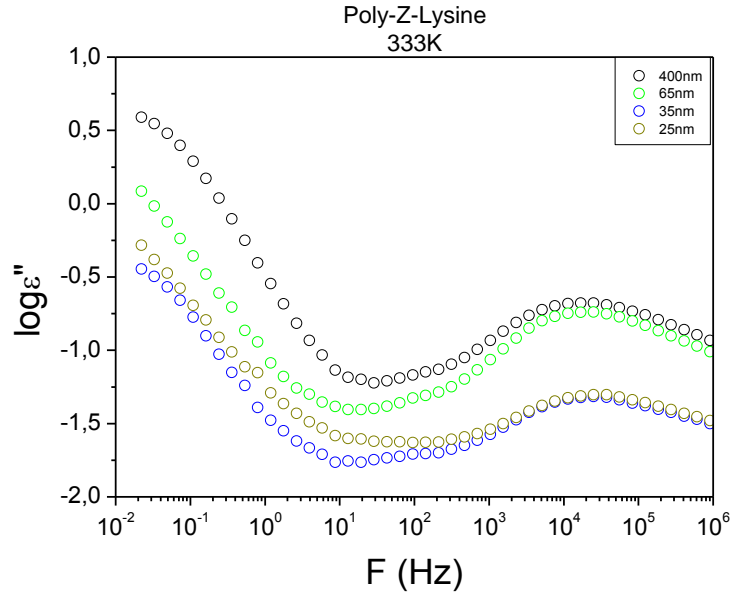
$\varepsilon_0$  : Frekansın sıfır olduğu durumdaki dielektrik sabiti

$\varepsilon_\infty$  : Frekansın sonsuz olduğu durumdaki dielektrik sabiti

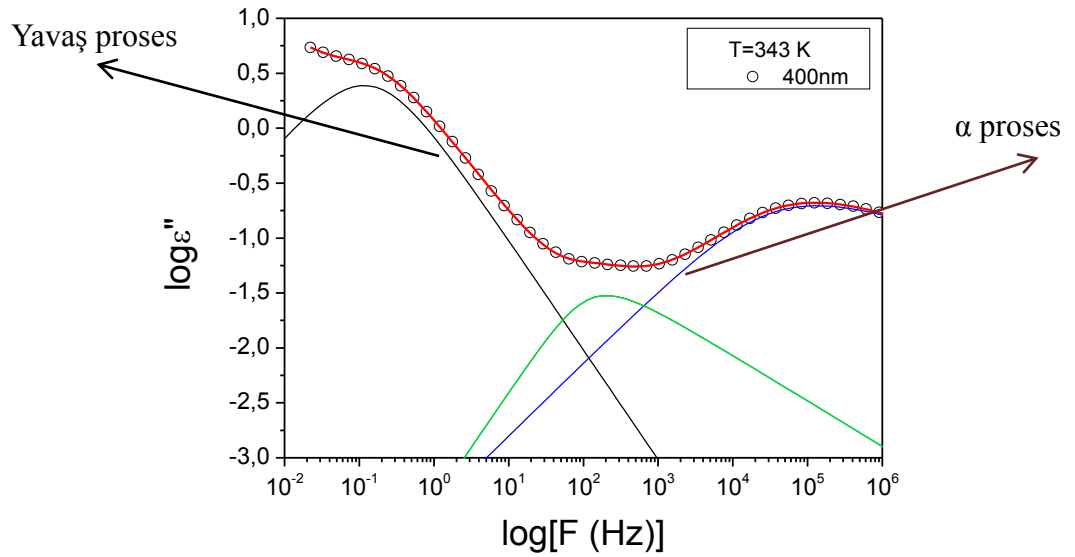
$\tau$  : Relaksasyon zamanı

$\omega$  : frekans

Bu eşitliklerdeki  $\alpha$  ve  $\beta$  geometriye bağlı sabitler olup, molekül ağırlığına bağlı olarak değişir [74].



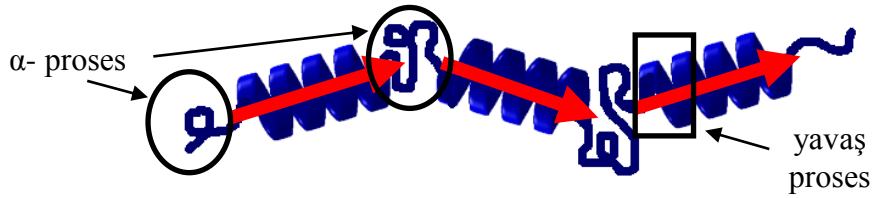
Şekil 4. 14: Farklı por çaplarındaki (400 nm, 65 nm, 35 nm ve 25 nm) AAO membran içinde PZLL nanoçubuklarına ait dielektrik kayıp eğrisi.



Şekil 4. 15: 400 nm por çapındaki AAO membran içinde PZLL nanoçubuklarına ait dielektrik kayıp eğrisi ve rahatlama eğrileri.

Şekil 4. 15'e bakıldığında yüksek frekanslara denk gelen eğri  $\alpha$  prosesi, düşük frekanslarda oluşan eğri ise yavaş prosesi göstermektedir [75].  $\alpha$  prosesi, amorf polipeptit zincirlerinin mikro-brownian hareketi ile oluşan birincil segmentel relaksasyon prosesidir; polimerin türüne bağlı olmaksızın oluşur. Yavaş prosesi ise; polipeptitin kristal yapısını oluşturan ana zincir ve yan zincirlerin oryantasyonu sonucu oluşan ikincil relaksasyon prosesidir, lokal olarak oluşur.

Polipeptitlerdeki kristal yapı polimerlerden farklı olarak ikincil yapıya da sahiptir. Yani; bu tez çalışması kapsamında incelenen PZLL ve PAla nanoçubukları için sırasıyla  $\alpha$ -sarmal ve hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka yapılarını oluşturan zincirlerin ve yan grupların oryantasyonu anlamına gelmektedir.



Şekil 4. 16:  $\alpha$ -proses ve yavaş proses oluşum bölgeleri

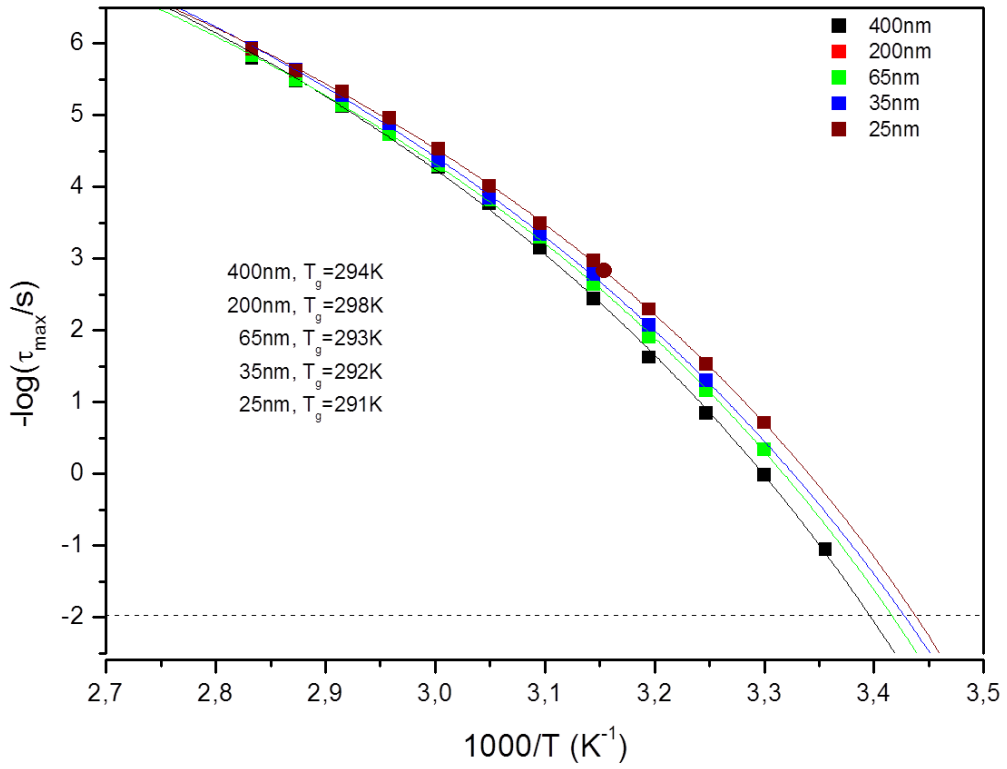
Farklı yarıçaplara sahip tüm PZLL nanoçubukları için dielektrik kayıp değerleri 223,15 K'den 413,15 K'e kadar 5'er K arayla, atmosferik basınçta ölçülerek grafiğe geçirilmiştir. Dielektrik kayıp eğrilerinin  $\alpha$  prosesi oluşturan kısmından elde edilen verilerle relaksasyon zamanlarının sıcaklığa bağlı değişimini gösteren grafik (Şekil 4. 17) elde edilmiş, Vogel- Fulcher-Tamman (VFT) eşitliğine (Eşitlik 4.5) göre fit edilmiştir. Bu grafikten de görüleceği üzere; aynı sıcaklıkta, por çapı azaldıkça relaksasyon süreleri kısalmakta, yani daha küçük çaplı PZLL polipeptit nanoçubuklarının daha hızlı hareket etmektedir. 25 nm'den 400 nm'ye farklı çaplara sahip PZLL nanoçubuklarının relaksasyon süreleri, sıcaklık arttıkça azalmakta yani hareketleri hızlanmaktadır. Şekil 4. 17'ye bakıldığında; nanoçubukların çaplarına bağlı olmadan, relaksasyon sürelerinin sıcaklıkla değişimi aynı eğilimdedir.

Camsı geçiş sıcaklığı polipeptit zincirlerinin amorf kısımlarının hareketinden oluşur ve zincirlerin bu sıcaklıktayken  $10^{-2}$  Hz frekansında titreştiği öne sürülmektedir. Bu nedenle, relaksasyon zamanının  $10^{-2}$  Hz olduğu sıcaklıklar grafikten okunduğunda polipeptit nanoçubukların  $T_g$ 'leri elde edilmiştir.

$$\tau = \tau_0 \exp \frac{B}{T - T_0} \quad (4.5)$$

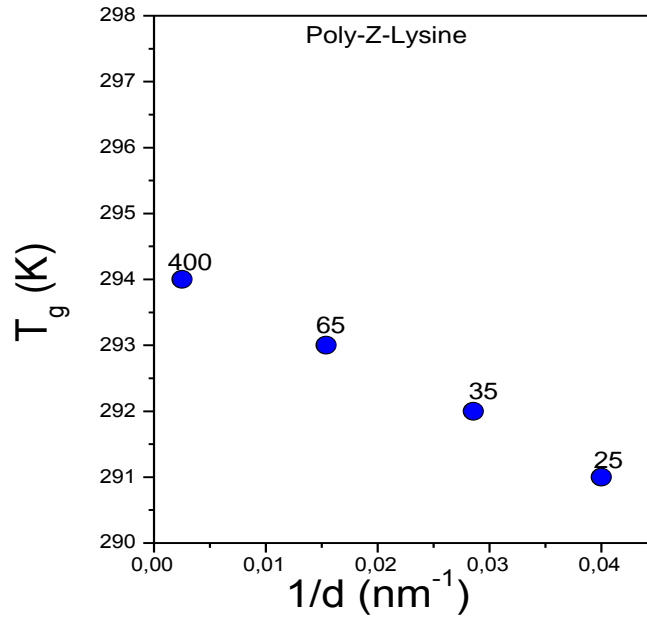
$\tau_0$  ve B: polimere bağlı fit parametresi

$T_0$ : ideal camsı geçiş sıcaklığı



Şekil 4. 17: AAO içindeki PZLL polipeptit zincirlerinin relaksasyon zamanlarının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 4. 18'ya bakıldığında, PZLL nanoçubuklarının çapları azaldıkça camsı geçiş sıcaklığının da düştüğü görülmektedir. Çapı 400 nm olan PZLL nanoçubukların  $T_g$ 'si 294 K iken, 25 nm'ye inildiğinde camsı geçiş sıcaklığı da 291 K'e kadar düşmüştür. Çapı 400 nm olan PZLL nanoçubuklarının camsı geçiş sıcaklığı DSC yöntemi ile de 294 K olarak bulunduğu verilerin tutarlı olduğu söylenebilir.



Şekil 4. 18: DS ölçümlerinden elde edilen  $T_g$ 'nin por çaplarına göre değişimi.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında NCA-L-lizin ve NCA-L-alanin monomer sentezleri % 76 ve % 61 verimler ile başarıyla tamamlanmıştır. Başta amaçlanmış olan NCA-glisin sentezi ise, başlangıç maddesinin çözünürlüğünün çok düşük olmasından dolayı yapılamamıştır. Sentezde başlangıç maddesi olarak kullanılan aminoasit moleküllerindeki yan gruplar çözünürlüğü etkilemektedir. Yan grup uzunlukları azaldıkça, çözünürlük de azalmaktadır. Bu da verimlerden de anlaşılacağı üzere sentezin başarısını etkilemiştir. Glisin molekülünde ise yan grup olarak sadece H molekülü olduğundan, NCA-glisin sentezi yapılamamıştır.

THF çözücüsü ile hazırlanan monomer çözeltileri AAO membran porlarına infiltre edildikten sonra polimerizasyon yapılmıştır. Porların etkin bir şekilde dolup dolmadığı hem ağırlık (Hassas Terazî) hem de kesit görüntüleri (SEM) ile kontrol edilmiştir. Bu iki bağımsız ölçümler doğrultusunda porların büyük bir kısmının katı çubuk oluşturacak nano yapılar şeklinde dolduğu gözlemlenmiştir.

Farklı por çaplarına sahip (25, 35, 65, 200 ve 400 nm) polipeptit nanoçubuklarının oluşturduğu ikincil yapılar <sup>13</sup>C CPMAS NMR ve FTIR Spektrometreleri ile analiz edilmiştir. Her iki yöntemde de por çaplarına bağlı olmadan; PZLL nanoçubukların  $\alpha$ -sarmal, PAla nanoçubukların ise hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapısına sahip olduğu gösterilmiştir. PZLL ve PAla nanoçubuklarında gözlemlenen bu ikincil yapılar, yığın PZLL ve PAla polipeptitlerinde gözlemlenen ve nano boyutta da beklenen yapılarıdır. Bilindiği üzere polimerlerin özel bir sınıfı olan polipeptitler de amorf ve kristal kısımlardan oluşur. PZLL polipeptitler ağırlıklı olarak kırılmış sarmal (broken-helix) ve amorf kısımlardan oluşmuşlardır. Bu yüzden <sup>13</sup>C CPMAS NMR ve FTIR ile yapılan ölçümler sonucu elde edilen spektrumlarda geniş pikler gözlemlenmiştir.

AAO membran içindeki 400 ve 35 nm por çapına sahip PAla nanoçubuklar üzerinde WAXS ile yapılan analizler sonucu ise her iki por çapında da hekzagonal paketlenme gözlemlenmiştir. Elde edilen piklerin keskin olmaması da yine amorf kısımlardan dolayı oluşmaktadır. Hem  $\alpha$ -sarmal hem de  $\beta$ -pilili tabaka ikincil yapısına sahip PAla nanoçubuklarının oluşturduğu üçüncül yapılar ise hekzagonal olarak paketlenerek dördüncül yapısını oluşturmuştur.

DSC ile yapılan ölçümle sonucunda ise yığın PZLL'in  $T_g$ 'si 301 K olarak ölçülürken, 400 nm çapa sahip PZLL nanoçubuklarının  $T_g$ 'si 294 K olarak ölçülmüştür. Literatüre göre; yığın PBLG için gözlemlenen  $T_g$  288 K iken; 400 nm çapa sahip PBLG nanoçubuklarının  $T_g$ 'si 277 K olarak gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; polipeptitler arasında karşılaştırma yapıldığında yan gruplar küçüldükçe  $T_g$ 'lerin azaldığı tespit edilmiştir.

PZLL nanoçubuklarının erime sıcaklıklarına bakıldığında ise por çapı azalırken  $T_m$ 'nin arttığı; PAla nanoçubuklarında ise tam tersi bir eğilim göstererek azaldığı gözlenmiştir. Yığın polipeptit ile polipeptit nanoçubuklarının erime sıcaklıkları karşılaştırıldığında ise; PZLL polipeptidinde yığın, PAla polipeptidinde ise nanoçubuklar daha kararlı bulunmuştur.

Dielektrik Spektroskopisi ile de PZLL nanoçubuklarının hem amorf kısımların hareketleri ( $\alpha$ -proses) hem de ikincil yapıların oluşturduğu kristal kısımların hareketi (yavaş proses) incelenerek camsı geçiş sıcaklıkları hesaplanmıştır. DSC tekniği ile elde edilen sonuçlar bu yöntemle de doğrulanmış olup; nanoçubukların çap boyutları azaldıkça camsı geçiş sıcaklıklarının da düştüğü gözlemlenmiştir. Bu düşüşün sınırlandırılma etkisinden dolayı artan kırık/zayıf bağlar ve artan açık uçlardan dolayı oluştuğu düşünülmektedir.



Sınırlandırmanın polipeptitler üzerindeki etkisi hakkında elde edilen bu sonuçlardan sonra, homopolipeptit yerine heteropolipeptit ile veya ortamda birden fazla farklı homopolipeptit bulundurarak kalabalıklık etkisinin polipeptit zincirlerinin yapıları ve dinamikleri üzerindeki etkisi incelenebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] H. Duran, A. Gitsas, G. Floudas, M. Mondeshki, M. Steinhart ve W. Knoll, «Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) peptides confined to nanoporous alumina: pore diameter dependence of self-assembly and dynamics,» *Macromolecules*, cilt 42, no. 8, pp. 2881-2885, 2009.
- [2] Y. Suzuki, H. Duran, M. Steinhart, H. J. Butt ve G. Floudas, «Homogeneous Crystallization and Local Dynamics of Polyethylene Oxide (PEO) Confined to Nanoporous Alumina,» *Soft Matter*, cilt 9, pp. 2621-2628, 2013.
- [3] Y. Suzuki, H. Duran, W. Akram, M. Steinhart, G. Floudas ve H. J. Butt, «Multiple Nucleation Events and Local Dynamics of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) confined to nanopores,» *Soft Matter*, cilt 9, pp. 9189-9198, 2013.
- [4] E. Tuncel, Y. Suzuki, A. Iossifidis, M. Steinhart, H. Duran, H. J. Butt ve G. Floudas, *hazırlık aşamasında*, 2015.
- [5] S. Richter, M. Steinhart, H. Hofmeister, M. Zacharias, U. Gösele, N. Gaponik, A. Eychmüller, A. L. Rogach, J. H. Wendorff, S. L. Schweizer, A. V. Rhein ve R. B. Wehrspohn, «Quantum dot emitters in two-dimensional photonic crystals of macroporous silicon,» *Appl. Phys. Lett.*, cilt 87, no. 14, p. 142107, 2005.
- [6] T. Kumeria, L. Parkinson ve D. A. Losic, «A nanoporous interferometric micro-sensor for biomedical detection of volatile sulphur compounds,» *Nanoscale Research Letters*, cilt 6, p. 664, 2011.
- [7] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner ve J. H. Wendorff, «Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics,» *Polymers for Advanced Technologies*, cilt 16, p. 276, 2005.
- [8] A. Kasry ve W. Knoll, «Long range surface plasmon fluorescence spectroscopy,» *Appl. Phys. Lett*, cilt 89, p. 101106, 2006.
- [9] A. T. Shawaqfeh ve R. E. Baltus, «Fabrication and characterization of single layer and multi-layer anodic alumina membranes,» *Journal of Membrane Science*, cilt 157, p. 147, 1999.

- [10] J. Martín, J. Maiz, J. Sacristan ve C. Mijangos, «Tailored polymer-based nanorods and nanotubes by" template synthesis": From preparation to applications,» *Polymer*, cilt 53, no. 6, pp. 1149-1166, 2012.
- [11] Y. Matsui, K. Nishio ve H. Masuda, «Highly Ordered Anodic Porous Alumina with 13-nm Hole Intervals Using a 2D Array of Monodisperse Nanoparticles As a Template,» *Small*, cilt 2, no. 4, p. 522, 2006.
- [12] K. Choi, S. H. Park, Y. M. Song, Y. T. Lee, C. K. Hwangbo, H. Yang ve H. S. Lee, «Nano-tailoring the Surface Structure for the Monolithic High-Performance Antireflection Polymer Film,» *Adv. Mater.*, cilt 22, p. 3713, 2010.
- [13] J. Martin ve C. Mijangos, «Tailored Polymer-Based Nanofibers and Nanotubes by Means of Different Infiltration Methods into Alumina Nanopores,» *Langmuir*, cilt 25, p. 1181, 2009.
- [14] W. Lee, R. Scholz, K. Nielsch ve U. Gösele, «A Template-Based Electrochemical Method for the Synthesis of Multisegmented Metallic Nanotubes,» *Angew. Chem., Int. Ed.*, cilt 44, p. 6050, 2005.
- [15] D. Chen, W. Zhao, D. Wei ve T. P. Russell, «Dewetting on Curved Interfaces: a Simple Route to Polymer Nanostructures,» *Macromolecules*, cilt 44, p. 8020, 2011.
- [16] S. Mei, X. Feng ve Z. Jin, «Fabrication of Polymer Nanospheres Based on Rayleigh Instability in Capillary Channels,» *Macromolecules*, cilt 44, p. 1615, 2011.
- [17] X. Feng ve Z. Jin, «Spontaneous Formation of Nanoscale Polymer Spheres, Capsules, or Rods by Evaporation of Polymer Solutions in Cylindrical Alumina Nanopores,» *Macromolecules*, cilt 42, no. 3, p. 569, 2009.
- [18] Y. Wang, M. Sarkar, A. E. Smith, A. S. Krois ve G. J. Pielak, «Macromolecular Crowding and Protein Stability,» *J. Am. Chem. Soc.*, cilt 134, p. 16614–16618, 2012.
- [19] A. C. Miklos, M. Sarkar, Y. Wang ve G. J. Pielak, «Protein Crowding Tunes Protein Stability,» *J. Am. Chem. Soc.*, cilt 133, p. 7116–7120, 2011.
- [20] D. K. Eggers ve J. S. Valentine, «Crowding and Hydration Effects on Protein Conformation: A Study with Sol-Gel Encapsulated Proteins,» *J. Mol. Biol*, cilt 314, pp. 911-922, 2001.

- [21] T. Sakaue ve E. Rappae, «Polymer Chains in Confined Spaces and Flow-Injection Problems: Some Remarks,» *Macromolecules*, cilt 39, pp. 2621-2628, 2006.
- [22] O. Jessensky, F. Müller ve U. Gösele, «Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina,» *Appl. Phys. Lett.*, cilt 72, no. 10, pp. 1173-1175, 1998.
- [23] S. Franssila, *Introduction to Microfabrication*, John Wiley & Sons, 2004, pp. 135, 136, 338, 339.
- [24] S. Nayab, A. Farrukh, Z. Oluz, E. Tuncel, S. R. Tariq, H. U. Rahman, K. Kirchhoff, H. Duran ve B. Yameen, «Design and Fabrication of Branched Polyamine Functionalized Mesoporous Silica: An Efficient Absorbent for Water Remediation,» *ACS Appl. Mater. Interfaces*, cilt 6, pp. 4408-4417, 2014.
- [25] W. Zou, H. Qin, W. Shi, S. Sun ve C. Zhao, «Surface Modification of Poly(ether sulfone) Membrane with a Synthesized Negatively Charged Copolymer,» *Langmuir*, cilt 30, p. 13622–13630, 2014.
- [26] A. Yousaf, A. Farrukh, Z. Oluz, E. Tuncel, H. Duran, S. Yiyit Doğan, T. Tekinay, H. U. Rehman ve B. Yameen, «UV-light assisted single step route to functional PEEK surfaces,» *Reactive & Functional Polymers*, cilt 83, pp. 70-75, 2014.
- [27] Y. Zhang, N. Kohler ve M. Zhang, «Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake,» *Biomaterials*, cilt 23, pp. 1553-1561, 2002.
- [28] A. M. M. Jani, D. Losic ve N. H. Voelcker, «Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications,» *Progress in Materials Science*, cilt 58, pp. 636-704, 2013.
- [29] Y. Ito, Y. Ochiai, Y. S. Park ve Y. Imanishi, «pH-Sensitive Gating by Conformational Change of a Polypeptide Brush Grafted onto a Porous Polymer Membrane,» *J. Am. Chem. Soc.*, , , cilt 119, no. 7, pp. 1619-1623, 1997.
- [30] J. K. Whitesell ve H. K. Chang, «Directionally Aligned Helical Peptides On Surfaces,» *Science*, cilt 261, no. 5117, pp. 73-76, 1993.
- [31] K. H. A. Lau, H. Duran ve W. Knoll, «In situ Characterization of N-Carboxy Anhydride Polymerization in Nanoporous Anodic Alumina,» *J. Phys. Chem. B*, cilt 113, p. 3179–3189, 2009.

- [32] J. Martin, M. Vázquez, M. Hernández-Vélez ve C. Mijangos, «One-dimensional magnetopolymeric nanostructures with tailored sizes,» *Nanotechnology*, cilt 19, pp. 175304-175308, 2008.
- [33] C. Alemán, A. Bianco ve M. Venanzi, *Peptide Materials: From Nanostructures to Applications*, John Wiley & Sons, 2013.
- [34] P. Papadopoulos, G. Floudas, H. A. Klok, I. Schnell ve T. Pakula, «Self-assembly and dynamics of poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) peptides,» *Biomacromolecules*, cilt 5, pp. 81-91, 2004.
- [35] D. K. Lee ve A. Ramamoorthy, «Determination of the Solid-State Conformations of Polyalanine Using Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy,» *J. Phys. Chem. B*, cilt 103, pp. 271-275, 1999.
- [36] A. Gitsas, G. Floudas, M. Mondeshki, H. W. Spiess, T. Aliferis, H. Iatrou ve N. Hadjichristidis, «Control of Peptide Secondary Structure and Dynamics in Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-b-polyalanine Peptides,» *Macromolecules*, cilt 41, pp. 8072-8080, 2008.
- [37] A. Gitsas, G. Floudas, M. Mondeshki, H. J. Butt, H. W. Spiess, H. Iatrou ve N. Hadjichristidis, «Effect of Chain Topology on the Self-Organization and Dynamics of Block Copolypeptides: From Diblock Copolymers to Stars,» *Biomacromolecules*, cilt 9, pp. 1959-1966, 2008.
- [38] E. Wünsch, «Synthesis of naturally occurring polypeptides, problems of current research,» *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, cilt 10, no. 11, pp. 786-795, 1971.
- [39] H. R. Kricheldorf, «Polypeptides and 100 Years of Chemistry of alpha-Amino Acid N-Carboxyanhydrides,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, cilt 45, p. 5752 – 5784, 2006.
- [40] M. Saçak, *Polimer Kimyası*, 6 dü., pp. 385-397.
- [41] G. Odian, *Principles of polymerization*, John Wiley & Sons, 2004, pp. 578-581.
- [42] N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis ve G. Sakellariou, «Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides,» *Chem. Rev.*, cilt 109, pp. 5528-5578, 2009.

- [43] S. H. Wibowo, A. Sulistio, E. H. H. Wong, A. Blencowe ve G. G. Qiao, «Polypeptide films via N-carboxyanhydride ring-opening polymerization (NCA-ROP): past, present and future,» *Chem. Commun.*, cilt 50, p. 4971, 2014.
- [44] T. J. Deming, «Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture,» *Nature*, cilt 390, pp. 386-389, 1997.
- [45] T. Aliferis, H. Iatrou ve N. Hadjichristidis, «Living Polypeptides,» *Biomacromolecules*, cilt 5, no. 5, p. 1653–1656, 2004.
- [46] I. Dimitrov ve H. Schlaad, «Synthesis of nearly monodisperse polystyrene–polypeptide block copolymers via polymerisation of N-carboxyanhydrides,» *Chem. Commun.*, cilt 23, pp. 2944-2945, 2003.
- [47] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani ve F. Schue, «Living Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature,» *Macromol. Rapid Commun.*, cilt 25, no. 13, p. 1221–1224, 2004.
- [48] H. X. Zhou, G. Rivas ve A. P. Mint, «Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences,» *Annu Rev Biophys.*, cilt 37, p. 375–397, 2008.
- [49] M. Friedel, D. J. Sheeler ve J. E. Shea, «Effects of confinement and crowding on the thermodynamics and kinetics of folding of a minimalist  $\beta$ -barrel protein,» *The Journal of Chemical Physics*, cilt 118, p. 8106, 2003.
- [50] H. X. Zhou ve K. A. Dill, «Stabilization of proteins in confined spaces,» *Biochemistry*, cilt 40, no. 38, pp. 11289-11293, 2001.
- [51] J. Mittala ve R. B. Best, «Thermodynamics and kinetics of protein folding under confinement,» *PNAS*, cilt 105, no. 51, pp. 20233-20238, 2008.
- [52] S. Granick, S. K. Kumar, E. J. Amis, M. Antonietti, A. C. Balazs, A. K. Chakraborty, G. S. Grest, C. Hawker, P. Janmey, E. J. Kramer, R. Nuzzo, T. P. Russell ve C. R. Safinya, «Macromolecules At Surfaces: Research Challenges And Opportunities From Tribology To Biology,» *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, cilt 41, pp. 2755-2793, 2003.

- [53] A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochan ve T. J. Deming, «Rapidly recovering hydrogel scaffolds from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles,» *Nature*, cilt 417, pp. 424-428, 2002.
- [54] M. Yu ve T. J. Deming, «Synthetic Polypeptide Mimics of Marine Adhesives,» *Macromolecules*, cilt 31, pp. 4739-4745, 1998.
- [55] V. S. Trubetskoy, V. P. Torchilin ve S. J. Kennel, «Use of N-Terminal Modified Poly-alpha-lysine)-Antibody Conjugate as a Carrier for Targeted Gene Delivery in Mouse Lung Endothelial Cells,» *Bioconjugate Chem.*, cilt 3, no. 4, pp. 323-327, 1992.
- [56] B. R. Kranz, E. Thiel ve S. Thierfelder, «Immunocytochemical identification of meningeal leukemia and lymphoma-poly-L-lysine-coated slides permit multimarker analysis even with minute cerebrospinal fluid cell specimens,» *Blood*, cilt 73, no. 7, pp. 1942-1950, 1989.
- [57] K. Wang, G. F. Luo, Y. Liu, C. Li, S. X. Cheng, R. X. Zhuo ve X. Z. Zhang, «Redox-sensitive shell cross-linked PEG-polypeptide hybrid micelles for controlled drug release,» *Polym. Chem.*, cilt 3, p. 1084, 2012.
- [58] T. Xing, B. Lai, X. Ye ve L. Yan, «Disulfide Core Cross-Linked PEGylated Polypeptide Nanogel Prepared by a One-Step Ring Opening Copolymerization of N-Carboxyanhydrides for Drug Delivery,» *Macromol. Biosci.*, cilt 11, pp. 962-969, 2011.
- [59] M. T. Colvin, R. Silvers, B. Frohm, Y. Su, S. Linse ve R. G. Griffin, «High Resolution Structural Characterization of A $\beta$ 42 Amyloid Fibrils by Magic Angle Spinning NMR,» *J. Am. Chem. Soc.*, cilt 137, p. 7509-7518, 2015.
- [60] M. Vilar, H. T. Chou, T. Lührs, S. K. Maji, D. R. Loher, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg ve R. Riek, «The fold of  $\alpha$ -synuclein fibrils,» *PNAS*, cilt 105, no. 25, p. 8637-8642, 2008.
- [61] D. P. Mcgowan, W. V. Roonmom, H. Holloway, G. P. Bates, L. Mangiarini, G. J. S. Cooper, R. L. M. Faull ve R. G. Snell, «Amyloid-Like Inclusions In Huntington's Disease,» *Neuroscience*, cilt 100, no. 4, pp. 677-680, 2000.
- [62] C. Soto, «Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches,» *J Mol Med*, cilt 77, p. 412-418, 1999.

- [63] F. Li, L. Zhang ve R. M. Metzger, «On the Growth of Highly Ordered Pores in Anodized Aluminum Oxide,» *Chem. Mater.*, cilt 10, pp. 2470-2480, 1998.
- [64] K. H. A. Lau, P. J. Cameron, H. Duran, A. I. Abou-Kandil ve W. Knoll, *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology*, R. Förch, H. Schönherr, A. Tobias ve A. Jenkins, Dü, Wiley-VCH, 2009.
- [65] W. H. Daly ve D. Poche, «The Preparation of N-Carboxyanhydrides of  $\alpha$ -Amino Acids Using Bis(Trichloromethyl)Carbonate,» *Tetrahedron Letters*, cilt 29, no. 46, pp. 5859-5862, 1988.
- [66] G. Floudas ve H. W. Spiess, «Self-Assembly and Dynamics of Polypeptides,» *Macromol. Rapid Commun.*, cilt 30, no. 4-5, pp. 278-298, 2009.
- [67] A. Asano, C. Tanaka ve Y. Murata, «NMR determination of crystallinity for poly( $\epsilon$ -l-lysine),» *Polymer*, cilt 48, no. 13, pp. 3809-3816, 2007.
- [68] M. Rozenberg ve G. Shoham, «FTIR spectra of solid poly-l-lysine in the stretching NH mode range,» *Biophysical Chemistry*, cilt 125, no. 1, pp. 166-171, 2007.
- [69] M. Jackson ve H. H. Mantsch, «The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure,» *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, cilt 30, no. 2, pp. 95-120, 1995.
- [70] T. Jaworek, D. Neher, G. Wegner, R. H. Wieringa ve A. J. Schouten, «Electromechanical Properties of an ultrathin layer of directionally aligned helical polypeptides,» *Science*, cilt 279, pp. 57-60, 1998.
- [71] P. Papadopoulos, G. Floudas, I. Schnell, H. A. Klok, T. Aliferis, H. Iatrou ve N. Hadjichristidis, «" Glass transition" in peptides: temperature and pressure effects,» *The Journal of Chemical Physics*, cilt 122, no. 22, p. 224906, 2005.
- [72] W. K. Surewicz, H. H. Mantsch ve D. Chapman, «Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment,» *Biochemistry*, cilt 32, no. 2, pp. 389-394, 1993.
- [73] J. Kong ve S. Yu, «Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures,» *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, cilt 39, no. 8, pp. 549-559, 2007.



- [74] I. C. Park, K. Saruta ve S. Kojima, «Broadband Dielectric Spectroscopy of Glass Transition in Supercooled Alcohols,» *Journal of the Korean Physical Society*, cilt 32, pp. S817-S820, 1998.
- [75] P. Hedvig, «Multiple Dielectric Relaxation Processes in Amorphous Polymers as a Function of Frequency, Temperature and Applied Pressure,» *Dielectric Spectroscopy of Polymers*, NY, John Wiley & Sons, pp. 17-44.
- [76] J. R. Fried, *Polymer Science & Technology*, 2. dü., Prentice Hall, p. 154.
- [77] T. J. Deming, «Polypeptide Materials: New Synthetic Methods and Application,» *Adv. Matter*, cilt 9, no. 4, 1997.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TUNCEL, Eylül  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 09.08.1989 / Ankara  
Telefon : 0 (535) 508 83 56  
e-mail : [eylultuncel@gmail.com](mailto:eylultuncel@gmail.com)

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans – Ana dal	Hacettepe Üniversitesi / Gıda Mühendisliği	2012
Lisans – Yan dal	Hacettepe Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2012

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2015	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	Buslu Y.Lisans Öğrencisi

### Sunumlar

- Poster sunumu: Polymer brush grafted magnetic nanoparticles for highly efficient water remediation, 2nd International Workshop on Physics Based Modeling of Material Properties and Experimental Observations, Antalya, Türkiye, 15-17 Mayıs 2013.
- Poster sunumu: Design and Application of Silica Gel Functionalized Adsorbents For Efficient Remediation of Cationic Dyes, 44th IUPAC World Chemistry Congress, İstanbul, Türkiye, 11-16 Ağustos 2013.
- Sözlü sunum: Pore Diameter Dependence and Segmental Dynamics of Poly(Z-L-lysine) Peptides Confined to Nanoporous Alumina, 2014 MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, Massachusetts, USA, 30 Kasım – 5 Aralık 2014.

## Yayınlar

- Yousaf A., Farrukh A., Oluz Z., **Tuncel E.**, Duran H., Doğan S.Y. , Tekinay T., Rehman H., Yameen B., UV-light assisted single step route to functional PEEK surfaces, *Reactive & Functional Polymers* 83 (2014) 70–75.
- Nayab S., Farrukh A., Oluz Z., **Tuncel E.**, Tariq S.R., Rehman H., Kirchoff K., Duran H., Yameen B., Design and Fabrication of Branched Polyamine Functionalized Mesoporous Silica: An Efficient Absorbent for Water Remediation, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 4408–4417
- Farrukh A., Akram A., Ghaffar A., **Tuncel E.**, Oluz Z., Duran H., Rehman H., Yameen B., Surface-functionalized silica gel adsorbents for efficient remediation of cationic dyes *Pure and Applied Chemistry*, Volume 86, Issue 7, Pages 1177–1188
- B. Jovanovic; G. Bezirci; A. S. Cagan; J. Coppens; E. E. Levi; Z. Oluz; **E. Tuncel**; H.Duran; M. Beklioglu., Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Aquatic Ecosystem: The First TiO<sub>2</sub> Outdoor Mesocosm Experiment, *Nanotoxicology*, Revizyonda, Ağustos 2015.
- **Tuncel, E.**; Suzuki, Y.; Iossifidis, A.; Steinhart, M.; Duran, H.; Butt, H. -J. and Floudas, G. Makale hazırlık aşamasında, 2015.